



## 'Skualen' Triterpeninin Somatik Mutasyonlar Üzerine Etkisinin *Drosophila melanogaster*'de *In vivo* Kanat Benek Testi ile Araştırılması

Hatice ÇELİK<sup>1</sup>, Handan UYSAL<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı 25240 Erzurum, <sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 25240 Erzurum

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-2531-6020>, <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-4290-8223>,

✉: [hauysal@atauni.edu.tr](mailto:hauysal@atauni.edu.tr)

### ÖZET

Sekonder metabolitlerin triterpenler grubuna ait olan ve bitkiler tarafından sentezlenen skualen (SKU) terpeni, antioksidan, antienflamatuar, antibakteriyel ve antikanserojen özellikleri nedeniyle kozmetik, ilaç ve gıda endüstrisi gibi farklı alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. SKU, alternatif tıp yöntemlerinde de sahip oldukları bioaktiviteler nedeniyle tercih edilmektedir. Bu çalışmada, farklı birçok alanda kullanılan ve temas ya da oral yollarla vücuda alınan SKU'nun doz-süre etkileşimine bağlı olarak olası genotoksik etkileri araştırılmıştır. Genetik alanında yapılan araştırmalarda önemli bir model organizma olan *Drosophila melanogaster*'in yabancıl ve mutant soyları kullanılmaktadır. SKU'nun genotoksik etkisi somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile belirlenmiş ve *Drosophila melanogaster*'in *multiple wing hair (mwh)* ve *flare (flr<sup>3</sup>)* mutant soyları kullanılmıştır. Bu amaçla SKU'nun farklı konsantrasyonlarını (50, 100, 200 ve 400 ppm) içeren uygulama gruplarına ait verilerin analizi dimetilsülfoksit (DMSO) negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiki olarak değerlendirilmiştir. SMART sonucundan elde edilen verilere göre; klon indüksiyon frekansı DMSO kontrol grubunda 0.57 iken bu değer doz artışına bağlı olarak 50 ppm için 0.41; 100 ppm için 0.52; 200 ppm için 0.93 ve 400 ppm içinde 1.30 olarak belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekansındaki bu artış SKU'nun somatik mutasyonları uyardığı ve genotoksik etki sergilediğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.

### Genetik

### Araştırma Makalesi

### Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 14.04.2022

Kabul Tarihi : 20.10.2022

### Anahtar Kelimeler

*Drosophila melanogaster*

Genotoksisite

Somatik mutasyonlar

Terpenler

## Investigation of the Effect of 'Squalene' Triterpene on Somatic Mutations in *Drosophila melanogaster* by *In vivo* Wing Spot Test

### ABSTRACT

Squalene (SKU) terpene, which belongs to the triterpenes group of secondary metabolites and is synthesized by plants, is frequently used in different fields such as cosmetics, medicine and food industry due to its antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and anticarcinogenic properties. SKU, are also preferred in alternative medicine methods because of their bioactivity. In this study, the possible genotoxic effects of SKU, which is used in many different areas and taken into the body by contact or oral route, were investigated depending on the dose-time interaction. Wild and mutant strains of *Drosophila melanogaster*, an important model organism, are used in research in the field of genetics. The genotoxic effect of SKU was determined by somatic mutation and recombination test (SMART) and *multiple wing hair (mwh)* and *flare (flr<sup>3</sup>)* mutant strains of *Drosophila melanogaster* were used. For this purpose, the analysis of the data of the application groups containing different concentrations of SKU (50, 100, 200 and 400 ppm) was statistically evaluated by comparing them with the dimethylsulfoxide (DMSO) negative control group. According to the data obtained from the SMART result; while the clone induction frequency was 0.57 in the DMSO control group, this value was 0.41 for 50 ppm depending on the dose increase; 0.52 for 100 ppm; 0.93 for 200 ppm and 1.30 for 400 ppm.

### Genetic

### Research Article

### Article History

Received : 14.04.2022

Accepted : 20.10.2022

### Keywords

*Drosophila melanogaster*

Genotoxicity

Somatic mutation

Terpenes

This increase in clone induction frequency can be considered as an indication that SKU induces somatic mutations and exhibits genotoxic effects.

