

Drosophila melanogaster'in farklı soylarında astaksantin'in *in vivo* kronik etkilerinin belirlenmesi

Determination of in vivo chronic effects of astaxanthin in different strains of Drosophila melanogaster

Handan UYSAL*^{1a}, Hatice ÇELİK^{2b}

^{1,2}Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240, Erzurum

• Geliş tarihi / Received: 18.06.2020

• Düzeltilek geliş tarihi / Received in revised form: 25.11.2020

• Kabul tarihi / Accepted: 06.12.2020

Öz

Rodofit olarak bilinen alglerde bulunan ve kırmızı renkli bir pigment olan astaksantin (ASTA) terpeni bir tetraterpendir. Çalışmada ASTA'nın doz-süre etkileşimine bağlı olarak olası toksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. ASTA'nın toksik etkisi, *Drosophila melanogaster*'in Oregon-R yabani soyunda *in vivo* ömür uzunluğu testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla ergin dişi ve erkek bireyler farklı dozlarda ASTA içeren (25, 50, 100 ve 200 ppm) besiyerinde kronik olarak beslenmiştir. Kontrol grubunda ortalama ömür uzunluğu dişilerde 49.07±1.92 gün iken erkeklerde 51.01±2.12 gündür. Bu değerler en düşük ve en yüksek ASTA uygulama gruplarında (25-200 ppm) dişilerde sırasıyla 32.06±1.50 ve 27.06±1.18 gün, erkeklerde de 32.45±1.48 ve 23.52±0.92 gün olarak bulunmuştur. ASTA'nın kontrol ve uygulama gruplarına ait sonuçlar birbiriyle karşılaştırıldığı zaman hem dişi hem de erkek popülasyonunda ortalama ömür uzunluğunun doz-süre etkileşimine bağlı olarak kısaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$). ASTA terpeninin genotoksik etkisi de yine *D.melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile belirlenmiştir. SMART sonucunda elde edilen verilere göre tüm ASTA uygulama gruplarında (50, 100, 200 ve 400 ppm) konsantrasyon artışına bağlı olarak klon indüksiyon frekansında artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar ASTA'nın somatik mutasyonları uyardığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Genotoksik etki, Karotenoid, Ömür uzunluğu, Somatik mutasyon

Abstract

Astaxanthine (ASTA) terpene, a red pigment found in algae known as rhodospite, is a tetraterpene. In this study, possible toxic and genotoxic effects of the ASTA were investigated depending on the dose-time interaction. The toxic effect of the ASTA was determined by *in vivo* longevity test in Oregon-R wild strain of *Drosophila melanogaster*. For this purpose, adult female and male individuals were chronically fed on media containing different doses of the ASTA (25, 50, 100 and 200 ppm). While the average life span in the control group is 49.07±1.92 days in females, it is 51.01±2.12 days in males. These values are 32.06±1.50 and 27.06±1.18 days in females in the lowest and highest ASTA application groups (25-200 ppm), 32.45±1.48 and 23.52±0.92 in males, respectively. When the results of the control and application groups of the ASTA terpene were compared, it was observed that the average life span decreased in both female and male populations depending on the dose-time interaction ($p<0.05$). The genotoxic effect of the ASTA terpene was also determined by the somatic mutation and recombination test (SMART) in *D.melanogaster*. According to the data obtained from the SMART result, an increase in clone induction frequency was observed in all the ASTA application groups (50, 100, 200 and 400 ppm) due to concentration increase. These results show that ASTA stimulates somatic mutations.

Keywords: Genotoxic effects, Carotenoid, Longevity, Somatic mutation

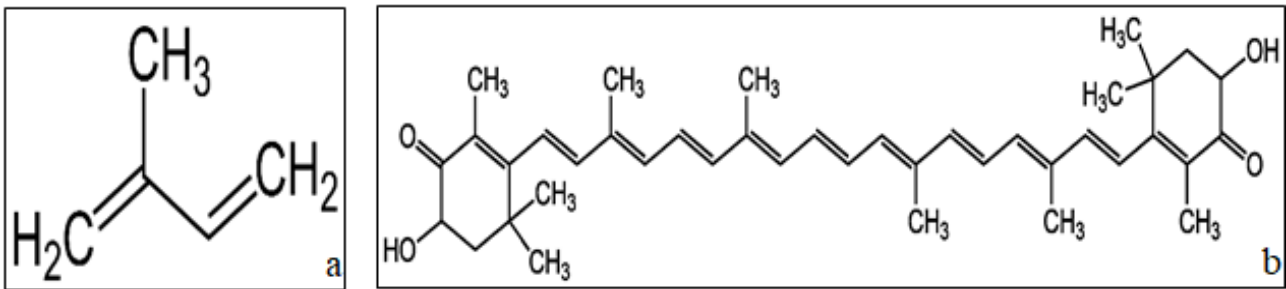
*^a Handan UYSAL, hauysal@atauni.edu.tr, Tel: (0532) 306 16 04, orcid.org/0000-0002-4290-8223

^b orcid.org/0000-0003-2531-6020

1. Giriş

Hayatın temel besin ve oksijen kaynaklarından olan bitkiler, çok eski devirlerden beri insanlar tarafından çeşitli hastalıklara karşı tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Sumner, 2000). Çin'den Ortadoğu'ya, Mezopotamya'dan Amerika'ya, Afrika'dan Eski Roma'ya kadar farklı coğrafyadaki kültürlerin, tarihsel gelişimleri içerisinde endemik bitkileri çeşitli yöntemlerle bu amaçla kullandıkları bilinmektedir (Eichorn ve Evert, 2016). Öyle ki; Antik Mısır ve Sümerler döneminde *Cyperus papirüs* L. (papirüs), *Aloe vera* L. (aloe), *Cannabis sativa* L. (kenevir), *Ricinus communis* L. (hint otu), *Allium sativum* L. (sarımsak), *Juniperus* L. (ardıç), *Commiphora myrrha* N. (mür) ve *Papaver somniferum* L. (haşhaş) gibi yüzlerce bitkinin ilaç üretiminde kullanıldığına dair kil tablet olarak yazılı belgelerin olması, o dönemlerde insanların bitkilerle tedavi yöntemlerini tercih ettiklerinin kanıtlarıdır (Sumner, 2000). Bitkilerden günümüzde de bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve ilaç yapımı gibi alanlarda sıklıkla yararlanılmaktadır (Eichorn ve Evert, 2016). Ancak bazı toplumlarda ilaçlar sentetik ürünler olarak kabul edilip onları kullanmak yerine alternatif tıp olarak tanımlanan doğal ürünlerle tedavi tercih edilmektedir (Aslan, 2005). Bu kapsamda tercih edilen bitkilerin ya da bileşenlerinin hiçbir yan etkisinin olmadığı düşünülerek doz-süre etkileşimine dikkat edilmeden kullanıldığı görülmektedir. Alternatif tıp kapsamında tedavi amaçlı olarak kullanılan ancak etkilerine yönelik tam bir bilgiye sahip olunmayan bitkilerin amaçlanan aksine

