

Tarçının (*Cinnamomum zeylanicum*) Ames Testi ile Mutajenik Etkisinin Araştırılması

Fahriye ZEMHERİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Afyonkarabisar/TÜRKİYE

ÖZET

Günümüzde uçucu yağların kozmetik, parfüm ve gıda sanayinden, ilaç sanayine kadar geniş bir kullanım alanı vardır. Bu şekilde geniş kullanım alanına sahip olan bitkilerin mutajenik ve antimutajenik etkisini belirlemek çeşitli hastalıklar ve kanserin tedavisinde büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) bitkisinden elde edilen uçucu yağın mutajenik etkisi, yaygın olarak kullanılan Ames mutajenite test yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çeşitli dozlarda kullanılan yağın mutajenik etkisi *Salmonella typhimurium*' un TA98 ve TA100 suşlarında araştırılmış ve sonuç olarak *Salmonella typhimurium*' un TA98 suşunda 14 µg/ml'de toksik olduğu, TA100 suşunda 4 ve 2 µg/ml'de zayıf mutajenik etki gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ames Test, Mutajenik Etki, *Salmonella typhimurium*, Tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*)

•••

The Investigation of Mutagenic Effect of Cinamon (*Cinnamomum zeylanicum*) By Ames Test

SUMMARY

Today in the world the essential oils have a wide area of usage from cosmetics and perfume, industry to food and pharmaceutical industry. Knowing the wide usage area of mutagenic and antimutagenic effect of this kind of plant may have crucial importance in the treatment of a variety of illnesses and cancer. In this study, the mutagenic effect of the essential oil which is obtained from cinamon (*Cinnamomum zeylanicum*) has been investigated. Aiming this, in this experiment Ames mutagenite test, which is widely used, has been applied. Various doses of oil's mutagenic effect have been investigated in the TA98 and TA100 strains of *Salmonella typhimurium*. As a result it is appointed that TA98 strain of *Salmonella typhimurium* shows toxic in 14 µg/ml and TA100 strain of *Salmonella typhimurium* shows low mutagenic effect in 4 ve 2 µg/ml

Key Words: Ames Test, Mutagenicity, *Salmonella typhimurium*, Cinamon (*Cinnamomum zeylanicum*),

GİRİŞ

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli bitkilerin yüzyıllardan beri halk arasında yiyecek, içecek olarak ve birçok hastalığın tedavisinde tıbbi amaçlı kullanıldığı (Essawi ve Srou, 2000; Özer ve ark., 2001), bitki ve mikroorganizmaların öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özelliklerinin 1926 yılından bu yana araştırıldığı rapor edilmektedir (Dığrak ve ark., 1999). Uçucu yağlar ve bileşenlerin farklı kompleks karışımlar oluşturduğu için, biyolojik etkileri yönünden de farklılık gösterebildiği bildirilmektedir (Maksimović ve ark. 2005).

Günümüzde, doğada bulunan bitkilerin, sürekli gelişen tıp ve kimya sanayine önemli ölçüde fayda sağladığı bilinmekte, ilaç sanayi ve halk arasında oldukça sık kullanılan antifungal etki gösteren tarçının (*Cinnamomum zeylanicum*) bu özelliklerinden dolayı değerli bir bitki olduğu rapor edilmektedir (Bruneton, 1995; Guynot ve ark., 2003).

Tarçının, diyabette etkili olabileceği düşünülen ve hipoglisemik etkili bir bitki olduğu; tarçın ekstraktlarının *in vitro* glukoz alımını ve glikojen sentezini artırarak glukoz metabolizmasında olumlu etkilere sahip olabileceği bildirilmektedir (Khan ve ark., 2003). Tarçının uzun süreli geleneksel kullanımından sonra onu modern terapi yöntemlerinde kullanmak amacıyla hayvanlar üzerinde birçok bilimsel çalışmalar yapıldığı da rapor edilmektedir (Karnick, 1994).

Genetik şifrenin bulunduğu DNA'da kendiliğinden veya çeşitli etkenlere bağlı olarak meydana gelen kalıtsal değişikliklerin mutasyona sebep olabileceği bildirilmektedir (Yıldırım ve ark.,2007). Bir genin genomdaki sayısının ve yerinin değişimsiz yapısının değişmesi gen mutasyonları olarak adlandırılmakta ve kromozom yapısında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmektedir (Demirsoy, 2005). Temel olarak mutasyonu oluşturabilen faktörlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflara ayrılmaktadır (Klug ve Cummings 2002).