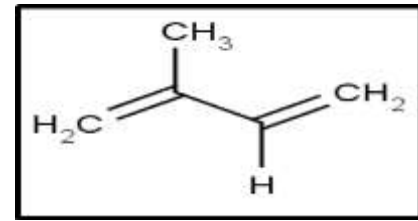
- Atf Şekli:** Çelik, H., & Uysal, H., (2023) 'Skualen' Triterpeninin Somatik Mutasyonlar Üzerine Etkisinin *Drosophila melanogaster*'de *In vivo* Kanat Benek Testi İle Araştırılması. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 26 (3), 477-486. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.1103555>
- To Cite :** Çelik, H., & Uysal, H., (2023). Investigation of the Effect of 'Squalene' Triterpene on Somatic Mutations in *Drosophila melanogaster* by *In vivo* Wing Spot Test. *KSU J. Agric Nat* 26 (3), 477-486. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.1103555>

## GİRİŞ

Bitkiler, canlılar için temel besin ve oksijen kaynağı olmasının yanı sıra tarihin çok eski devirlerinden beri çeşitli hastalıklara karşı tedavi edici olarak da kullanılmaktadır. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımlarının antik çağlara dayandığı, Çin, Hindistan, Mezopotamya, Amerika, Afrika ve Roma gibi farklı coğrafyadaki kültürlerin, kendi tarihsel gelişimleri içerisinde endemik bitkileri farklı şekillerde uyguladıkları bilinmektedir (Eichorn & Evert, 2016). Eski Mısır, Yunan ve Roma'da temelleri atılmış olan bitkilerle tedavi yöntemleri yüzyıllar boyunca kullanılmış ve geliştirilmiştir. 19. ve 20. yüzyılda bitkisel tedaviye yönelime bağlı olarak bitki bileşenlerinin sahip oldukları aktiviteler detaylı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır (Erdoğan, 2012). Çeşitli araştırmacılara göre, şifalı bitkiler ya da tıbbi bitkiler olarak da tanımlanan bu tür bitkiler sahip oldukları bileşenler ile antienflamatuar, antioksidan, antimutajen gibi farklı bioaktiviteler sergilerler (Dorman ve ark, 2004; Clark, 2009; Moon ve ark., 2011; Erdoğan, 2012). Etkinlikleri belirlenmiş bitki bileşenlerinin yararlı etkilerinden faydalanmak için hangi dozlarda kullanılması gerektiğine dair bilgiler de yapılan bu çalışmalarda sunulmaktadır. Yine yapılan incelemeler, tıbbi bitkilerde bulunan fonksiyonel bileşenlerin sentetik yollarla elde edilenlere göre daha etkili olduğunu da göstermiştir (Öztürk ve ark., 2012).

Özellikle son yıllarda sentetik ürünlerin kullanımından uzaklaşmak isteyen kişilerin bioaktif bileşenlere sahip olan bitkilere ilgilerinin arttığı görülmektedir (Dağcı & Dığrak, 2005; Ahıskaloğlu, 2007). Bu bitki bileşenleri bitkilerin kök, çiçek, yaprak gibi kısımlarından elde edilen sekonder metabolitlerdir ve buldukları canlının yaşamsal işlevleri için birincil derece ilişkili olmamakla birlikte (Erdem & Eren, 2009) tuzluluk, UV ışınları, kuraklık gibi çevresel stres şartlarına uyum sağlamasında (Sökmen & Gürel, 2001), yabancı türlere karşı mücadelesinde (Verpoorte ve ark., 1999), bakteriyel ya da fungal patojenlere karşı geliştirilen savunma mekanizmalarında (Osborn, 1996), tozlaşma ve simbiyotik ilişkilerin kurulmasında rol almaktadırlar (Briksin, 2000). Bu metabolitler alternatif tıp dışında gıda, ilaç, kozmetik sanayi gibi farklı endüstriyel alanlarda da kullanılmaktadırlar.