istenmeyen etkilere neden olduğu da çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Calixto, 2000; Valerio ve Gonzales, 2005; Güneş ve Danacıoğlu, 2018). Ortaya çıkan bu tip durumlara sebep olduğu/olabileceği düşünülen bitkilerin içerdiği etken maddeleri ve fonksiyonlarını net olarak anlayabilmek için de birçok araştırma yapılmıştır (Erdem ve Eren, 2009). Yapılan araştırmalar sonucunda, bitkilerde ve diğer bazı canlılarda gerçekleşen normal metabolik reaksiyonların ana ve ara ürünleri olarak tanımlanan çeşitli metabolitlerin olduğu belirlenmiştir. Bunlar buldukları canlının yaşamsal işlevleri ile birincil derece ilişkili olmayan sekonder metabolitlerdir. 2000'den fazla kimyasal bileşeni olan sekonder metabolitlerin en geniş ve en yaygın grubunu terpenler oluşturmaktadır. Terpenler, hidrokarbonların bir sınıfı olup izopren birimlerinden (Şekil 1a) oluşan doğal maddeler olarak tanımlanmaktadır (Eichorn ve Evert, 2016). Farklı bitkilerden ve onların ana etken maddelerinden elde edilip hem ekonomik hem de bilimsel yönden değerlendirilen terpenler antioksidan (Naguib, 2000) antimutajen ve antikarsinojen (Cho vd., 2017) özellikleri nedeniyle gıda, temizlik, kozmetik, tıp, eczacılık gibi farklı sektörlerde sıklıkla tercih edilir hale gelmiştir (Kırca vd., 2006). Bu sektörlerde üretilen ve günlük hayatta kullandığımız pek çok ürünün içinde farklı oranlarda terpenler bulunmaktadır. İnsanlar ve hayvansal organizmalar kozmetik ve temizlik ürünlerinde bulunan terpenleri deri yoluyla, gıdalarda kullanılan terpenleri ise oral yolla almaktadırlar.



Şekil 1. a) İzopren'in (Gören, 2002) ve b) ASTA'nın kimyasal yapısı (Fassett ve Coombes, 2011)

Terpenlerin yararlı özelliklerinin yanı sıra istenmeyen etkiler de oluşturabileceği (Lewis vd., 1995), özellikle doz artışına paralel olarak genotoksik etkileri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Morton vd., 1995; Shah vd., 1996). Bu terpenlerden birisi olan astaksantin (ASTA) tetraterpeni sekiz izopren halkasından oluşmaktadır ($C_{40}H_{52}O_4$). Kimyasal yapısı Şekil 1b'de verilmiş olan ASTA, rodofit olarak bilinen alglerde bulunan kırmızı renkli bir pigment, bir

karotenoid çeşididir. Bu metabolit somon, alabalık, istakoz, karides ve diğer denizel organizmalarda pembe veya kırmızı rengin oluşumuna neden olmaktadır (Davinelli vd., 2018).

ASTA'nın hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçlarda da sıklıkla tercih edildiği Hussein vd., (2006) tarafından bildirilmiştir. Ancak tetraterpenlerle yapılan toksisite çalışmalarında, tetraterpenlerin

yüksek konsantrasyonlarda kullanımına bağlı olarak insan periferik hücre kültürlerinde, fare, sıçan, beagle köpekleri ve bir çeşit kemirgen olan gerbil (*Pachyuromys duprasi* Lataste, 1880)'de DNA hasarına neden oldukları bildirilmiştir (Azqueta ve Collins, 2012). ASTA'nın genotoksitesini belirlemeye yönelik olarak yapılan diğer bir çalışmada da farelere kronik olarak ASTA uygulanmış ve artan konsantrasyona bağlı olarak (40, 200, 1000 mg) dişi farelerde iyi huylu, hepatoselüler adenom oranında artış gözlenmiştir (Edwards vd., 2016).

Sunulan bu çalışmada *Drosophila melanogaster* model organizması kullanılarak ASTA terpeninin doz-süre etkileşimine bağlı olarak *in vivo* biotoksik etkileri ömür uzunluğu testi ile genotoksik etkileri de SMART testi ile belirlenmeye çalışılmıştır.

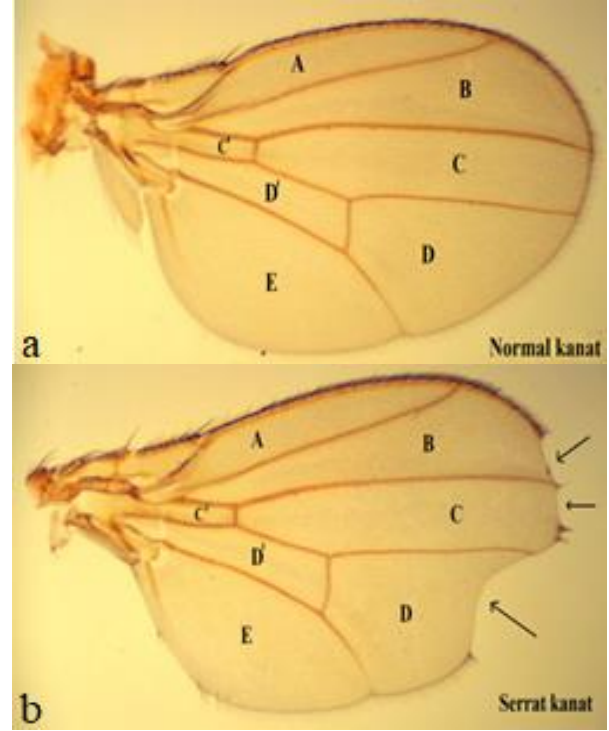
2. Materyal ve metot

2.1. Kullanılan organizma

Klasik Mendel genetiği alanında sürdürülen genotoksitesite, mutajenite ve ömür uzunluğu toksitesinin belirlenmesine ilişkin deneysel çalışmalar farklı model organizmalar ile yapılmaktadır. Bu organizmaların en önemlilerinden birisi olan *D. melanogaster*, halk arasında meyve ya da sirke sineği olarak bilinen bir tür olup Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uzun yıllardan beri kendileştirilmiş genetik olarak homozigot, hiçbir mutant karakter taşımayan bir laboratuvar stoğudur. Ömür uzunluğuna ait çalışmalarımızda *D. melanogaster*'in Oregon-R yabancı soyu, somatik mutasyonların belirlenebilmesi için de normal metabolik aktiviteye sahip *flare* (*flr³*) ve *multiple wing hair* (*mwh*) mutant soyları kullanılmıştır. Hem Oregon-R yabancı soyu hem de *flr³* ve *mwh* mutant soyları yuvarlak-kırmızı gözlü, uzun kanatlı (Şekil 2a) ve kahverengi vücutludur. Ancak uzun kanatlı olan *flr³* mutant soyunda kanatların distal kısımları testere dişi şeklindedir ve bu bireyler serrat kanatlı olarak tanımlanırlar (Şekil 2b).

Mutant soylardan birisi olan *flare* (*flr³*), içerdiği *flr³* belirleyici (marker) genine bağlı olarak kanatlar üzerinde A'dan E'ye olmak üzere belirlenen 7 ayrı sektörde (Şekil 2a ve 2b) yabancı tip sineklerin

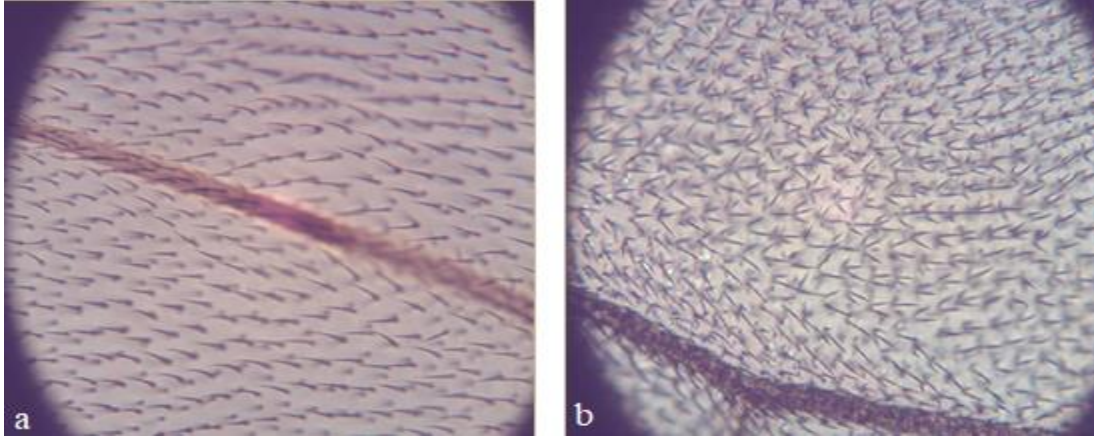
normal, düz ve uzun kıllarının (trikom) aksine körelmiş, kısalmış, nokta şeklinde, koyu renkli balon veya kalın düzgün olmayan (Şekil 3a) kıllar taşımaktadır (Graf vd., 1998).