Kimyasalların, kullanılan yiyeceklerin ve gıda katkı maddelerinin insanlarda oluşturduğu mutajenite ve karsinojenite olgusunun belirlenmesinde bakteri kullanımının yaygın olduğu bildirilmekte ve bunun nedeninin de yaşayan tüm canlıların ortak genetik yapının aynı olması temeline dayanmaktadır (Tüylü, 2001). Mutajenite testlerinin en önemli zorluğu, memelilerin mutajen maddelere az duyarlı olmaları fakat buna karşın mikroorganizmaların mutajenlere karşı çok daha duyarlı olduğu, kısa zamanda çok sayıda jenerasyon geçirdikleri için çalışmaları daha kolay ve ucuz olduğu, mutajen maddelerin araştırılması için çeşitli, uzun ve kısa zamanlı test yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağladığı bildirilmektedir (Zeytinoglu ve ark., 1998).

Bugün için en iyi bilinen kanser, onkogen ve tümör baskılayıcı ilişkili genlerdeki mutasyonlar tarafından

başlatılmakta ve mutasyona neden olan kimyasalların insanlar için sıklıkla karsinojenik olduğu ve karsinojenik potansiyelleri açısından test edilmelerinin zorunlu olduğu bildirilmektedir. Bakterilerin kullandığı testlerin en yaygın kullanılanı 1970'lerin başında Bruce Ames ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen Ames testidir (Forman ve Ames, 1991). Bu testte *Salmonella spp.*'nin His (Histidin) mutasyonunun revertantlarının kullanıldığı bildirilmekte ve farklı mutajenlerin farklı mutasyon tiplerine neden olabileceği bildirilmiştir (Synder ve Champness, 2007).

Unlu ve ark., (2010)'nın yaptığı çalışmada tarçının antimikrobiyal etkisi ve *in vitro* sitotoksitesi araştırılmış ve antibakteriyel bir ajan hatta antikanser ajan olarak kullanabileceği bildirilmiş ve tarçın ekstraktının da antioksidan ve antimutajenik fenoliklerin en önemli kaynaklarından biri olduğu rapor edilmiştir (Jayaprakasha ve ark., 2007).

Deneyin amacı; daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddesi ile tekrar histidin sentezleyebilir (prototrofik) hale dönüşmesi temeline dayanmakta (Synder ve Champness, 2007) ve tarçının sitotoksik doz miktarının belirlenmesiyle, mutajenik dozunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Salmonella typhimurium Test Suşları

Deneyde kullanılan *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşunun *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş Ames testi için baz değişimi ve çerçeve kayması mutajenlerine karşı duyarlı olan TA98 ve TA100 suşları kullanılmış ve Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

Kimyasallar

Bacto agar (Difco), Agar Bakteriyolojik No:1, Nutrient Broth No:2 (Oxoid), D-Biyotin (F.W.244.3), L-Histidin.HCL (F.W.191.7), NaCL (Merck), Ampisilin trihidrat, Sodyum hidroksit (Codex Carloerba), Sitrik asit monohidrat, KCL (Potasyum klorür), MgSO₄.7H₂O (Magnezyum sülfat) (Sigma) temin edilmiştir. Deneyde kullanılan tarçın yağı da (*Cinnamomum Zeylanicum*) ticari bir firmadan (Herba Gıda Ltd. Şti, İzmir) temin edilmiştir.

Salmonella typhimurium Suşlarının Genotiplerinin Kontrol Edilmesi

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olup olmadıklarının test edilmesi gereklidir. Bu nedenle bakterilerin genotipleri; histidin gereksinimi, UvrB mutasyonu, Rfa mutasyonu, R Faktör varlığı ve spontan olarak geriye dönüş sıklığı gibi testlerle kontrol edilmiştir.

Sıvı Kültürdeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Salmonella typhimurium suşlarının gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını belirlemek için

plaklardan bir bakteri kolonisi alınarak sıvı agar içinde süspanse edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 37°C' de 110 devirde bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu gecelik kültürün, 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ olacak şekilde bir dizi seyreltmeleri hazırlanmıştır.