Sekonder metabolitler içerisinde tanımlanan bileşenlerin en yaygın olanlarından birisi terpenlerdir. Terpenler izopren birimlerinden oluşurlar (Şekil 1) ve içerdikleri izopren birim sayısına göre monoterpen, seskiterpen, diterpen, triterpen tetraterpen ve politerpen olarak sınıflandırılırlar.

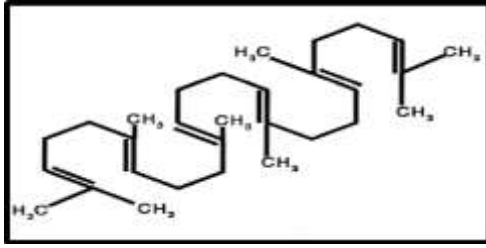


Şekil 1. İzopren biriminin yapısı  
Figure 1. Structure of the isoprene unit

Sekonder metabolitlerin bu grubu antialerjik, antioksidan, antienflamatuar, antimikrobiyal, antikanser ve antidiyare gibi aktiviteleri ile solunum, sinir, üriner ve özellikle karaciğer ile ilgili sindirim sistemi hastalıklarında, viral enfeksiyonlarda, onkoloji alanında ve immün sistemin güçlendirilmesinde farklı terpenler tercih edilmektedir (Güçlü & Yüksel, 2017). Hem tıbbi olarak hem de farklı endüstriyel alanlarda kullanılan Skualen (SKU) metaboliti altı izopren biriminden (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>) oluşan bir triterpendir (Şekil 2). SKU, amarant çiçeği, zeytin, buğday tohumu, pirinç kepeği gibi farklı ürün gruplarından bitkisel kökenli olarak elde edilebildiği gibi köpekbalığı karaciğer yağında da bulunmaktadır. Farklı araştırmacılara göre, SKU antibakteriyel (Gupta ve ark., 2009), antihiperglisemik (Edwin ve ark., 2006), antifungal (Alanis-Garza ve ark., 2007), analjezik, antienflamatuar (Elumalai ve ark., 2012), antioksidan ve nöroprotektif (Rani ve ark., 2012) etkilere sahiptir. Ancak terpenlerin bu aktivitelerinden faydalanılabilmesi amacıyla hazırlanan tıbbi çay, standardize edilmiş şurup, tablet, kapsül draje, pomad, krem, şampuan, sabun olarak piyasada bulunan ürünlerin bilinçli ve uygun dozlarda kullanılması gerekmektedir.

Aksi takdirde istenmeyen durumlarla karşılaşılacağı de çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Calixto, 2000; Valerio & Gonzales, 2005). Ürünlerin içeriğinde bulunan farklı bitkisel bileşenlerin alerjik reaksiyon, mide rahatsızlıkları ve

baş ağrısı gibi bir takım yan etkilere sebep olabileceği, kişiler tarafından kullanılan ilaçlarla etkileşebileceği, ayrıca sürekli kullanım durumunda doz aşımına bağlı olarak terpenlerin toksik hatta genotoksik etkili olduğu da daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Morton ve ark., 1995; Shah ve ark., 1996; Saltan, 2012). Benzeri olumsuz etkiler SKU triterpeni için de gözlenmiş ve yüksek konsantrasyonlarda akut toksisiteye sebep olduğu Huang ve ark. (2009) tarafından gözlenmiştir.



Şekil 2. Skualenin kimyasal yapısı  
Figure 2. Chemical structure of squalene

Oldukça geniş bir şekilde endüstriyel alanda ve alternatif tıp yöntemlerinde tercih edilen terpenlerin olumsuz bioaktivitelerinin bulunduğu dair bilgilerden yola çıkılarak, model bir organizma olan *D. melanogaster*'de SKU'nun genotoksik etkili olup/olmadığı Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılmıştır.