Şekil 2. a) Normal kanat b) Serrat kanat fenotiplerine ait sektörler ve kanatların mikroskopik görünüşü (10x10)

flr³ geni III. kromozomun sentromere yakın (3-38.8) olan bölümünde bulunmaktadır ve bulunduğu canlıda homozigot resesif durumda iken embriyonik evrede letalite göstermesi sebebiyle ergin bireyler oluşamamaktadır. *flr³* geninin embriyonik letal etkisinden dengeleyici bir kromozom olan TM3 kromozomu ile heterozigotluk sağlanarak bireyin kanat imajinal disklerinden mutant kanat hücrelerinin gelişimi sağlanmaktadır. Yabancı tip bireylerin kanatlarının kenarları düzgün iken, dengeleyici kromozomda bulunan *Bd⁵* geni mutant bireyin kanat kenarlarının testere dişi şeklinde bir fenotip göstermesine neden olmaktadır.

Multiple wing hair (*mwh*) mutant soyunda ise *mwh* marker geni, aynı hücreden üç veya daha fazla sayıda kanat kılının çıkmasına sebep olmaktadır (Şekil 3b). Resesif olan bu gen de, III. kromozomun telomere yakın bölümünde (3-0.3) bulunmaktadır (Graf vd., 1998).



Şekil 3. a) flare b) mwh bireylere ait kanat kıllarının mikroskopik görüntüsü (10x40)

2.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada olası toksik ve genotoksik etkilerini araştırdığımız ASTA tetraterpeni (3,3'-dihidroksi-beta, beta-karoten-4,4'-dion, Cas No: 472-61-4), bu terpenin çözücüsü olarak kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO, Cas No: 67-68-5), genotoksitesi iyi bilinen ve genotoksite testinde pozitif kontrol olarak kullanılan etil metansülfonat (EMS, Cas No: 62-50-0) ile *Drosophila* Instant Medium (DIM) Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) şirketinden temin edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan diğer kimyasal maddelerden agar agar, dietil eter, propionik asit, gliserol, kloral hidrat, arap zımkı, entellan ve etil alkol de yine Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) şirketinden alınmıştır.

2.3. Ömür uzunluğu testi

ASTA'nın ömür uzunluğu üzerine etkileri, *D. melanogaster*'in Oregon-R yabancıl soyuna ait dişi ve erkek popülasyonlarında ayrı ayrı çalışılmıştır. Deneilerin tümünde kullanılacak dişi ve erkek sineklerin aynı yaşlı bireyler olması için ön kültürler oluşturulmuştur. Ön kültürler için saf su, agar, toz şeker, bira mayası, mısır unu ve propionik asit kullanılarak Standart *Drosophila* Besiyeri (SDB) hazırlanmış ve steril kültür şişelerine dökülmüştür (Uysal vd., 2006). Hazırlanan bu besi yerlerinde P: 10 ♀ X 10 ♂ çaprazlamaları yapılmıştır. Ön kültürlerde 9-10. gününden itibaren ergin hale gelen bireyler, 6 saat sonra çiftleşme yeteneği kazandıklarından özellikle dişilerin virjin olarak elde edilebilmesi amacıyla dişi ve erkekler ayrı ayrı olmak üzere 4'er saatlik periyotlar halinde 3 gün boyunca sürekli toplanmıştır. Toplanan 1-3 günlük, çiftleşmemiş bireyler kontrol ve uygulama gruplarında kullanılmıştır.

ASTA'nın uygulama konsantrasyonlarını belirlemek için önce 500 ppm'lik stok çözelti hazırlanmış ve bu çözeltiden seyreltilerek hazırlanan uygulama konsantrasyonları ile birçok ön denemeler yapılmıştır. Yapılan ön denemelerde 25 ppm'den daha düşük konsantrasyonlarda her iki popülasyonda da ömür uzunluğu bakımından herhangi bir etki gözlenmezken, 200 ppm'in üzerinde akut ölümler meydana gelmiştir. Bu nedenle 25, 50, 100 ve 200 ppm olmak üzere dört konsantrasyon tercih edilmiştir. Daha sonra ömür uzunluğu testi için iki ayrı deney seti oluşturulmuştur. İlk deney seti yalnızca SDB ve SDB+%1 DMSO içeren kontrol grubudur. İkinci deney seti ise ASTA'nın dört farklı konsantrasyonunu (SDB+25, 50, 100 ve 200 ppm) içeren uygulama gruplarından oluşmuştur.

Popülasyon yoğunluğu kontrol ve uygulama grupları için 100 dişi ve 100 erkek birey olarak belirlenmiştir. Deney prosedürü kapsamında yapılacak aktarımlarda ve ölen bireylerin ortamdaki uzaklaştırılmasında bu yoğunluğun oluşturabileceği güçlüklerden dolayı kontrol ve uygulama gruplarına ait bireyler eterize edilerek başlangıç konsantrasyonları da göz önüne alınıp 4 gruba ayrılmış ve 25'er bireyden oluşan küçük gruplar oluşturulmuştur. Kontrol ve uygulama grupları için çalışmalar eş zamanlı olarak başlatılmış ve tüm gruplar ısıtılmalı-soğutulmalı etüvlerde (25±1°C), %60 bağıl nem ile karanlık ortamda tutulmuştur. Böylece çevresel faktörlerin tümü stabil kalırken tek değişken farklı konsantrasyonlarda uygulanan ASTA olmuştur.

Kronik uygulama için ergin bireyler üç günde bir farklı konsantrasyonlarda ASTA terpenini içeren taze besi yerlerine aktarılmış ve aktarım sırasında ölen bireyler kaydedilerek ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Bu işlem en son birey ölünceye

kadar sürdürülmüş ve denemeler üç kez tekrarlanmıştır.

2.4. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi

SMART yönteminde kullanılacak olan *mwh* ve *flr*³ mutant türlerine ait erkek ve dişi bireylerin sayısını artırmak için de ön çaprazlamalar yapılmıştır. Hazırlanan kültür şişelerine *flr*³ ve *mwh* türleri ayrı ayrı konulmuş ve çaprazlamalar gerçekleştirilmiştir. Çaprazlamalar sonucunda metamorfozu tamamlayan 1-3 günlük (72±4 saatlik) aynı yaşlı *flr*³ ve *mwh* ergin bireyleri, 4'er saatlik periyotlar halinde henüz çiftleşmeden toplanmıştır. Toplanan dişi ve erkek bireyler taze SDB içeren kültür şişelerinde ayrı ayrı olmak üzere ısıtılmalı-soğutmalı etüvlerde muhafaza edilmiştir. Daha sonra çalışma kapsamında kullanılacak olacak olan trans-heterozigot larvaların elde edilmesi için bu bireyler kullanılarak yeni çaprazlamalar yapılmıştır. Çaprazlamalar deney planlamasına göre her şişede ortalama 40 *flr*³ dişi ve 40 *mwh* erkek olacak şekilde önceden hazırlanmış SDB içeren kültür şişelerinde gerçekleştirilmiştir (Kasımoğlu ve Uysal, 2016). 24 saatin sonunda çaprazlamada kullanılan ergin bireyler, hem deneylerde kullanılacak larvaların aynı evrede olmalarını sağlamak hem de daha fazla sayıda larva elde etmek için yeni besi yerlerine aktarılmış ve bu işlemler çalışmalarımız tamamlanincaya kadar rutin olarak tekrarlanmıştır.