Test Maddesinin Sitotoksik Dozlarının Saptanması

İyi izole olmuş bir koloniden alınarak yapılan gecelik kültürler Nutrient Broth sıvı kültürüyle hazırlanmış, 2 ml top agara 100µl test bileşiğinin tüm dozlarından 100µl 'de 12-16 saatlik gecelik kültürden eklenip Nutrient Agar'a ekim yapılmıştır. DMSO (Dimetil Sülfoksit)'dan da 2 petri çözücü kontrol deneyi yapılmıştır. Top agarlar donduktan sonra plaklar 37°C' de 24 saat inkübe edilmiş ve her doz, iki bakteri suşu için de çift olarak denenmiştir. İnkübasyondan sonra plaklardaki koloni sayıları, kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik olmayan dozlar saptanmıştır.

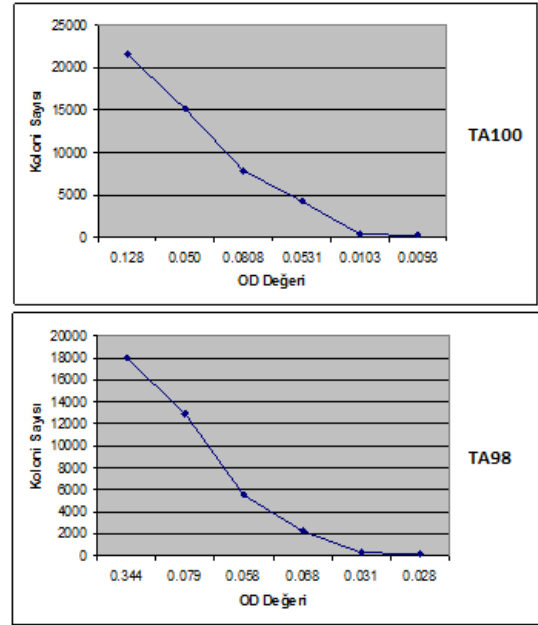
Ames Mutajenite Deneyinin Yapılışı

Maron ve Ames (1983) tarafından belirtilen şekilde mutajenite testi kullanılarak metabolik aktivasyonsuz S9'suz (-) olarak uygulama yapılmıştır. Deneyde 2'ser ml'lik top agara eklenen tüpler 45°C'deki su banyosunda hazır olarak tutulmuş, daha sonra içlerine 100µl test maddesi, 200µl histidin-biyotin çözeltisi ve 100 µl 16 saatlik hazırlanmış gecelik bakteri kültürlerinden eklenerek Minimal Glikoz Agar (MGA) plaklarına dökülerek ve plaklara hızla 8 işareti yapılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dk donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilip 37°C'lik inkübatörde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her deney için 2 petri DMSO ve 3 petri negatif kontrol yapılmıştır. Deneylerde her bir plaktaki revertant koloni sayılarının aritmetik ortalaması alınmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Sıvı Kültürdeki Bakteri Sayısı Bulguları

Bakteri sayısını belirlemek için seyreltilmiş dozlardan plaklara 100 µl'lik miktarda damlatılarak ekim yapılmış, 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve bakteri sıvı kültürünün ml'sinde 21.584 bakteri olduğu belirlenmiş ve sonuçlar resim 1'de gösterilmiştir. Ayrıca bakteri kültürlerinin optik dansitesi 650 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülüp saf kültürün (10⁰) optik dansitesi; TA100 için 0.128, TA98 için 0.344 olarak belirlenmiştir.



Resim.1. *Salmonella typhimurium*'un TA100 ve TA98 suşları için sıvı kültürün ml'sindeki koloni sayısı.

Figure 1. The number of colonies per ml of the liquid culture for TA100 and TA98 strains of *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium Suşlarının Genotiplerinin Kontrol Bulguları

Bakterilerin genotipleri histidin gereksinimi, UvrB mutasyonu, Rfa mutasyonu, R Faktör varlığı ve spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrol testleriyle kontrol edilmiş ve *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarının kendiliğinden *his*-durumundan *his*⁺ durumuna dönüşmesi durumunda olması gereken bakteri sayıları olmak üzere TA98 için 20-50 revertant/plak ve TA100 için 75-200 revertant/plak olarak bulunmuştur.

Salmonella typhimurium Suşlarının Doz Tespit Bulguları

Mutajenik etkilerinin sağlıklı olarak değerlendirilmesi için sitotoksik etkinin saptanması gerekmektedir. Test bileşiğinin *Salmonella typhimurium*' un TA98 ve TA100 suşları için öldürücü olmayan dozlarının saptanabilmesi için sitotoksik doz belirleme yapılarak, mutajenite deneyinin 10 µg/ml, 8 µg/ml, 6 µg/ml, 4 µg/ml ve 2 µg/ml doz aralıklarında yapılmasına karar verilmiştir.