## MATERYAL ve METOD

### Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada genotoksik etkilerinin belirlenmesi için kullanılan SKU triterpeni (2,6,10,15,19,23 heksametil-2,6,10,14,18,22-tetrakosaheksaen, Cas No: 111-02-4), SKU'nun çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO: % 99.5, CAS No. 67-68-5) ile mutajenik etkili olan ve genotoksisite çalışmalarında pozitif kontrol olarak tercih edilen etil metansülfonat (EMS: CAS No.62-50-0) Sigma-Aldrich Şirketi'nden (St Louis, Missouri, ABD), Drosophila Instant Medium (DIM, Formül 4-24) ise Carolina Biyolojik Tedarik Şirketi'nden (2700 York Road, Burlington, ABD) satın alınmıştır. Çalışma kapsamında Standart Drosophila besiyeri (SDB) ile kanat preparatlarının hazırlanması ve ergin bireylerin eterizasyonu için kullanılan agar agar, dietil eter, propionik asit, gliserol, kloral hidrat, arap zıkkı, entellan, etil alkol gibi kimyasal maddeler de yine Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) şirketinden temin edilmiştir.

### Kullanılan *Drosophila* Soyları

Mendel genetiği alanında sürdürülen genotoksisite çalışmaları, farklı model organizmalar ile yapılmaktadır. Bu organizmaların en önemlilerinden birisi olan *D. melanogaster* Meigen, 1830 (meyve/sirke sineği) Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji

Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uzun yıllardan beri kendileştirilmiş genetik olarak homozigot, hiçbir mutant karakter taşımayan yabancıl bir laboratuvar stoğudur. Bu çalışmada kullanılan mutant soylar ise *D. melanogaster*'in normal metabolik aktiviteye sahip *multiple wing hair* (*mwh*) ile *flare* (*flr<sup>s</sup>*) soylarıdır ve diğer yabancıl soylar gibi Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uzun yıllardan beri kendileştirilerek yaşatılmaktadır. *mwh* mutant soyunda bulunan *mwh* resesif geni, III. kromozomun telomere yakın kısmında (3-0.3) bulunmaktadır. *flr<sup>s</sup>* geni de yine III. kromozomda sentromere yakın (3-38.8) yer almaktadır ve bu gen homozigot resesif durumda embriyoda letaliteye sebep olduğu için ergin bireyler oluşmamaktadır. *flr<sup>s</sup>* geninin embriyonik letal etkisinden dengeleyici bir kromozom olan TM3 kromozomu ile heterozigotluk sağlanarak korunmakta ve embriyonun kanat imajinal disklerinden mutant kanat hücrelerinin gelişimi sağlanmaktadır. Ayrıca dengeleyici TM3 kromozomunda bulunan BdS geni, mutant bireyin kanat kenarlarının testere dişi şeklinde fenotip göstermesine neden olmaktadır. Fenotipik olarak yuvarlak-kırmızı gözlü, uzun kanatlı ve kahverengi vücutlu olan mutant soylarda (Şekil 3a ve 3b) resesif belirleyici genler kanat kıllarının (trikom) şeklinde değişikliğe sebep olmaktadır. *mwh* geni, fenotipte normal kanat (Şekil 3a) ve hücre başına bir kanat kıllı yerine çoklu kanat kıllarını oluştururken (Şekil 4a) *flr<sup>s</sup>* geni sineklerin testere dişi şeklinde kanatlara (Şekil 3b) ve kanatlarındaki normal, düz ve uzun kıllar yerine körelmiş, amorfik kıl (Şekil 4b) oluşmasına sebep olmaktadır (Graf ve ark., 1998).

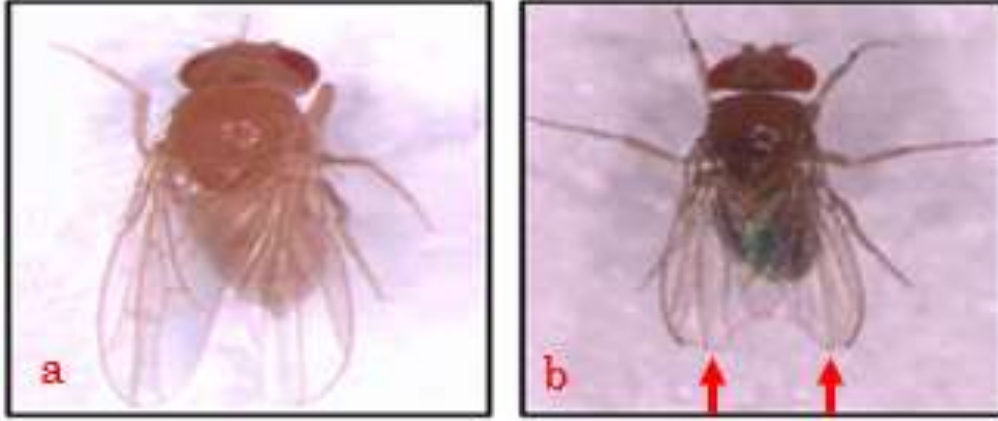
### Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinin Yapılışı (SMART)

