

# ABIETİK ASİT VE GUAİAZULEN TERPENLERİNİN “SEKONDER METABOLİT” GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN *IN VITRO* MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE BELİRLENMESİ

Hatice ÇELİK<sup>1</sup>, Handan UYSAL<sup>2\*</sup>  
<sup>1</sup>htccclk6568@gmail.com, <sup>2</sup>hauysal@atauni.edu.tr

<sup>1,2</sup>Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye

## Özet

Bitkiler tarafından sentezlenen terpenler, lezzet, koku ve renk verici maddeler olarak gıda ve kozmetik sektörlerinde, antimutajen, antioksidan ve antikanserojen aktiviteleri ile de tıp ve eczacılık alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Farklı alanlarda kullanılan bu bileşikler, insanlar tarafından birçok ürünle birlikte temas veya oral yolla vücuda alınmaktadır. Bu çalışmada doğrudan ya da dolaylı olarak alınan guaiazulen ve abietik asit terpenlerinin doz-süre etkileşimine bağlı olarak genotoksik etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla insan periferik kan kültürü kullanılmış ve *in vitro* mikronükleus (MN) testi ile çalışılmıştır. Terpenlerin farklı konsantrasyonlarını içeren (25,50,100 ve 200 ppm) uygulama gruplarına ait veriler terpenlerin çözücüsü olan DMSO kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiki analizleri yapılmıştır. Ancak guaiazulen terpeninin en yüksek uygulama grubu olan 200 ppm’de hücre proliferasyonu gerçekleşmemiştir. Bu nedenle bu uygulama grubu değerlendirmeye alınmamıştır. Elde edilen verilere göre, guaiazulen ve abietik asit terpenlerinin insan lenfosit hücrelerinde mikronükleus frekansında artışa neden oldukları ve konsantrasyon artışına bağlı olarak sitotoksik ve genotoksik aktivite sergiledikleri belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Terpenler, genotoksisite, lenfosit kültürü, mikronükleus.

## DETERMINATION OF “SECONDARY METABOLITE” GENOTOXIC POTENTIALS OF ABIETIC ACID AND GUAIAZULENE TERPENES BY *IN VITRO* MICRONUCLEUS TEST

### Abstract

Terpenes, which are synthesized by plants, are frequently used in food and cosmetics sectors as flavor, fragrance and coloring agents, and in the field of medicine and pharmacy with their antimutagen, antioxidant and anticancer activities. These compounds, which are used in different fields, are taken into the body by people in contact or orally with many products. In this study, genotoxic effects of guaiazulene and abietic acid terpenes taken directly or indirectly were determined depending on the dose-time interaction. For this purpose, human peripheral blood culture was used and studied with *in vitro* micronucleus (MN) test. The data of the application groups containing different concentrations of terpenes (25,50,100 and 200 ppm) were compared with the DMSO control group, which is the solvent of the terpenes, and statistical analyzes were performed. However, cell proliferation did not occur in 200 ppm, the highest application group of guaiazulene terpenine. Therefore, this application group could not be evaluated. According to the data obtained, it has been determined that guaiazulene and abietic acid terpenes cause an increase in micronucleus frequency in human lymphocyte cells and exhibit cytotoxic and genotoxic activity depending on the increase in concentration.

**Key Words:** Terpenes, genotoxicity, lymphocyte culture, micronucleus

## 1. GİRİŞ

M.Ö. 3000’li yıllara dayanan ve tarihin her döneminde Eski Çin, Hindistan ve Tibet’ten Ortadoğu’ya, Mezopotamya’dan Amerika yerlilerine, Afrika’dan Eski Roma’ya kadar farklı coğrafyadaki kültürlerin, kendi tarihsel gelişimleri içerisinde endemik bitkileri farklı amaçlarla kullandıkları bilinmektedir (Evert ve Eichorn, 2016). Birçok amaçla kullanımının yanı sıra Eski Mısırlılar, Yunanlılar ve Romalılar tarafından temelleri atılmış olan şifalı bitkilerle tedavi yöntemleri, daha sonraki çağlarda insanlar tarafından da kullanmış, zenginleştirilmiş ve 19. yüzyılda şifalı bitkilere ait bitki bileşenlerinin sahip oldukları aktiviteler detaylı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır (Erdoğan, 2012). Günümüzde de bitki bileşenlerinin araştırılması hem bilimsel hem de ekonomik yönden oldukça önem arz etmektedir. Özellikle son yıllarda artan sentetik ürünlerin kullanımından uzaklaşmak isteyenlerin bitki bileşenlerine olan ilgisinin arttığı görülmektedir (Dağcı ve Dığrak, 2005; Kılıç, 2005; Ahıskaioğlu, 2007). İlaç hammaddesi olarak ve alternatif tıp yöntemlerinde kullanılan bitki bileşenleri, gıda ve kozmetik sektörlerinde de kullanılmaktadır.