ASTA'nın uygulama konsantrasyonlarını belirlemek için birçok ön deneme yapılmış ve uygulamalarda 50, 100, 200 ve 400 ppm olmak üzere dört konsantrasyon seçilmiştir. 50 ppm'den daha düşük uygulamalarda genotoksik etki gözlenmezken 400 ppm'den yüksek uygulamalarda larvaların yaşama oranı düştüğü için kanat preparatı hazırlayacak kadar ergin birey elde edilememiştir. Bu nedenle 50 ppm'den daha düşük ve 400 ppm'den daha yüksek konsantrasyonlar ile çalışılmamıştır.

SMART için de kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ASTA içeren uygulama gruplarından oluşan iki farklı deney seti hazırlanmıştır. İlk deney seti, ASTA'nın çözücüsü olan %1'lik DMSO ve distile suyla hazırlanan negatif kontrol grupları ile genotoksitesi iyi bilinen 1 ppm etil metansülfonat (EMS) pozitif kontrol gruplarından oluşmuştur. İkinci deney seti ise ASTA'nın dört farklı konsantrasyonunun (50, 100, 200 ve 400 ppm) DIM'a eklenmesiyle oluşturulan uygulama gruplarıdır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait kültür şişelerine, 100'er üçüncü evre trans-heterozigot larva konulmuş ve

her iki gruba ait tüm kültür şişelerindeki larvalar başkalaşımını tamamlayıp ergin birey haline gelinceye kadar ısıtılmalı-soğutmalı etüvlerde muhafaza edilmiştir.

Kontrol ve uygulama gruplarına ait larvalardan hayat devrini tamamlayıp ergin hale gelen bireyler günlük olarak eterize edilip toplanmış ve daha sonra hazırlanacak kanat preparatları için %70'lik etil alkol içeren ependorf tüpleri içerisinde +4°C'de muhafaza edilmiştir. Kanat preparatlarının yapımında Faure solüsyonu kullanılmıştır (Schaik ve Graf, 1991). Ergin sinekler kanat morfolojilerine göre normal kanatlı ve serrat kanatlı olarak ayrılıp çukur lamda faure solüsyonuna alınmıştır. Daha sonra binoküler mikroskop altında ince uçlu pensler ile onlara ait kanatlar vücuda bağlandığı yerden özenle ayrılarak kanat preparatları yapılmıştır. Her bir bireyin kanatları çiftler halinde yan yana gelecek şekilde lam üzerinde belirli aralıklarla dizilmiş ve lam üzerine ortalama 80 adet kanat yerleştirildikten sonra preparatlar bir gün kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlara bir iki damla entellan damlatılarak üzerlerine lamel kapatılıp daimi preparatlar hazırlanmıştır. Daha sonra bu preparatlar Boeco marka dijital kameralı trinoküler ışık mikroskobu (BM-180/T/SP) altında incelenmiştir. Kanatların mutant klon taşıyıp taşımadıklarının daha net bir şekilde belirlenmesi için hem dorsal hem de ventral yüzeydeki hücre tabakaları ayrı ayrı incelenmiştir. İncelemeler sonucunda belirlenen mutant hücre klonları tekli ve ikili benekler şeklinde gruplandırılarak kaydedilmiş ve istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır (Guzman-Rincon ve Graf, 1995).

2.5. İstatistiksel analizler

Ömür uzunluğu testi için elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri, SPSS 15.0 programı ile yapılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait maksimum ve ortalama ömür uzunluğu değerlerinin karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi olan Tukey ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmış ve istatistiksel önemlilik düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Ayrıca dişi ve erkek popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri de Microsoft Windows Office Excel programı kullanılarak çizilmiştir. SMART yönteminden elde edilen sonuçların istatistiksel analizi ise Microsta bilgisayar programı ile yapılmıştır (Frei ve Würzler, 1988).

3. Bulgular

3.1. Ömür uzunluğu testinden elde edilen bulgular

Ömür uzunluğu üzerine toksisitesi araştırılan ASTA tetraterpeninin ön denemeler sonucu belirlenmiş olan dört farklı konsantrasyonu ile uygulama grupları oluşturulmuştur (SDB+25, 50, 100 ve 200 ppm). *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonları için ASTA uygulamaları kronik olarak yapılmış ve haftada iki kez gerçekleştirilen her aktarımda taze besiyerleri başlangıç konsantrasyonları kadar ASTA içermiştir.

ASTA'nın tüm uygulama gruplarına ait maksimum ömür uzunluğu verileri, DMSO kontrol gruplarına ait veriler ile karşılaştırılarak istatistiki analizler yapılmıştır. Distile su (1) ve DMSO (2) kontrol gruplarına ait maksimum ömür uzunluğuna ait değerler, dişi popülasyonunda sırasıyla 77 ve 73 gün, erkek popülasyonunda da 76 ve 73 gün olarak bulunmuştur (Tablo 1). Hem erkek hem dişi popülasyonu için distile su ve DMSO kontrol grupları arasındaki fark istatistiki olarak önemli değildir ($p>0.05$). ASTA terpeninin en düşük ve en yüksek (25-200 ppm) uygulama gruplarında ise maksimum ömür uzunluğu dişi popülasyonunda sırasıyla 57 ve 45 güne; erkek popülasyonunda da aynı uygulama grupları için sırasıyla 57 ve 39 güne düşmüştür (Tablo 1). Hem dişi hem de erkek

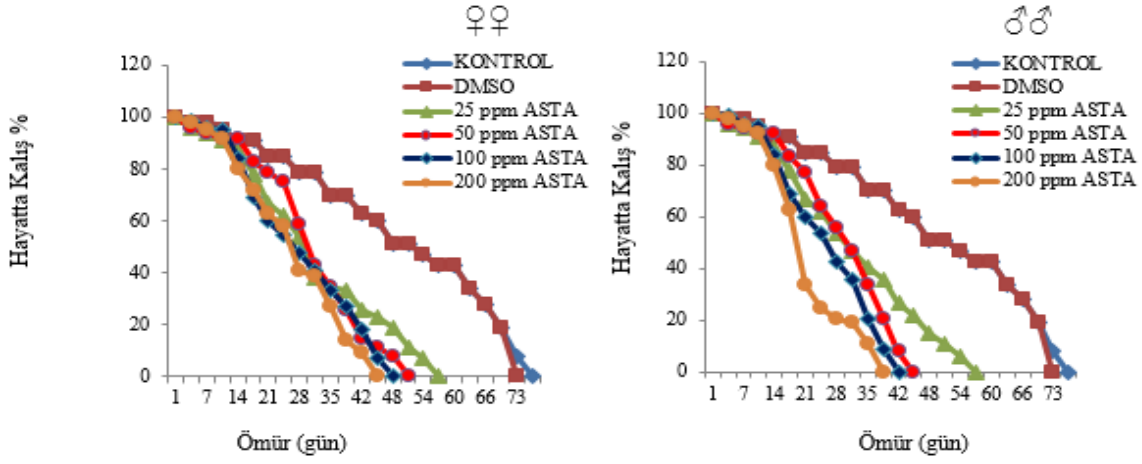
popülasyonunda maksimum ömür uzunluğu bakımından artan konsantrasyona bağlı olarak gözlenen düşüş, DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman istatistiki olarak $p<0.05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Maksimum ömür uzunluğuna ait değerler ile çizilen hayatta kalış eğrileri Şekil 4'de verilmiştir.