Bu test için öncelikle *mwh* ve *flr<sup>s</sup>* mutant türlerine ait erkek ve dişi bireylerin sayısını artırmak için ön çaprazlamalar yapılmıştır. Hazırlanan kültür şişelerine *flr<sup>s</sup>* ve *mwh* türleri ayrı ayrı konulmuş ve çaprazlamalar gerçekleştirilmiştir. Çaprazlamalar sonucunda metamorfozu tamamlayan 1-3 günlük (72±4 saatlik) aynı yaşlı *flr<sup>s</sup>* ve *mwh* ergin bireyleri, 4'er saatlik periyotlar halinde henüz çiftleşmeden toplanmıştır. Daha sonra çalışma kapsamında kullanılacak olan trans-heterozigot larvaların elde edilmesi için 40 *flr<sup>s</sup>* dişi ve 40 *mwh* erkek kullanılarak yeni çaprazlamalar yapılmıştır.

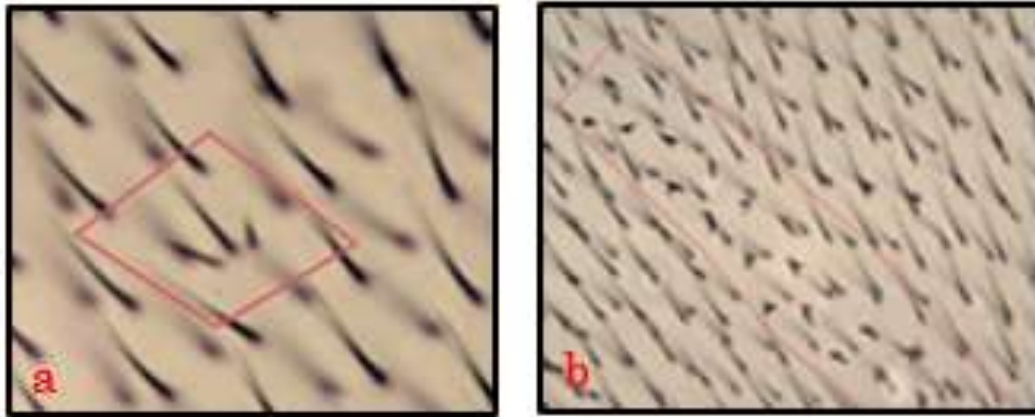
SMART için de iki farklı deney seti hazırlanmıştır. İlk deney setinde SKU'nun çözücüsü olan %1'lik DMSO ve distile suyla hazırlanan negatif kontrol grupları ile etil metansülfonat (1 ppm EMS) pozitif kontrol grubu bulunmaktadır. Diğer deney seti ise farklı konsantrasyonlarda SKU içeren (50, 100, 200 ve 400 ppm) uygulama gruplarıdır. Yapılan ön denemelerde 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. Kontrol ve uygulama gruplarına ait kültür şişelerine, 100'er üçüncü evre trans-heterozigot larva konulmuş ve larvalar başkalaşımını

tamamlayıp ergin birey haline gelinceye kadar ısıtmalı-soğutmali etüvlerde muhafaza edilmiştir. Larvalardan hayat devrini tamamlayıp ergin hale gelen bireyler normal kanatlı ve serrat kanatlı ayırımı yapılarak toplanmış ve kanat preparatlarının hazırlanması için %70'lik etil alkol içeren ependorf tüpleri içerisinde +4°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3a. *mwh* genotipli bireylerde normal kanat yapısı, b. *flr<sup>3</sup>* genotipli bireylerde testere dişi kanat yapısı (10x40)  
Figure 3a. Normal wing structure in individuals with *mwh* genotype, b. Sawtooth wing structure in individuals with *flr<sup>3</sup>* genotype (10x40)