Oldukça geniş kullanım alanı olan bu bitki bileşenlerinin sıklıkla tercih edilenleri bitkilerin kök, çiçek, yaprak gibi kısımlarından elde edilen sekonder metabolitlerdir. Sekonder metabolitler bitkilerin normal metabolik reaksiyonlarında görev almazlar. Fakat buldukları canlının diğer yabancı türlere karşı mücadelesinde (Verpoorte ve ark., 1994), kuraklık, tuzluluk, UV ışınları gibi çevresel stres şartlarına uyum sağlamasında (Sökmen ve Gürel, 2001), tozlaşma ve simbiyotik ilişkilerin kurulmasında (Briksin, 2000), bakteriyel ya da fungal patojenlere karşı geliştirilen savunma mekanizmalarında (Osborn, 1996) rol almaktadırlar. Sekonder metabolitler içerisinde tanımlanan 2000’den fazla bileşenin en yaygın olanlarından birisi de terpenlerdir. Terpenler antialerjik, antioksidan, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser ve antidiyare gibi aktiviteleri ile alternatif tıpta, (Yamamoto ve ark., 2001; Cushnie ve Lamb, 2005; Friedman, 2007; Cazarolli ve ark., 2008; Cushnie ve Lamb, 2011; Manner ve ark., 2013) renk ve aroma verici olarak da gıda ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır (Kırbağ ve Bağcı, 2000). Özellikle sentetik ürünlerden kurtulmak isteyen toplumlar tarafından sıklıkla kullanılan terpenler, izopren birimlerinden oluşmakta ve izopren sayısına göre monoterpen, seskiterpen, diterpen, triterpen tetraterpen ve politerpen şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Ancak İbn-i Sina’nın “her bitki ilaç, her bitki zehir” ifadesi unutulmamalıdır. Şöyle ki; seskiterpenlerin bir çeşidi olan ve yabancı kimyongiller olarak bilinen *Guaiacum officinale*, *G. sanctum*, *G. coulteri* türlerinde, papatya (*Matricaria recutita*)’da, mavi süt mantarında (*Lactarius indigo*) ve yumuşak mercanlarda pigment olarak bulunan (Fiori ve ark., 2011) guaiazulen (GUA) terpeni antialerjik, antienflamatuvar ve antimikrobiyal aktivite gösteren bir metabolittir (Andersen, 1999; Guarrera ve ark., 2001). Ancak kozmetik alanında cilt iyileştirici ajan olarak kullanılan GUA’nın yüksek dozlarda *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 suşlarına uygulandığı zaman mutasyona sebep olduğu görülmüştür (Wang ve ark., 2003). Togar ve ark., (2015a) tarafından yapılan farklı bir çalışmada, farklı dozlarda GUA’nın fare nöronlarında ve N2a nöroblastom hücrelerinde total antioksidan seviyesini azaltırken total oksidan seviyesini artırdığı, insan periferik lenfositlerinde ise sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir (Togar ve ark., 2015b). Terpenlerin bir üyesi olan ve kozalaklı ağaçların reçinelerinde bulunan abietik asit (ABA) diterpeninin de bakteriyel enfeksiyonlara karşı güçlü bir iyileştirici ajan olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Fallarero ve ark., 2013). Yine *Pimenta racemosa* (yenibahar bitkisi)’dan elde edilen ABA, fare ve sıçanda meydana gelen kulak, pençe vb. ödemlere karşı antienflamatuvar etkili bulunmuştur (Fernandez ve ark., 2001).

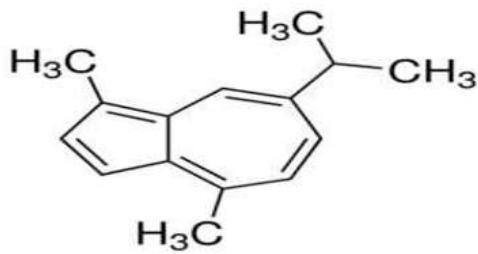
Ancak dehidroabietik asit ve abietik asitin hem akut hem de kronik uygulanması sonucu artan konsantrasyona bağlı olarak (0,25-8 mg/L) *Daphnia magna* (su piresi)’da hayatta kalma süresini kısalttığı ve total vücut büyüklüğünde küçülmeye sebep olduğu gözlenmiştir (Kamaya ve ark., 2005). Yine Peng ve Roberts (2000)’a göre, akut uygulama ile izopimarik asit, pimarik asit ve ABA metabolitleri *Salmo gairdneri* (gökkuşuğu alabalığı) ve *D. magna*’da toksik etkiye dayalı olarak bu organizmaların hayatta kalabilme oranlarını azaltmıştır. Benzeri durum farklı terpenlerin kronik olarak uygulanması sonucunda *D. melanogaster*’in Oregon-R yabanıl soyunda da gözlenmiştir. Guaiazulen, stigmaterol ve retinol gibi terpenler hem dişi hem de erkek popülasyonlarında ömür uzunluğunu kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde kısaltmıştır (Çelik ve Uysal, 2019; Oruç ve Uysal, 2018; Uysal ve Oruç, 2018).

Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle, *in vitro* mikronükleus (MN) testi genotoksik ajanların hızla tespit edilebilmesi için, kromozom analizine göre

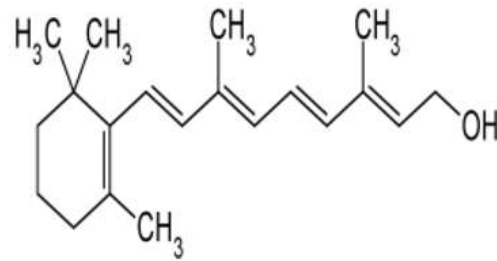
kolay uygulanabilmesi ve daha fazla sayıda hücre incelenebilmesi bakımından yaygın olarak kullanılmaktadır. Sunulan bu çalışmada, GUA ve ABA terpenlerinin doz-süre etkileşimine bağlı olarak olası genotoksik etkileri MN test yöntemiyle araştırılmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

*In vitro* mikronükleus testi için, kontrol ve uygulama gruplarını içeren iki deney seti hazırlanmıştır. İlk deney seti distile su ve terpenlerin çözücüsü olan dimetil sülfoksit (%1 DMSO) negatif kontrol grupları ile genotoksik etkisi bilinen etil metansülfonat (1 ppm EMS) pozitif kontrol gruplarından oluşmaktadır. Diğer deney seti ise GUA (Şekil 1) ve ABA (Şekil 2) terpenlerinin ön denemeler ile belirlenen dört farklı konsantrasyonu (25, 50, 100 ve 200 ppm) ile hazırlanan uygulama gruplarıdır.



Şekil 1. Guaiazulenin kimyasal yapısı



Şekil 2. Abietik asitin kimyasal yapısı

### 2.1. Donör Seçimi

Sigara ve alkol kullanmayan, yakın zamanda enfeksiyonal herhangi bir hastalık geçirmemiş ve herhangi bir hastalığa bağlı olarak sürekli ilaç kullanımı olmayan 23-30 yaşlarında sağlıklı erkek ve kadınlardan alınan periferik kan kullanılmıştır (Bölge Eğitim Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (BEAH KAEK), 2018/12-113).

### 2.2. Hücre Kültürünün ve Mikronükleus Preparatlarının Hazırlanması

İlk olarak iki deney setindeki steril kültür tüplerine Kromozom Medyum B'den 6 ml konulmuştur. Medyum konulan her tüp içerisine sağlıklı donörden alınan 1/10 heparinize kandan 0,5 ml eklenip, tüpler 37±1°C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24. saatinde olası toksik/genotoksik etkilerin belirlenebilmesi amacıyla uygulama gruplarına ait tüplere GUA ve ABA terpenlerinin farklı konsantrasyonları (25, 50, 100 ve 200 ppm) ayrı ayrı eklenmiştir. Daha sonra sitokinezin durdurulması için inkübasyon başlangıcının 48. saatinde son konsantrasyonu 3 µg/ml olan sitokalazin-B'den tüm kültür

tüplerine eklenerek hafifçe vortekslenmiş ve 72 saatlik inkübasyonun tamamlanması için tekrar etüve konulmuştur.

72 saatlik inkübasyon süresi tamamlanan tüpler öncelikle 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı atılmış ve dipte kalan pellet üzerine 37°C sıcaklığa getirilen hipotonik çözeltilerden 5-6 ml yavaş yavaş eklenmiştir. Hipotonik çözeltisi eklenen tüpler 37°C'ye ayarlanmış etüvde 25 dk bekletilmiş ve süre sonunda tekrar 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantı atılan tüpler içerisine taze olarak hazırlanan ve -20°C bekletilen soğuk tespit çözeltilerinden 7 ml ilave edilmiştir. Daha sonra tekrar 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve yine süpernatant kısmı atılmıştır. Tespit çözeltisi ve ardından yapılan santrifüj uygulaması berrak bir görünüm elde edilinceye kadar yaklaşık 3 defa tekrarlanmış ve en son tüplerdeki süpernatantlar atılmıştır. Kalan pellet pipetaj yapılarak temizlenmiş ve -20°C'de tespit çözeltisi içerisinde bekletilen lamalara damlatılmıştır. Damlalar birbirinin üzerine gelmeden lama iyice yayılmasına dikkat edilerek yaklaşık 20-25 cm yükseklikten bırakılmıştır. Hazırlanan preparatlar boyama öncesi kurutulmuştur. Kuruyan preparatlar 80 ml Giemsa buffer içerisine 4 ml Giemsa boyası eklenerek hazırlanan çözeltide yaklaşık 15-17 dk bekletildikten sonra musluk suyundan geçirilip oda sıcaklığında kurutulduktan sonra incelemeye hazır hale getirilmiştir (Fenech, 2000).

### 2.3. Mikronükleus Preparatlarının Mikroskopik İncelemesi

Hazırlanmış olan preparatlar binoküler ışık mikroskopunda önce 10'luk sonra 40'luk objektif ile incelenmiş ve her uygulama grubu için hazırlanan preparatlarda 1000 adet binükleer (iki nükleuslu) hücre sayılmıştır. Binükleat hücrelerde de 1, 2 ya da daha fazla mikronükleus içerenler sayılarak kaydedilmiştir (Şekil 3a-d).

### 2.4. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ile MN frekansı ve nükleer bölünme indeksi (NBİ)'ne ait istatistiksel analizler için, SPSS 13.0 programı kullanılmıştır. Kontrol ve uygulama grupları arasındaki karşılaştırmalar için tek değişkenli varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testleri uygulanmıştır.