Elde edilen veriler ile bu çalışmanın bir diğer parametresi olan ortalama ömür uzunlukları da hesaplanmıştır. Dişilerde distile su (1) ve DMSO (2) kontrol grupları için 49.39 ± 1.96 ve 49.07 ± 1.92 gün olarak belirlenen ortalama ömür uzunluğuna ait değerler, en düşük (25 ppm) ve en yüksek (200 ppm) ASTA uygulaması için sırasıyla 32.06 ± 1.50 ve 27.06 ± 1.18 güne; erkeklerde de distile su (1) ve DMSO (2) kontrol gruplarına ait ortalama ömür uzunluğu değerleri 51.37 ± 2.16 ve 51.01 ± 2.12 günden aynı ASTA uygulama grupları için sırasıyla 32.45 ± 1.48 ve 23.52 ± 0.92 güne düşmüştür (Tablo 1). Hem dişi hem erkek popülasyonlarında ortalama ömür uzunlukları bakımından kontrol ve uygulama grupları arasında gözlenen fark istatistikselsel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu çalışmada, artan ASTA konsantrasyonuna bağlı olarak her iki popülasyona ait negatif korelasyon değerleri (regresyon düzeyi) de hesaplanmış ve bu değer dişi popülasyonunda $R=-0.472$, erkek popülasyonunda ise $R=-0.538$ olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Kronik olarak ASTA uygulanmış *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarında maksimum ve ortalama ömür uzunluğuna ait değerlerin karşılaştırılması

ASTAKSANTİN								
Deney Grupları	♀♀				♂♂			
	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*
Kontrol (1)	100	77	49.39±1.96		100	76	51.37±2.16	
%1 DMSO (2)	100	73	49.07±1.92		100	73	51.01±2.12	
25 ppm (3)	100	57	32.06±1.50	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6*	100	57	32.45±1.48	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6*
50 ppm (4)	100	51	31.93±1.16		100	45	30.58±1.04	3-6* 4-6*
100 ppm (5)	100	48	28.67±1.27		100	42	28.95±0.98	
200 ppm (6)	100	45	27.06±1.18		100	39	23.52±0.92	
Regresyon düzeyi		R= -0.472				R= -0.538		

Maks.: Maksimum, SH: Standart Hata, *: 0.05 düzeyinde fark önemlidir.



Şekil 4. Kronik olarak ASTA uygulanmış *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.

3.2. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinden elde edilen bulgular

Genotoksitesisi araştırılan ASTA tetraterpeni için ön denemeler sonucu belirlenmiş olan dört farklı uygulama grubu (DIM+50, 100, 200 ve 400 ppm) oluşturulmuştur. ASTA'nın tüm uygulama gruplarına ait veriler, DMSO negatif kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve sonuçlar negatif (-), önemsiz etkili (i), pozitif etkili (+) olarak değerlendirilmiştir (Tablo 2). Normal kanat fenotipinde ASTA'nın en düşük uygulama grubu olan 50 ppm'de 6 küçük tek tip (KTT) mutant klon gözlenirken 100 ppm'de 7 KTT ve 1 büyük tek tip (BTT) mutant klon gözlenmiş ve toplam klon frekansları sırasıyla 0.07 ve 0.10 olarak belirlenmiştir. Diğer uygulama grubu olan 200 ppm'de 13 KTT ve 1 BTT klon gözlenmiş, toplam klon frekansı ise 0.17 olarak bulunmuştur. En yüksek uygulama grubu olan 400 ppm'de ise 19 KTT ve 4 BTT mutant klon gözlenmiş ve toplam klon frekansı da 0.28 olarak hesaplanmıştır.

50, 100 ve 200 ppm uygulama gruplarından elde edilen veriler, DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman sonuçlar $p > 0.05$ düzeyinde tüm klon tipleri için negatif (-) ya da önemsiz etkili (i)'dir. En yüksek uygulama grubu olan 400 ppm'de ise BTT ve ikiz klon tipleri hariç KTT, toplam *mwh* klon ve toplam klon tiplerinde sonuçlar pozitif (+) önemli olarak değerlendirilmiştir ($p < 0.05$). Aynı zamanda kontrol grupları için hesaplanan klon indüksiyon frekansı (KİF) değerleri, tüm kontrol ve uygulama grupları içinde hesaplanmıştır. Distile su kontrol grubunda 0.41, DMSO kontrol grubunda 0.57 olan KİF değeri, uygulama gruplarında sırası ile 0.31; 0.41; 0.72 ve 1.19 olarak bulunmuştur (Tablo 2).

ASTA'nın tüm uygulama gruplarından elde edilen serrat kanat fenotipinde de konsantrasyon artışına paralel olarak mutant klonların sayısında artış gözlenmiştir. Şöyle ki; 50 ve 100 ppm'de sırasıyla 3 ve 5 olan KTT mutant klon sayısı 200 ve 400 ppm'de 8 ve 10 olarak gözlenirken 400 ppm'de 2 de BTT klon görülmüştür. Elde edilen bu verilere göre, uygulama gruplarına ait toplam klon frekansları da hesaplanmış ve bu değerler sırasıyla 0.03; 0.06; 0.10 ve 0.15 olarak bulunmuştur (Tablo 2). Konsantrasyon artışına paralel olarak gözlenen klon sayısı ve toplam klon frekansına ait artışlar tüm uygulama gruplarında ve tüm klon tiplerinde negatif (-) ya da önemsiz etkili (i) olarak değerlendirilmiştir ($p > 0.05$). Serrat kanat fenotipine ait KİF değerleri de tüm uygulama grupları için sırasıyla 0.15; 0.26; 0.41 ve 0.62 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

4. Tartışma

Sekonder metabolitlerin bir çeşidi olan terpenler, günümüzde bitkilerden doğal olarak elde edilip hem bilimsel hem de ekonomik yönden değerlendirilmektedir. Bu doğal metabolitler, çok farklı amaçlarla geniş bir yelpazede eczacılıkta ilaç hammaddesi ve pigment, gıda üretiminde katkı maddesi, lezzet verici ve boya, ziraat ve hayvancılıkta pestisit, kozmetik sektöründe de renk ve koku verici madde olarak kullanılmaktadır (Hammer vd., 1999; Mouhssen, 2004). Ayrıca farmakolojik özelliklerinin incelenmesiyle belirlenen antioksidan, antiaging (Huangfu vd., 2013; Lashmanova vd., 2015; Ni vd., 2018), antimutajen ve antikanserojen gibi çeşitli biyoaktiviteleri nedeniyle de diyabet, damar tıkanıklığı, alzheimer, kanser gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavisinde sıklıkla tercih edilmektedirler (Kırbağ ve Bağcı, 2000; Arıca, 2017; Shin vd., 2020; Sorrenti vd., 2020).