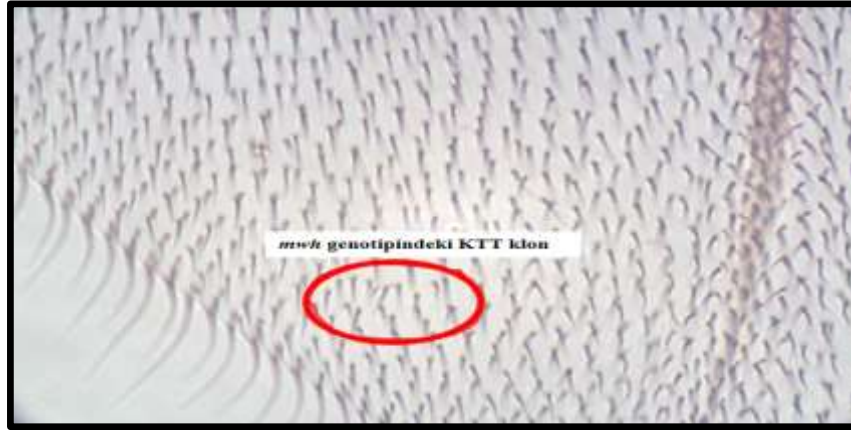
Şekil 4a. *mwh* genotipli bireylerde çoklu kanat kılları (10x100), b. *flr<sup>3</sup>* genotipli bireylerde körelmiş ve amorfik kanat kılları (10x40)  
Figure 4a. Multiple wing hairs in individuals with the *mwh* genotype (10x100), b. Amorphous wing hairs in individuals with *flr<sup>3</sup>* genotype (10x40)

Daha sonra ergin sinekler çukur lamda faure solüsyonuna alınarak binoküler mikroskop altında ince uçlu pensler ile onlara ait kanatlar vücuda bağlandığı yerden ayrılarak kanat preparatları hazırlanmıştır. 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. Tüm preparatlar Boeco marka digital kameralı trinoküler ışık mikroskobu ile incelenmiş ve belirlenen mutant hücre klonları tekli ve ikili benekler şeklinde gruplandırılmıştır. SMART yönteminden elde edilen

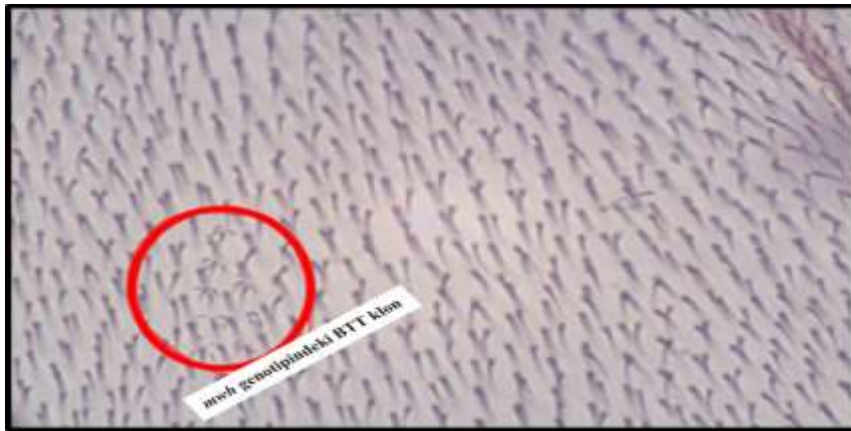
sonuçların istatistiksel analizi de Microsta bilgisayar programı ile yapılmıştır. Microsta ile hesaplanan orijinal ve alternatif hipotezlerin sonuçları, Frei & Würzler (1988)'in çoklu karar prosedürüne göre değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