## 3. BULGULAR

GUA ve ABA terpenlerinin doz-süre etkileşimine bağlı olarak genotoksik etkili olup olmadığı belirlenmesi için yapılan bu çalışmada, insan periferik kan kültürü kullanılmıştır. Kısa süreli genotoksisite testlerinden birisi olan MN testi için terpenlerin dört farklı konsantrasyonu (25, 50, 100 ve 200 ppm) protokole uygun olarak kan kültürlerine ilave edilmiştir (Fenech, 2000). Elde edilen tüm veriler Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir. Distile su ve DMSO negatif kontrol grupları için hazırlanan preparatlarda binükleat hücrelere (BNH) ait sırasıyla 7 ve 8 MN sayılmıştır. Bu grupların MN yüzdeleri de distile su için  $0,7 \pm 0,17$  ve DMSO için  $0,8 \pm 0,39$  olarak hesaplanmıştır. EMS pozitif kontrol grubunda ise 1000 BNH için toplam 43 MN gözlenmiştir. Bunlar 35 BNH'de 1 MN, 5 BNH'de 2 MN ve 3 BNH'de de 3 MN olarak tanımlanmıştır (Şekil 3a-d). MN yüzdesi de  $4,2 \pm 1,16$  olarak hesaplanmıştır (Tablo 1). Elde edilen bu verilere göre negatif kontrol grupları arasında istatistiki olarak fark bulunmamaktadır ( $P > 0,05$ ). Ancak negatif ve pozitif kontrol grupları arasındaki fark  $P < 0,05$  düzeyinde önemlidir.

Genotoksik etkili olup olmadığı belirlenmeye çalışılan terpenlerin tüm uygulama gruplarına ait veriler, DMSO negatif kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. GUA terpeninin 25, 50 ve 100 ppm uygulama gruplarında sırasıyla toplam 9, 15 ve 19 MN sayılmış ve % MN değerleri de yine sırasıyla  $0,9 \pm 0,25$ ,  $1,5 \pm 0,12$  ve  $1,9 \pm 0,08$  olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiki değerlendirmeler sonucu DMSO kontrol grubu ile 25 ppm GUA uygulaması arasındaki fark önemsizken ( $P > 0,05$ ) 50 ve 100 ppm uygulama grupları arasındaki fark  $P < 0,05$  düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 1). Ancak GUA'nın en yüksek konsantrasyonu olan 200 ppm'de MN incelemesi için yeterli sayıda hücre elde edilememiştir. Bu da 200 ppm GUA'nın doz artışına bağlı olarak sitotoksik etkisinin göstergesi olarak kabul edilebilir.

Sitotoksik etkinin belirlenmesi için hesaplanan nükleer bölünme indeksine (NBİ) ait değerler distile su negatif kontrol grubunda  $1,52 \pm 0,11$  ve DMSO negatif kontrol grubunda  $1,54 \pm 0,17$  iken EMS pozitif

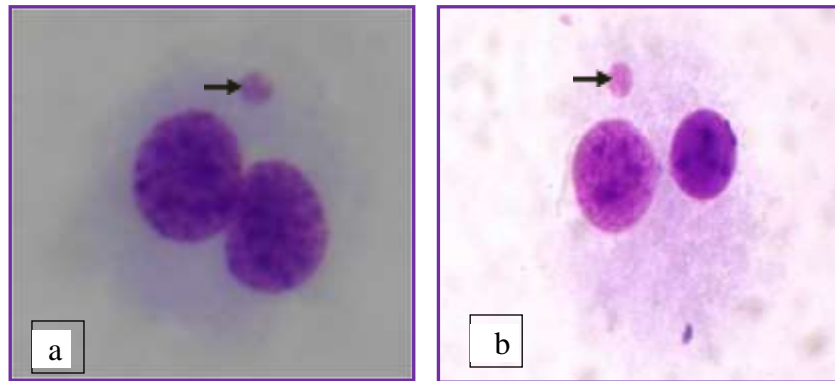
kontrol grubunda  $1,29 \pm 0,013$ 'dür. NBİ değerleri bakımından negatif kontrol grupları arasında herhangi bir fark bulunmazken negatif ve pozitif kontrol grupları arasındaki fark  $P < 0,05$  düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 1).

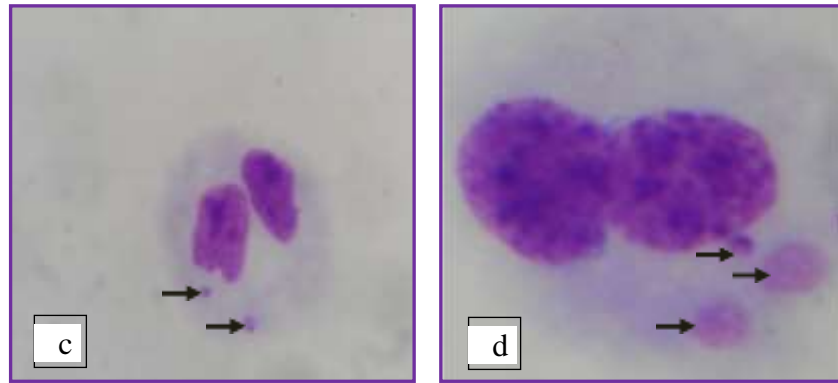
GUA uygulamalarına ait NBİ değerleri de 25, 50, 100 ppm için hesaplanmış ve bu değerler sırasıyla  $1,31 \pm 0,012$ ,  $1,21 \pm 0,012$  ve  $1,12 \pm 0,02$  olarak bulunmuştur. NBİ değerleri bakımından konsantrasyon artışına bağlı olarak gözlenen bu düşüş, hem tüm uygulama grupları arasında hem de DMSO kontrol grubuna göre  $P < 0,05$  düzeyinde önemlidir (Tablo 1).