Tablo 2. ASTA uygulama ve kontrol gruplarına ait SMART bulguları ve analiz sonuçları

Kontrol ve uygulama grupları	KTT klon (m = 2)			BTT klon (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Σ mwh klon (m = 2)			Σ klon (m = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)		
	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Distile su	(0.10)		0	(0.00)		0	(0.00)		8	(0.10)		8	(0.10)		8	(0.10)		0.41
DMSO (%1)	(0.11)	i	2	(0.02)	i	0	(0.00)	-	11	(0.13)	i	11	(0.13)	i	11	(0.13)	i	0.57
EMS (1ppm)	(0.30)	+	8	(0.10)	i	6	(0.07)	+	32	(0.40)	+	38	(0.47)	+	38	(0.47)	+	1.97
50 ppm	(0.07)	i	0	(0.00)	-	0	(0.00)	-	6	(0.07)	i	6	(0.07)	i	6	(0.07)	i	0.31
100 ppm	(0.08)	i	1	(0.01)	i	0	(0.00)	-	8	(0.10)	i	8	(0.10)	i	8	(0.10)	i	0.41
200 ppm	(0.16)	i	1	(0.01)	i	0	(0.00)	-	14	(0.17)	i	14	(0.17)	i	14	(0.17)	i	0.72
400 ppm	(0.24)	+	4	(0.05)	i	0	(0.00)	-	23	(0.28)	+	23	(0.28)	+	23	(0.28)	+	1.19
Distile su	(0.08)		0	(0.00)					7	(0.08)		7	(0.08)		7	(0.08)		0.36
DMSO (%1)	(0.1)	i	1	(0.01)	i		Dengeleyici <i>TM3</i>		9	(0.11)	i	9	(0.11)	i	9	(0.11)	i	0.46
EMS(1 ppm)	(0.24)	+	10	(0.12)	+		kromozomu		29	(0.36)	+	29	(0.36)	+	29	(0.36)	+	1.51
50 ppm	(0.03)	-	0	(0.00)	-		varlığında <i>flr³</i>		3	(0.03)	-	3	(0.03)	-	3	(0.03)	-	0.15
100 ppm	(0.06)	i	0	(0.00)	-		mutasyonu		5	(0.06)	i	5	(0.06)	i	5	(0.06)	i	0.26
200 ppm	(0.10)	i	0	(0.00)	-		gözlenmez.		8	(0.10)	i	8	(0.10)	i	8	(0.10)	i	0.41
400 ppm	(0.12)	i	2	(0.02)	i				12	(0.15)	i	12	(0.15)	i	12	(0.15)	i	0.62

KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, No: klondaki mutasyon sayısı, Fr: mutasyon frekans, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz, m: tesir faktörü

Ancak terpenlerin toksik, genotoksik ve mutajenik etkili olabileceği, doz-süre etkileşimine dikkat edilmeden, önerilen miktarların dışında kullanımlarına bağlı olarak istenmeyen etkiler meydana getirebileceği de birçok araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Stammati vd., 1999; İpek vd., 2005). Örneğin; ASTA'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak (40, 200, 1000 mg) dişi farelerde iyi huylu, hepatoselüler adenom oranında artışa neden olduğu Edwards vd., (2016) tarafından gözlenmiştir. Azqueta ve Collins, (2012) tarafından yapılan farklı bir çalışmada da likopen, lutein, astaksantin ve zeaksantin gibi karotenoidlerinin pro-oksidan aktiviteye bağlı olarak yüksek konsantrasyonlarda insan periferik hücre kültürlerinde, fare, sıçan, beagle köpekleri ve bir çeşit kemirgen olan gerbil (*Pachyromys duprasi* Lataste, 1880)'de DNA hasarına neden oldukları belirlenmiştir. Dehidroabietik asit ve abietik asitin olası ömür uzunluğu ve gelişim toksisitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bu metabolitlerin artan konsantrasyona bağlı olarak (0.25-8 mg/L) *D. manga* Straus, 1820 (su piresi)'da hayatta kalma süresini kısalttığı, akut ve kronik toksisite geliştirdiği ve ayrıca total vücut büyüklüğünde küçülmenin meydana geldiği gözlenmiştir (Kamaya vd., 2005). Benzeri sonuçlar retinol ve stigmasterol terpenlerinin kronik olarak uygulandığı *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarında ortalama ömür uzunluğunun kısalması şeklinde de gözlenmiştir (Oruç ve Uysal, 2018; Uysal ve Oruç, 2018) Stigmasterol ve retinol yalnızca ömür uzunluğu üzerine toksik olmayıp aynı zamanda sıçan, tavşan gibi farklı organizmalarda embriyotoksik (Clark, 2009) ve immunotoksik (Moon vd., 2011) etkiye de sebep olmaktadır. Çelik vd., (2018), guazilen

seskiterpeninin ömür uzunluğu üzerine olası toksik etkisini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, bu terpenin farklı uygulama gruplarında doz-süre etkileşimine bağlı olarak (kronik ve 25, 50, 100, 200 ppm) *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarında ortalama ömür uzunluğunu kısalttığını gözlemişlerdir. Yine aynı araştırmacılar (Çelik ve Uysal, 2019), çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan timol, abietik asit ve skualen terpenlerinin de *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarında ömür uzunluğunu kısalttığını belirlemişlerdir. Tüm bu farklı araştırmaların sonuçları, çalışma sonucu elde edilen bulgular ile uyumludur.

Salvia fruticosa (Yunan adaçayı) ve *Mentha pulegium* (nane)'da bulunan sineol, tujon, kamfor, pulegon ve menton gibi terpenlerin etkileri, *Bactrocera oleae* (zeytin meyvesi sineği) ve *D. melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılmış ve kamfor, pulegon ve mentonun *B.oleae*'da mutajenik etkiyi uyardığı görülmüştür (Kounatidis vd., 2009). Yapılan bir başka çalışmada, karvakrol ve timolün sıçan kemik iliği hücrelerinde toplam kromozom anormalliklerini önemli ölçüde uyardığı ve mitotik indeksin de doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Azirak ve Rencüzoğulları, 2008). Yine timolün yapısal kromozomal anormalliklerini, kardeş kromatid değişimlerini ve mikronükleus oluşumunu uyardığı, aynı zamanda replikasyon indeksini ve mitotik indeksi de azaltarak sitotoksisiteye neden olduğu Büyükleyla ve Rencüzoğulları, (2009) tarafından bildirilmiştir. Metil öjenol terpenine maruz kalan sıçanların karaciğer, akciğer, mesane, kemik iliği ya da böbrek dokusunda DNA hasarının meydana geldiği

(Ding vd., 2011), karanfil yağında doğal olarak bulunan öjenol terpeninin izomeri olan izoöjenolün ise farelerin mide ve böbreklerinde hepatokarsinom ve neoplastik lezyonlar ürettiği gözlenmiştir (National Toxicology Program, 2010; Koh vd., 2013). *T. vulgaris* (kekik) yağında bulunan, gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde kullanıldığı bilinen timolün de Caco-2 hücrelerinde toksik etki gösterdiği (Llana-Ruiz-Cabello vd., 2015), endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını tetiklediği ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak apoptoza neden olabileceği de bildirilmiştir (Chang vd., 2014). Al-Zubairi vd., (2010) tarafından yapılan bir başka çalışmada, zerumbon terpeninin mitotik indeksi konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibe ettiği ancak klastojenik etkisinin anlamlı olmadığı, mikronükleus ve hücre proliferasyon testlerinde ise genotoksik etkinin görüldüğü ve bu etkinin de pozitif anlamlı olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise *Pteridium aquilinum* (kartal eğreltisi)'dan elde edilen ptaquilosid seskiterpeninin DNA alkilleyici ajan olabileceği Shahin vd., (1998) tarafından bildirilmiştir. Bu terpen insanlarda yemek borusu ve mide kanserine, oral uygulama ile sıçanlarda idrar kesesi tümörlerinin ve intravenöz uygulama ile de meme bezi tümörlerinin oluşmasına yol açan hemorajik bir ajan olarak tanımlanmıştır (Shahin vd., 1998). Ayrıca yine ptaquilosid seskiterpeninin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimini uyarak önemli düzeyde genotoksik olduğu da belirlenmiştir (Gil da Costa vd., 2014). Zeytinyağında bulunan skualen terpeninin ısı işleminden sonra *D. melanogaster*'de mutant klon sayısında artışa neden olarak somatik mutasyonları uyardığı da bildirilmiştir (Kounatidis vd., 2009). Farklı terpenlerin sebep olduğu genotoksik etkiler, doz artışına bağlı olarak ASTA uygulaması ile de gözlenmiştir ve elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Yapılan literatür taramalarında terpenlerin toksik/genotoksik etkiler sergilemesine yönelik sunulan ortak bir görüş ise, terpen metabolitlerinin doz-süre etkileşimine bağlı olarak oksidatif strese yol açtığı şeklindedir (Chang vd., 2014). Canlı dokularda, sürekli ve kontrollü bir şekilde üretilen serbest oksijen radikalleri ile antioksidanların vücut içerisinde normal düzeyde tutulmasını sağlayan antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Ancak insanlar dahil pek çok organizmada ve *Drosophila*'da da bulunan antioksidan savunma sistemleri oksidanları nötralize etmede yetersiz kalırsa oksidan/antioksidan arasındaki denge oksidanlar lehine bozulur ve bu durum oksidatif stres olarak