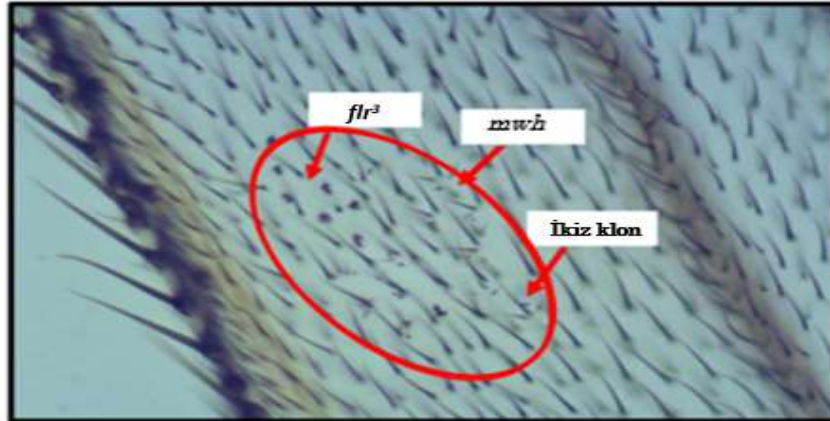
Çalışma kapsamında hem uygulama hem de pozitif ve negatif kontrol gruplarına ait preparatlar incelenerek mutant klonların tipleri ve sayıları kayıt altına alınmıştır. Gözlenen mutant klonlar *mwh* fenotipinde küçük tek tip (KTT) (Şekil 5), *flr<sup>3</sup>* veya *mwh* fenotipinde büyük tek tip (BTT) (Şekil 6) ve hem *mwh* hem de *flr<sup>3</sup>* hücrelerini birlikte içeren ikiz klonlardır (Şekil 7).



Şekil 5. Küçük tek tip *mwh* mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)  
Figure 5. Microscopic view of small single *mwh* mutant clones (10x40)



Şekil 6. Büyük tek tip *mwh* mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)  
Figure 6. Microscopic view of large single *mwh* mutant clones (10x40)



Şekil 7: İkiz mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)  
Figure 7. Microscopic view of twin mutant clones (10x40)

Yapılan incelemelerde distile su ve DMSO negatif kontrol gruplarında sırasıyla 8 ve 9 KTT, DMSO kontrol grubunda ise yalnızca 2 BTT gözlenirken hiç ikiz klon gözlenmemiştir. Distile su ve DMSO negatif kontrol gruplarında KTT ve BTT, ikiz, toplam  $\Sigma$  *mwh* ve  $\Sigma$  klon için gözlenen değerler birbiriyle karşılaştırıldığı zaman sonuç istatistiki olarak ya negatif (-) ya da önemsiz (i) etkili bulunmuştur. EMS pozitif kontrol grubunda ise tüm mutant klonların

sayısında artış gözlenmiştir ve bu sonuçlar negatif kontrol gruplarına ait sonuçlar ile karşılaştırıldığı zaman aradaki fark istatistiki olarak  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir (Çizelge 1).

SKU'nun uygulama gruplarına ait veriler ise DMSO negatif kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. SKU'nun en düşük uygulama grupları olan 50 ve 100 ppm'de normal kanat fenotipi için sırasıyla 8 KTT ve 10 KTT klon gözlenmiş ve yine sırasıyla  $\Sigma$  klon frekansları 0.10

ve 0.12 olarak bulunmuştur. Bu iki uygulama grubuna ait verilerin istatistiksel analiz sonuçları  $p>0.05$  düzeyinde negatif (-) ya da önemsiz etkili (i)'dir. Diğer bir uygulama grubu olan 200 ppm'de 17 KTT, 1 BTT klon olmak üzere toplam 18 mutant klon görülmüştür. En yüksek uygulama grubu olan 400 ppm'de ise toplamda 25 mutant klon incelenmiş olup ve bu klonların 21'i KTT, 3'ü BTT ve 1 tanesi de ikiz klondur. 200 ve 400 ppm uygulama gruplarının  $\Sigma$  klon frekansları ise sırasıyla 0.22 ve 0.31 olarak

belirlenmiştir. 200 ppm uygulama grubuna ait veriler, DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman KTT, BTT ve  $\Sigma mwh$  için aradaki fark önemsiz (i) etkili olarak değerlendirilmiştir ( $p<0.05$ ). 400 ppm uygulama grubuna ait KTT ve  $\Sigma mwh$  klon sonuçları DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman ise aradaki fark pozitif etkili (+) bulunmuştur. En düşük uygulama grubu olan 50 ppm'de KİF değeri 0.41 olup artan konsantrasyona bağlı olarak bu değer 400 ppm'de 1.30'a kadar yükselmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Skualen uygulama gruplarına ait SMART bulguları ve istatistiki analiz sonuçları  
Table 1. SMART findings and statistical analysis results of squalene application groups