Tablo 1: Guaiazulen uygulama gruplarına ait MN bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları

Uygulama Grupları	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			%MN	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
		1'li	2'li	3'lü		
Distile Su	1000	7	-	-	$0,7 \pm 0,17^d$	$1,52 \pm 0,11^a$
DMSO (%1)	1000	8	-	-	$0,8 \pm 0,39^d$	$1,54 \pm 0,17^a$
EMS (1 ppm)	1000	35	5	3	$4,2 \pm 1,16^a$	$1,29 \pm 0,013^b$
25 ppm GUA	1000	9	-	-	$0,9 \pm 0,25^d$	$1,31 \pm 0,012^b$
50 ppm GUA	1000	13	2	-	$1,5 \pm 0,12^c$	$1,21 \pm 0,012^c$
100 ppm GUA	1000	17	1	1	$1,9 \pm 0,08^b$	$1,12 \pm 0,02^d$
200 ppm GUA	1000	-	-	-	-	-

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasında fark  $P < 0,05$  düzeyinde önemlidir.





Şekil 3: Binükleat hücrelerde; a ve b) 1'li MN, c) 2'li MN, d) 3'lü MN (10x40)

Genotoksik etkisi araştırılan bir diğer terpen olan ABA için de aynı konsantrasyonlar ile çalışılmış ve 25, 50, 100 ve 200 ppm uygulama gruplarında sırasıyla 1'li, 2'li ve 3'lü olmak üzere toplam 8, 11, 14 ve 16 MN görülmüştür (Tablo 2, Şekil 3a-d). MN sayısına göre hesaplanan % MN değerleri de yine sırasıyla  $0,8 \pm 0,33$ ,  $1,1 \pm 0,11$ ,  $1,4 \pm 0,08$  ve  $1,6 \pm 0,06$ 'dır. Yapılan istatistiki analizlerde DMSO kontrol grubuna göre 25 ppm ABA uygulama grubu hariç diğer üç uygulama grubuna ait değerler  $P < 0,05$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Yine tüm ABA uygulama gruplarına ait NBİ değerleri de hesaplanmış ve distile su ile DMSO kontrol gruplarında  $1,52 \pm 0,11$  ve  $1,54 \pm 0,17$  olarak hesaplanan NBİ, uygulama gruplarında  $1,23 \pm 0,17$ 'den  $1,07 \pm 0,06$ 'ya kadar gerilemiştir (Tablo 2). 25, 50, 75 ve 100 ppm uygulama grupları için hesaplanan bu değerler DMSO kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0,05$ ).

Tablo 2: Abietik asit uygulama gruplarına ait MN bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları

Uygulama Grupları	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			%MN	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
		1'li	2'li	3'lü		
Distile Su	1000	7	-	-	$0,7 \pm 0,17^d$	$1,52 \pm 0,11^a$
DMSO (%1)	1000	8	-	-	$0,8 \pm 0,39^d$	$1,54 \pm 0,17^a$
EMS (1 ppm)	1000	35	5	3	$4,2 \pm 1,16^a$	$1,29 \pm 0,013^b$
25 ppm GUA	1000	8	-	-	$0,8 \pm 0,33^d$	$1,23 \pm 0,17^c$
50 ppm GUA	1000	9	2	-	$1,1 \pm 0,11^c$	$1,18 \pm 0,017^d$
100 ppm GUA	1000	12	1	1	$1,4 \pm 0,08^b$	$1,07 \pm 0,06^e$
200 ppm GUA	1000	14	1	1	$1,6 \pm 0,06^b$	$1,24 \pm 0,02^c$

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasında fark  $P < 0,05$  düzeyinde önemlidir.

#### 4. TARTIŞMA

Bitkilerden doğal olarak elde edilip hem bilimsel hem de ekonomik yönden değerlendirilen terpenlerin, ilaç hammaddesi ve pigment olarak eczacılıkta, katkı maddesi, lezzet verici ve boya olarak gıda üretiminde, pestisit olarak ziraat ve hayvancılıkta, renk ve koku verici madde olarak da kozmetik sektöründe kullanıldıkları bilinmektedir (Hammer ve ark., 1999; Mouhssen, 2004). Ayrıca farmakolojik özellikleri incelenerek aromaterapi ve fitoterapi alanında da kullanılabilen terpenlerin, çeşitli bio-aktiviteleri nedeniyle diyabet, damar tıkanıklığı, alzheimer, kanser gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavisinde

kullanımının yaygın olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Kırbağ ve Bağcı, 2000; Arıca, 2017). Ancak terpenlerin toksik, genotoksik ve mutajenik etkili olabileceği de belirlenmiştir (Gomes-Carneiro ve ark., 1989; Franzios ve ark., 1997; Stammati ve ark., 1999; İpek ve ark., 2005).