Salmonella typhimurium'un Mutajenite Deneyi Bulguları

Gözlenen sonuçlar doğrultusunda *Salmonella typhimurium*'un TA100 suşunda *Cinnamomum zeylanicum*'un 12 µg/ml dozunun, TA98 suşunda ise 14 µg/ml dozunun öldürücü olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 1. *Salmonella typhimurium*'un TA100 suşunun mutajenite deneyi sonuçları

Table 1. The results of mutagenicity tests for TA100 strains of *Salmonella typhimurium*

Denenen Doz Miktarları (µg/ml)	1.Mutajenite Deneyi Koloni Sayıları Koloni/plak	2.Mutajenite Deneyi Koloni Sayıları Koloni/plak
10 µg/ml	Üreme Yok	Üreme yok
8 µg/ml	Üreme Yok	Üreme yok
6 µg/ml	Üreme Yok	Üreme yok
4 µg/ml	91-80	109-2
2 µg/ml	94-82	56-72
DMSO	95-87	137-114
Kontrol	59-87	125-72

İlk mutajenite deneyi sonucuna göre 4 µg/ml dozundaki bakterilerin belirli oranda geri dönüşüm kolonisi oluşturduğu, yani bu dozda mutajenik etki gösterdiği Tablo 1’de gösterilmiştir. İkinci mutajenite deneyi sonucuna göre de 4 ve 2 µg/ml doz aralıklarında mutajenik etki görülmüştür.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, tarçının kan glukoz düzeyini azalttığı ve bu etkinin tarçında bulunan metil hidroksi kalkon polimeri ile bağlantılı olarak gerçekleştiği, insüline benzeyen etkiler gösterdiği ve anti-bakteriyel, ateş düşürücü ve kolesterol miktarını düşürücü etkisi olduğu bildirilmektedir (Khan ve ark., 2003; Lopez ve ark., 2005). Aynı zamanda tarçının, % 1-4 oranında aromatik uçucu yağ içeriği ile güçlü antioksidan özelliğine sahip olduğu ve bu nedenle de baharat olarak gıda maddeleri içinde yaygın olarak kullanıldığı rapor edilmektedir (Shan ve ark., 2005).

Bazı araştırmacılar tarafından da tarçının kandaki glukoz düzeyini azaltmak suretiyle anti-diabetik özelliğe sahip olabileceğine işaret edilirken, bazı çalışma sonuçlarında da tarçının yüksek glukoz ortamlarında yararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark. 2005; Verspohl ve ark. 2005).

Yapılan bir çalışmada, ilaç yapımının başlangıç maddesi olarak kullanılan kimyasal maddelerin (potasyum meta bisülfidin) ve gıda koruyucu maddelerinin, Ames testi ile *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik etki göstermediği (Kayraldız ve ark., 2006), lizozim gibi biyolojik moleküllerin, *Salmonella typhimurium*’un TA100 ve TA98 suşları için mutajen olduğu bildirilmiştir (Nagao ve ark., 1977). Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ve Türkiye’de “deve kulağı” olarak adlandırılan bitki (*Limonium globuliferum*) türünün mutajenitesi Ames testi ile

araştırıldığında tüm dozlarının mutajenik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Eren ve Özata, 2014).

Tarçının hayvan modellerinde iltihap söktürücü ve eklem iltihaplarını da giderici etkiye sahip olduğu, tahriş etme ve toksik etkilerine bakıldığında bağımsız olarak diğer temel yağlarla biyolojik olarak etkileşime girmediği bildirilmiştir (Vetal ve ark., 2013; Deletre ve ark., 2015).