tanımlanan doku hasarına yol açar. (Moskovitz vd., 1997; Missirlis vd., 2003). Çeşitli araştırmacılara göre, oksidatif stres, hücrenin yapı taşları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimler üzerinde meydana gelen reaksiyonel hasarlardan kaynaklanmaktadır (Yu, 1999; Clarkson ve Thompson, 2000). Çalışmamızda kullanmış olduğumuz ASTA'nın farklı konsantrasyonlarının farelerde (15-30 mg/kg) katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitesinin baskılandığı Zhou vd. (2019) tarafından gözlenmiştir. Enzimlerde görülen aktivite değişikliklerinin yanı sıra hücre geçirgenliğinde ve membran proteinlerinde ciddi hasarlara neden olduğu bilinen lipid peroksidasyonu da (Goulart vd., 2005) artan serbest radikallerin başlattığı reaksiyonlardan bir diğeridir. Hücresel düzeyde oluşan bu hasarların da DNA'da mutasyona, kansere ve bazı genetik hastalıklara yol açabileceği Marnett, (2002) tarafından bildirilmiştir. Lipit peroksidasyonu dışında oksidatif stres kaynaklı hasarlar arasında DNA'da oluşan mutasyonlar, baz modifikasyonları, dizilerin kopması ya da yer değiştirmeleri, RNA'da yanlış kodlama ve yanlış eklemeler de gösterilmektedir. DNA'da oluşan hasarların tespiti, hasara verilen hücresel cevapların belirlenmesi, hangi tamir mekanizmasının aktif olduğu/olmadığı, hücre siklusu kontrol aşamalarının işlevsel olup olmadığı ile p53 etkinliğinin belirlenmesi homeostazi için çok önemlidir (Slijepcevic, 2006). Oksidatif strese neden olan diğer kimyasal ajanlar gibi terpenlerin de konsantrasyon artışına bağlı olarak bu noktalarda değişikliklere, metabolik yollarda bozukluklara ve hasar birikimine neden olabileceği düşünülmektedir. Meydana gelen bu etkilerin neticesinde terpenler, genotoksik aktiviteye dayalı olarak doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite gibi bazı kalıtsal ve multifaktöriyel hastalıklara sebep olabilirler. Oksidatif stres aktivitesi ile hücre iletişim yollarının engellenmesi, hücre büyümesinin sınırlandırılması ile replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi de azaltılarak oluşan erken hücre ölümleri sitotoksik etkiyi uymaktadır (Stara vd., 2013).

Çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz tüm veriler literatür bilgileri ışığında değerlendirildiğinde, terpenlerin doz-süre etkileşimine dayalı olarak meydana getirebileceği tüm hücresel hasarlar "*D. melanogaster*"in ömür uzunluğu üzerinde toksisiteye sebep olmuş ve bu durum popülasyon yaşlanması olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kanat hücrelerinde normal trikomların şekil değişikliğinin meydana gelmiş olması yani mutant klon sayısında gözlenen artışlar marker genlerde nokta mutasyon,

ayrılmama ve delesyon gibi genotoksik hasarlara dayalı olarak somatik mutasyonların uyarıldığını göstermektedir.

Kaynaklar

- Al-Zubairi, A. S., Abdul, A. B. and Syam, M. M. (2010). Evaluation of the genotoxicity of zerumbone in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology In Vitro*, 24, 707-712.
- Arıca, Ş. Ç. (2017). Yaşlanma ve alglerin anti-gerontolojik etkileri. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(4), 469-474.
- Aslan, N. (2005). *Kekik tarımı ve kullanım alanları*. Lisans Bitirme Tezi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Azqueta, A. and Collins, A. R. (2012). Carotenoids and DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1-2), 4-13.
- Azirak, S. and Rencüzoğulları, E. (2008). The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 23(6), 728-735.
- Büyükleyla, M. and Rencüzoğulları, E. (2009). The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 943-947.
- Calixto, J. B. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(2), 179-189.
- Chang, H. T., Chou, C. T., Liang, W. Z., Lu, T., Kuo, D. H., Shieh, P., Ho, C. M. and Jan, C. R. (2014). Effects of thymol on Ca²⁺ homeostasis and apoptosis in MDCK renal tubular cells. *Chinese Journal of Physiology*, 57(2), 90-98.
- Cho, K. S., Lim, Y. R., Lee, K., Lee, J., Lee, J. H. and Lee, I. S. (2017). Terpenes from forests and human health. *Toxicological Research*, 33(2), 97-106.
- Clark, R. L. (2009). Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. *Reproductive Toxicology*, 28, 285-296.
- Clarkson, P. M. and Thompson, H. S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 637-646.
- Çelik, H., Kızılet, H., Özdal, M., Gülmez, O., Algur, Ö. F. and Uysal, H. (2018). *Lactarius indigo* mantarında bulunan ve ömür uzunluğunu inhibe eden guazilen'e karşı *Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus osteratus* mantarları. *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences* (p 485). Ankara.
- Çelik, H. and Uysal H. (2019). Stimulation of longevity toxicity based on chronic application of terpenes. *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences*. Ankara.
- Davinelli, S., Nielsen, M. E and Scapagnini, G. (2018). Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review. *Nutrients*, 10(4), 522.
- Ding, W., Lev, D. D., Bishop, M. E., Lyn-Cook, L. E., Kulkarni, R., Chang, C. W., Aidoo, A. and Manjanatha, M. G. (2011). Methyleugenol genotoxicity in the fischer 344 rat using the comet assay and pathway-focused gene expression profiling. *Toxicology Science*, 123,103-112.
- Edwards, J. A., Bellion, P., Beilstein, P., Rumbeli, R. and Schierle, J. (2016). Review of genotoxicity and rat carcinogenicity investigations with astaxanthin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 75, 5-19.
- Eichorn, S. E. and Evert, R. F. (2016). *Raven Bitki Biyolojisi*. (Çeviri Editörü: İsmail Türkan), Palme Yayıncılık.
- Erdem, S. and Eren, P. A. (2009). Tedavi amacıyla kullanılan bitkiler ve bitkisel ürünlerin yan etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66(3), 133-141.
- Fassett, R. G. and Coombes, J. S. (2011). Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine Drugs*, 9(3), 447-465.
- Frei, H. and Würzler, F. E. (1988). Statistical Methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Gil Da Costa, R. M., Oliveira, P. A., Bastos, M. M., Lopes, C. C. and Lopes, C. (2014). Ptaquiloside-induced early-stage urothelial lesions show increased cell proliferation and intact B-Catenin and E-Cadherin expression. *Environmental Toxicology*, 29, 763-769.
- Goulart, M., Batoreu, M. C., Rodrigues, A. S., Laires, A. and Rueff, J. (2005). Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*, 20, 311-315.
- Gören, A. C. (2002). *Bazı Sideritis (Sideritis argyrea, Sideritis dichotoma, Sideritis trojana) türlerinin diterpenik bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının tayini*. Doktora Tezi, Balıkesir

- Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán-Rincón, J. and Würzler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), 203-209.
- Guzman-Rincon, J. and Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *Environmental Science Research*, 50, 169-182.
- Güneş, E. and Danacıoğlu, D.A. (2018). The effect of olive (*Olea europaea* L.) phenolics and sugar on *Drosophila melanogaster*'s development. *Animal Biology*, 68(4), 367-385.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. and Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- Huangfu, J., Liu, J., Sun, Z., Wang, M., Jiang, Y., Chen, Z. Y. and Chen, F. (2013). Antiaging effects of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* on fruit flies under oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(32), 7800-7804.
- Hussein, G., Goto, H., Oda, S., Sankawa, U., Matsumoto, K. and Watanabe, H. (2006). Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(4), 684-688.
- İpek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B. A., Kurkcuoglu, M. and Baser, K. H. C. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by ames *Salmonella*/Microsomal test. *Food and Chemistry*, 93, 551-556.
- Kamaya, Y., Tokita, N. and Suzuki, K. (2005). Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(1), 83-88.
- Kasımoğlu, C. ve Uysal, H. (2016). Farklı test sistemleri ile somatik hücrelerde profenofos genotoksitesine karşı kuşburnu (*Rosa canina* L.) ekstrelerinin doğal bir antigenotoksik ajan olarak kullanılması. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 37, 1.
- Kırbağ, S. ve Bağcı, E. (2000). *Piceae abies* (L.) karst. ve *Picea orientalis* (L.) link uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma. *Journal of Quafqaz Universty*, 3(1), 183-1882.
- Kırca, A., Özkan, M. and Cemeroglu, B. (2006). Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, 97, 598-605.
- Koh, T., Machino, M., Murakami, Y., Umemura, N. and Sakagami, H. (2013). Cytotoxicity of dental compounds towards human oral squamous cell carcinoma and normal oral cells. *In Vivo*, 27, 85-95.
- Kounatidis, I., Papoti, V.T., Nenadis, N., Franzios, G., Oikonomou, M., Partheniou, F., Tsimidou, M. and Mavragani-Tsipidou, P. (2009). Evaluation of potential genotoxicity of virgin olive oil (VOO) using the *Drosophila* wing-spot test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7785-7789.
- Lashmanova, E., Proshkina, E., Zhikrivetskaya, S., Shevchenko, O., Marusich, E., Leonov, S., Melerzanov, A., Zhavoronkov, A. and Moskalev, A. (2015). Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological Research*, 100, 228-241.
- Lewis, F. M., Shah, M. and Gawkrödger, D. J. (1995). Contact sensitivity to food additives can cause oral and perioral symptoms. *Contact Dermatitis*, 33(6), 429-430.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á. and Kamer, A. M. (2015). *In vitro* pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology In Vitro*, 29(4), 647-656.
- Marnett, L. J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181, 219-222.
- Missirlis, F., Rahlfs, S., Dimopoulos, N., Bauer, H., Becker, K., Hilliker, A. and Phillips, J. P. (2003). A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 384(3), 463-472.
- Moon, H. I., Cho, S. B., Lee, J. H., Paik, H. D. and Kim, S. K. (2011). Immunotoxicity activity of sesquiterpenoids from black galingale (*Kaempferia parviflora* wall. ex. baker) against *Aedes aegypti* L. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33, 380-383.
- Morton, C. A., Garioch, J., Todd, P., Lamey, P. J. and Forsyth, A. (1995). Contact sensitivity to menthol and peppermint in patients with intra-oral symptoms. *Contact Dermatitis*, 32(5), 281-284.

- Moskovitz, J., Berlett, B. S., Poston, J. M. and Stadtman, E. R. (1997). The yeast peptidomethionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 94, 9585-9589.
- Mouhssen, L. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
- Naguib, Y. M. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1150-1154.
- National Toxicology Program (2010). Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol. NTP Technical Report. National Toxicology Program: Research Triangle Park, NC.
- Ni, Y., Wu, T., Yang, L., Xu, Y., Ota, T. and Fu, Z. (2018). Protective effects of astaxanthin on a combination of D-galactose and jet lag-induced aging model in mice. *Endocrine Journal*, EJ17-0500.
- Oruç, L. ve Uysal, H. (2018). Bir çeşit sekonder metabolit olan stigmasterol ömür uzunluğu üzerine ketvurucu olabilir mi? *Eurasianbiochem*, Ankara, Türkiye.
- Schaik, V. N. and Graf, U. (1991). Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressant in the wing somatic mutation and recombination test in *D. melanogaster*. *Mutation Research*, 260, 99-104.
- Shah, M., Lewis, F. M. and Gawkrödger, D. J. (1996). Contact allergy in patients with oral symptoms: A study of 47 patients. *American Journal of Contact Dermatitis*, 7(3), 146-151.
- Shahin, M., Smith, B. L., Worrnan, S., Moore, M.R., Seawright, A. A. and Prakash, A. S. (1998). Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased Tnf α levels and mammary gland carcinoma in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244, 192-197.
- Shin, M., Liu, Q. F., Choi, B., Shin, C., Lee, B., Yuan, C. and Cho, K. S. (2020). Neuroprotective effects of limonene (+) against A β 42-induced neurotoxicity in a *Drosophila* model of alzheimer's disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 43(3), 409-417.
- Slijepcevic, P. (2006). The role of DNA damage response proteins at telomeres an "integrative" model. *DNA Repair*, 5(11), 1299-1306.
- Sorrenti, V., Davinelli, S., Scapagnini, G., Willcox, B. J., Allsopp, R. C. and Willcox, D. C. (2020). Astaxanthin as a putative geroprotector: molecular basis and focus on brain aging. *Marine Drugs*, 18(7), 351.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H. L. and Wright, A. (1999). Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 813-823.
- Stara, A., Kristan, J., Zuskova, E. and Velisek, J. (2013). Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(1), 18-23.
- Sumner, J. (2000). *The natural history of medicinal plants*. Timber Press.
- Uysal, H., Şişman, T. and Aşkın, H. (2006). *Drosophila biyolojisi ve çaprazlama yöntemleri*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Yayınları.
- Uysal, H. and Oruç H. (2018). Retinol-induced aging in female and male populations of *Drosophila melanogaster* Oregon R (wild-type). *International Symposium Ecology*, Kastamonu.
- Valerio, L. G. and Gonzales, G. F. (2005). Toxicological aspects of the south american herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicological Reviews*, 24(1), 11-35.
- Yu, B. P. (1999). Approaches to anti-aging intervention: The promises and the uncertainties. *Mechanisms of Ageing and Development*, 111(2-3), 73-87.
- Zhou, Y., Baker, J. S., Chen, X., Wang, Y., Chen, H., Davison, G. W. and Yan, X. (2019). High-dose astaxanthin supplementation suppresses antioxidant enzyme activity during moderate-intensity swimming training in mice. *Nutrients*, 11(6), 1244.