Literatürde terpenlerin genotoksik özelliklerini belirlemeye yönelik daha önce yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak çalışmalarımızda kullandığımız ABA diterpeni ve GUA seskiterpeninin neden olduğu mikronükleus uyarımına ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle elde ettiğimiz sonuçlar, daha önce farklı terpenler ile yapılan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılacaktır. Şöyle ki; Dizel ağacı olarak da bilinen *Copaifera langsdorffii*, tropikal bir yağmur ormanı ağacıdır. Bu bitkiden elde edilen ve GUA gibi bir seskiterpen olan kopaenin, yüksek konsantrasyonlarda (200 ve 400 mg/mL) insan lenfosit hücrelerinde proliferasyonu baskılamakta, yine aynı uygulama gruplarında membran hasarı ile hücre ölümleri meydana gelmektedir (Meky ve ark., 2001; Turkez ve ark., 2014). Cardoso ve ark., (2017)'na göre, *Copaifera* (baklagiller)'den elde edilen ve bir diterpen olan kaurenoik asit, mide kanseri ve normal mide mukoza hücre (MNPO1) hatlarında DNA hasarını indükleyerek genotoksik aktiviteyi ve özellikle mikronükleus frekansını doz artışına bağlı olarak artırmaktadır. Yine bir seskiterpen olan lynnopholid insan lenfositlerde (Canalle ve ark., 2001), *Pteridium aquilinum* (kartal eğreltisi)'den elde edilen ptaquilosid seskiterpeni de Çin hamsteri akciğer hücre hattında (CHL) 4,5 µg/mL gibi düşük dozlarda bile kromozom aberasyonlarına sebep olmuştur (Matsuoka ve ark., 1989). *Casearia sylvestris* (söğütgiller)'den elde edilen kleradon diterpeninin fare kan hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda (50 ve 75 mg/kg) DNA hasarına yol açarak MN frekansında artışa neden olduğu da Oliveira ve ark., (2009) tarafından gözlenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları bizim bulgularımız ile son derece uyumludur.

Timol ve karvakrol gibi terpenlerin de genotoksitesini belirlemek için daha önce yapılan bir çalışmada, sıçan kemik iliği hücreleri kullanılmış ve farklı dozlarda karvakrol ve timol terpenlerinin yapısal ve toplam kromozom anormalliklerini önemli ölçüde uyardıkları tespit edilmiştir (Azirak and Rencüzoğulları, 2008). Bu iki terpen tüm uygulama gruplarında mitotik indeksi de doza bağlı olarak azaltmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada özellikle gıdaları mikrobiyal kontaminasyonlardan korumak için kullanılan ve karanfil, kekik, tarçın, zencefil gibi kolay erişilebilir bitkilerden elde edilen timol, gingerol, öjenol, mirsen, metil öjenol gibi çeşitli terpenlerin köpek kemik iliği mezenkimal hücreleri ve enterosit hücreleri (ince bağırsak mukozasının epitelinde bulunan emme hücreleri)'nde toksik etkili olduğu Ortega ve ark., (2016) tarafından belirlenmiştir. Eisen ve ark., (2004)'na göre, gerek gıdalara lezzet vermek için gerekse insanlarda dental analjezik olarak kullanılan öjenol, beta-karyofilen, metil öjenol ile humulen gibi terpenler de konsantrasyon artışına bağlı olarak karaciğer yetmezliğine sebep olabilmektedir. Öjenolün Caco-2 hücresinde (insan epitel kolorektal adenokarsinom hücresi/kolon kanseri hücresi) toksik (Slamenova ve ark., 2009), fare kemik iliğinde de tümör oluşumlarını indükleyici etki gösterdiği bildirilmiştir (Ding ve ark., 2011). Togar ve ark., (2015b), gıda ve kozmetik sektörlerinde kullanılan guaiazulen terpeninin farklı konsantrasyonlarının (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 400 mg/L) nöron hücrelerinde total antioksidan seviyesini azaltırken total oksidan seviyesini artırdığını bildirmiştir. Yine aynı araştırmacıların bir başka çalışmasında da farklı konsantrasyonlarda uygulanan (0-400 µg/ml<sup>-1</sup>) guaiazulenin insan periferik lenfosit hücrelerinde sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir (Turkez ve ark., 2014).