Tarçın yaygın olarak kullanılan bir bitki olduğu için bu doz miktarlarını saptamak çok önemlidir. Bugüne kadar tarçının mutajenik etkisi araştırılmadığı bildirilmiş ve bu çalışma sonucuna göre tarçının düşük dozda mutajenik etki gösterdiğinin belirlenmesi, tarçının düşük dozda bile oldukça etkili olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak; *Cinnamomum zeylanicum* uçucu yağının mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*’un TA100 suşuna uygulanmış ve 2-4 µg/ml doz aralığında zayıf bir mutajenik etki gösterdiği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- Bruneton J.** Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier matbaası, Paris. 1995; 509.
- Deletre E, Chandre F, Williams L, Duménil C, Menut C, Martin T.** Electrophysiological and behavioral characterization of bioactive compounds of the *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Cuminum cyminum* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils against *Anopheles gambiae* and prospects for their use as bednet treatments. *Parasites & Vectors* 2015; 8-316.
- Demirsoy A.** Kalıtım ve Evrim, Meteksan, Ankara.2005
- Dığrak M, İlçim A, Alma MH.** Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. *Phytotherapy Research*. 1999; 13: 584-587.
- Eren Y, Özata A.** Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests. *Rev Bras Farmacogn* 24 2014; 51-59.
- Essawi T, Srour M.** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 70: 343- 349.
- Forman D, Ames B.** The Ames Test and the Causes of Cancer. *Br. Med. J.* 1991; 303: 428-429.

- Guynot ME, Ramos AJ, Seto L, Purroy P, Sanchis V, Marin S.** Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 94(5): 893–899.
- Jayaprakasha G K, Negi P S, Jena B S, Rao L J M.** Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 2007; 330–336.
- Kayraldız A.** Sodyum Metabisülfid'in sıçan kemik iliği hücrelerinde *in vivo* genotoksik etkileri, Doktora Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana 2005.
- Klug WS, Cummings MR.** *Concept of Genetics*, 6 th Edition, 0-13-081626-4 (Çev. ÖNER, C. Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık. 2002; 816.
- Khan A, Safdar M, Khan MMA, Khattak KN, Anderson RA.** Cinnamon Improves Glucose and Lipids of People With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2002; 26:3215-3218.
- Karnick CR.** *Pharmacopoeial Standards of Herbal Plants.* Sri Satguru matbaası, Delhi. 1994; 1138.
- Kim SH, Hyun SH, Choung SY.** Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005; 18:3953-3958.
- Lopez P, Sanchez C, Batlle R, Nerin C.** Solid- and vapour-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J Agri Food Chem.* 2005; 53(17):6939-46.
- Maksimović ZA, Dordević S, Mraović M.** Antimicrobial activity of *Chenopodium botrys* essential oil. *Fitoterapia.* 2005; 76: 112-114.
- Maron D, Ames BN.** Revised Methods For Salmonella Mutagenicity Test, *Mutat. Res.* 1983; 113, 173-215.
- Nagao M, Honda M, Seino Y, Yahagi T, Kawachi T.** Mutagenicities of protein pyrolysates. *Cancer Lett.* 1977; 2(6), 335-339.
- Özer Z, Tursun N, Önen H.** *Yabancı Otlarla Sağlıklı Yaşam (Gıda ve Tedavi).* Ankara. 4Renk Yayınları. 2001; 133.
- Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H.** Antioxidant capacity of 26 spices extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem,* 2005; 53(20):7749-59.
- Synder L, Champness W.** *Third Edition Moleküler Genetics of Bacteria,* Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University East Lansing, Michigan Washigton, DC. 2007; 492.
- Tüylü B.** Bazı İlaç Öncül Maddelerinin Mutajenik Etkilerinin Bakteriyal ve Hücre Kültürü Testleri İle Araştırılması, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı 2001; 15.
- Unlu M, Ergene E, Vardar Unlu G, Sivas Zeytinoğlu H, Vural N.** Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology* 48 2010; 3274-3280.
- Yıldırım A, Bardakçı F, Karakaş M, Tanyolaç B.** *Moleküler Biyoloji ;Nobel Yayın Dağıtım;* 2007.
- Verspohl EJ, Bauer K, Neddermann E.** Antidiabetic effect of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum zeylanicum* *in vivo* and *in vitro.* *Phytother Res.* 2005; 19(3):203-6.
- Vetal S, Bodhankar SL, Mohan V, Thakurdesai P A.** Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of *Cinnamomum zeylanicum* in rats. *Food Science and Human Wellness.* 2, 2013; 59–67.
- Zeytinoğlu H, Ergene E, Tüylü B.** Bazı (Kloro-Fenil) Fenantroimidazol Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames/Salmonella/Mikrozom Testi İle Araştırılması, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (79-80) XIV. Ulusal Biyoloji Kongresi 7-10 Eylül 1998, SAMSUN Cilt III, 1998; 78-89.