Hücrelerdeki genetik hasarın dolaylı göstergesi olarak değerlendirilen MN testi, fiziksel veya kimyasal ajanların, çevresel kirleticilerin, gıda katkı maddelerinin mutajenik, karsinojenik ve genotoksik etkili olup olmadığının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan kısa süreli biyo-izleme testi olarak tanımlanmaktadır. Fiziksel ya da kimyasal uyarılar mitotik döngü esnasında mekanizmayı değiştirerek örneğin; G1 fazında replikasyon enzimlerini ve tübülün proteinlerini, S fazında DNA sentezini ve iğ ipliklerini inhibe ederek ya da G2 aşamasının bloke edilmesi ile bir sonraki bölünme fazlarına geçebilen hücre sayısında azalmaya neden olarak (nükleer bölünme indeksinin azalması) genotoksik etkilerini gösterirler. Uyarılara bağlı olarak hücre siklusunda gözlenebilecek bu genotoksik etkiler, kromozomal aberasyonları (KA) da tetikleyebilir. KA'ların temel nedeni kromozom veya kromatit tipi kırılmalar ile geç kalmış (kalgın) kromozomlardır. Mitoz bölünme esnasında iğ ipliklerinde meydana gelebilecek hasarlar, sentromer oluşumunda ya da sentromer bölünmesinde gözlenebilecek hatalar, kromozomların iğ ipliğine tutunamamasına sebep olmaktadır. Özellikle tam bir kromozom kaybının meydana gelmesi sayısal KA'yı tetikler (anojenik etki) ve sonuçta anöploid hücreler meydana gelir. Kromozom veya kromatit tipi kırılmalar ise çoğunlukla asentrik fragmentlerin oluşumunu tetikleyerek klastojenik etkiye sebep olurlar. Bölünme sırasında ister anojenik etki ile tam bir veya birkaç kromozom kaybı olsun ister klastojenik etki ile kromozomal segment kayıpları meydana gelsin tümü genotoksik etki ile MN oluşumuna neden olmaktadır. Sitotoksik etki de NBI'de düşüşe sebep olmaktadır.

Sunulan bu çalışmadan elde edilen tüm veriler, her iki terpenin de konsantrasyon artışına bağlı olarak yukarıda belirtilen hücre bölünme mekanizmalarında değişikliklere neden olarak genotoksik ve sitotoksik etkiler oluşturduğunu göstermiştir. Binükleat hücrelerde gözlemiş olduğumuz 1, 2 veya 3 MN oluşumu, artan konsantrasyona bağlı olarak GUA ve ABA terpenlerinin anojen ya da klastojen özelliğe sahip olduğunu/olabileceğini düşündürmektedir. Tablo 1 ve Tablo 2’de terpen uygulama gruplarında gözlenen %MN oranında kontrol gruplarına göre gözlenen artış bizim bu görüşümüzü destekler niteliktedir. Bu sonuçlara göre “somatik hücrelerde gözlenen MN sayısındaki artış, ABA ve GUA terpenlerinin genomik kararsızlıkları uyardığının göstergesidir” diyebiliriz.

#### KAYNAKLAR

- Ahıskaloğlu, A. (2007). *Anemone narcissiflora* bitkisinin karakterizasyonu ve biyolojik aktivitesinin incelenmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Andersen, F. A. (1999). Final report on the safety assessment of azulene. *International Journal of Toxicology*, 18, 27–32.
- Arıca, Ş.Ç. (2017). Yaşlanma ve algerin anti-gerontolojik etkileri. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34 (4), 469-474.
- Azirak, S., Rencüzoğulları, E. (2008). The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 23 (6), 728-735.
- Briksin, D.P. (2000). Medicinal plants and phytomedicines, linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, 124, 507–514.
- Canalle, R., Burim, R.V., Lopes, C.J.L., Takahashi, C.S. (2001). Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpene lactone lynchnopholide in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Detection and Prevention*, 25 (1), 93-101.
- Cardoso, P.C.D.S., Rocha, C.C.A.M.D., Leal, M.F., Bahia, M.D.O., Alcantara, D.D.F.A., Santos, R.A.D., Gonçalves, N.D.S., Ambrosio, S.R., Cavalcanti, B.C., Nunes, C.A.M., Pessoa, C.D.O., Burbano, R.M.R. (2017). Effect of diterpenoid kaurenoic acid on genotoxicity and cell cycle progression in gastric cancer cell lines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 772-780.
- Cazarolli, L.H., Zanatta, L., Alberton, E.H., Figueiredo, M.S., Folador, P., Damazio, R.G., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R. (2008). Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8 (13), 1429–1440.
- Cushnie, T.P., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5), 343–356.
- Cushnie, T.P., Lamb, A.J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38 (2), 99–107.
- Çelik, H., Uysal H. (2019). Stimulation of longevity toxicity based on chronic application of terpenes. *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences 28-29 June Ankara, Türkiye*.
- Dağcı, E.K., Dığrak, M. (2005). Bazı meyve ekstraktlarının antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8(2), 1-7.
- Ding, W., Lev, D.D., Bishop, M.E., Lyn-Cook, L.E., Kulkarni, R., Chang, C.W., Aidoo, A., Manjanatha, M.G. (2011). Methyl Eugenol genotoxicity in the Fischer 344 rat using the comet assay and pathway-focused gene expression profiling. *Toxicology Science*, 123, 103– 112.
- Eisen, J.S., Koren, G., Juurlink, D.N., Ng, V.L. (2004). N-acetylcysteine for the treatment of clove oil-induced fulminant hepatic failure. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology*, 42, 89– 92.



- Erdoğan, E.A. (2012). Using fields of plant essential oils and potential genetic effects. *Lokman Hekim Journal*, 2 (2), 21-24.
- Evert, R.F., Eichorn, S.E. (2016). Raven Bitki Biyolojisi. *Çeviri: İsmail Türkan, Palme Yayınevi*.
- Fallarero, A., Skogman, M., Kujala, J., Rajaratnam, M., Moreira, V.M., Yli-Kauhaluoma, J., Vuorela, P. (2013). (+) Dehydroabietic acid, an abietane-type diterpene, inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (6), 12054-12072.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455 (1-2), 81-95. Fernandez, M.A., Tornos, M.P., Garcia, M.D., de las Heras, B., Villar, A.M., Saenz, M.T. (2001). Anti-inflammatory activity of abietic acid a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 867-872.
- Fiori, J., Teti, G., Gotti, R., Mazzotti, G., Falcon, M. (2011). Cytotoxic activity of guaiazulene on gingival fibroblasts and the influence of light exposure on guaiazulene-induced cell death. *Toxicology in Vitro*, 25, 64-72.
- Franzios, G., Mirosou, M., Hatziapostolou, E., Kral, J., Zacharias, G.S., Mavragani-Tsipidou, P. (1997). Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (7), 2690-2694.
- Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (1), 116-134.
- Gomes-Carneiro, R., Felzenszwalb, I., Paumgarten, F.J. (1989). Mutagenicity testing (+) camphor, 1,8 cineole, citral, citronellol, (-) menthol and terpineol with the *Salmonella* microsome assay. *Mutation Research*, 416, 129-136.
- Guarrera, M., Turbino, L., Rebora, A. (2001). The anti-inflammatory activity of azulene. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*, 15, 486-7.
- Hammer, K. A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- İpek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoğlu, M., 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., 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.
- Kılıç, A. (2005). Bitkisel kaynaklı bazı uçucu yağ ve monoterpenlerin olası genotoksik etkilerinin araştırılması. Anadolu Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Kırbağ, S., Bağcı, E. (2000). *Picea abies* (L.) Karst. ve *Picea orientalis* (L.) Link uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma. *Journal of Quafqaz Universty*, 3 (1), 183-1882.
- Manner, S., Skogman, M., Goeres, D., Vuorela, P., Fallarero, A. (2013). Systematic exploration of natural and synthetic flavonoids for the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10), 19434-19451.
- Matsuoka, A., Hirosawa, A., Natori, S., Iwasaki, S., Sofuni, T., Jr, MS. (1989). Mutagenicity of ptaquiloside, the carcinogen in bracken, and its related illudane-type sesquiterpenes: II. Chromosomal aberration tests with cultured mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 215 (2), 179-185.
- Meky, F.A., Hardie, L.J., Evans, S.W., Wild, C.P. (2001). Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. *Food Chemical Toxicology*, 39, 827-836.

- Mouhssen, L. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
- Oliveira, A.M.D., Santos, A.G.D., Santos, R.A.D., Csipak, A.R., Olivato, C., Silva, I.C.D., Freitas, M.B.D., Bassi, C.L., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Silva, D.H.S., Sakamoto-Hojo, E.T., Takahashi, C.S., Soares, C.P. (2009). Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. *Mutagenesis*, 24 (6), 501-506.
- Ortega, M.T., Jeffery, B., Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N.A. (2016). Toxicological effects of pet food ingredients on canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and enterocyte-like cells. *Journal of Applied Toxicology*, 36 (2), 189-98.
- Orunç, L., Uysal, H. (2018). Bir çeşit sekonder metabolit olan stigmasterol ömür uzunluğu üzerine ketvurucu olabilir mi? *EurasianBioChem 26-27 April, Ankara, Türkiye*.
- Osbourn, A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*, 8, 1821– 1831.
- Peng, G., Roberts, J.C. (2000). Solubility and toxicity of resin acids. *Water Research*, 34 (10), 2779-2785.
- Slamenova, D., Horváthová, E., Wsólóvá, L., Sramková, M., Navarová, J. (2009). Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutation Research*, 677, 46– 52.
- Sökmen, A., Gürel, E. (2001). Sekonder metabolit üretimi. *Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya*, 211-261.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.L., Wright, A. (1999). Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 813-823.
- Togar, B., Çelik, K., Türkez, H. (2015a). *In vitro* cytotoxic, genotoxic and antioxidant/oxidant effects of guaiazulene on human lymphocytes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58 (1), 61-67.
- Togar, B., Turkez, H., Hacimuftuoglu, A., Tatar, A., Geyikoglu, F. (2015b). Guaiazulene biochemical activity and cytotoxic and genotoxic effects on rat neuron and N2a neuroblastom cells. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4 (1), 29–33.
- Turkez, H., Togar, B., Tatar, A., Geyikoglu, F., Hacimuftuoglu, A. (2014). Cytotoxic and cytogenetic effects of a-copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. *Biologia*, 69, 936–42.
- Turkez, H., Çelik, K., Toğar, B. (2014). Effects of copaene, a tricyclic sesquiterpene, on human lymphocytes cells *in vitro*. *Cytotechnology*, 66 (4), 597–603.
- Uysal, H., Orunç H. (2018). Retinol-induced aging in female and male populations of *Drosophila melanogaster* Oregon R (wild-type). *International Symposium Ecology 19 - 23 June, Kastamonu, Türkiye*.
- Verpoorte, R., Heijden, R., Hoge, J.H.C., Hoopen, H.J.G. (1994). Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 2307-2310.
- Wang, L., Yan, J., Fu, P., Parekh, K., Yu, H. (2003). Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene and guaiazulene. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 530, 19-26.
- Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-κB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 107 (2), 135–42.