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayı	KTT klon ( $m = 2$ )			BTT klon ( $m = 5$ )			İkiz klon ( $m = 5$ )			$\Sigma mwh$ klon ( $m = 2$ )			$\Sigma$ klon ( $m = 2$ )			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
<b>(<i>mwh/flr<sup>9</sup></i>) Normal kanat</b>																	
Distile su	80	8	(0.10)		0	(0.00)		0	(0.00)		8	(0.10)		8	(0.10)		0.41
DMSO (%1)	80	9	(0.11)	i	2	(0.02)	i	0	(0.00)	-	11	(0.13)	i	11	(0.13)	i	0.57
EMS (1 ppm)	80	24	(0.30)	+	8	(0.10)	i	6	(0.07)	+	32	(0.40)	+	38	(0.47)	+	1.97
50 ppm	80	8	(0.10)	i	0	(0.00)	-	0	(0.00)	-	8	(0.10)	i	8	(0.10)	i	0.41
100 ppm	80	10	(0.12)	i	0	(0.00)	-	0	(0.00)	-	10	(0.12)	i	10	(0.12)	i	0.52
200 ppm	80	17	(0.21)	i	1	(0.01)	i	0	(0.00)	-	18	(0.22)	i	18	(0.22)	i	0.93
400 ppm	80	21	(0.26)	+	3	(0.03)	i	1	(0.01)	i	24	(0.30)	+	25	(0.31)	+	1.30
<b>(<i>mwh/TM3</i>) Serrat kanat</b>																	
Distile su	80	7	(0.08)		0	(0.00)					7	(0.08)		7	(0.08)		0.36
DMSO (%1)	80	8	(0.1)	i	1	(0.01)	i				9	(0.11)	i	9	(0.11)	i	0.46
EMS(1 ppm)	80	19	(0.4)	+	10	(0.12)	+		Dengeleyici TM3		29	(0.36)	+	29	(0.36)	+	1.51
50 ppm	80	4	(0.05)	-	0	(0.00)	-		kromozomu varlığında <i>flr<sup>9</sup></i>		4	(0.05)	-	4	(0.05)	-	0.20
100 ppm	80	7	(0.08)	i	0	(0.00)	-		mutasyonu gözlenmez.		7	(0.8)	i	7	(0.08)	i	0.36
200 ppm	80	8	(0.10)	i	0	(0.00)	-				8	(0.10)	i	8	(0.10)	i	0.41
400 ppm	80	11	(0.13)	i	0	(0.00)	-				11	(0.13)	i	11	(0.13)	i	0.57

KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, No: mutant klon sayısı, Fr: mutasyon frekansı, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz, m: tesir faktörü.

Uygulama gruplarının serrat kanat fenotipine ait veriler incelendiğinde mutant klon sayısında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir artış olmadığı gözlenmiştir. Şöyle ki; en düşük uygulama grubu olan 50 ppm'de yalnızca 4 KTT klon, en yüksek uygulama grubu olan 400 ppm'de ise 11 KTT klon görülmüştür. Uygulama gruplarının hiç birisinde BTT gözlenmemiştir. Uygulama grupları ile DMSO kontrol grupları arasındaki fark KTT,  $\Sigma mwh$  klon ve  $\Sigma$  klon bakımından önemsiz etkili (i) bulunmuştur (Çizelge 1). Konsantrasyon artışına bağlı olarak her ne kadar mutant klon sayısında bir artış olsa da tüm uygulama gruplarına ait KTT, BTT klon tiplerinde sonuçlar negatif (-) ya da önemsiz etkili (i) olarak bulunmuştur. Serrat kanat fenotipine ait KİF değerleri ise sırasıyla 0.20; 0.36; 0.41 ve 0.57'dir (Çizelge 1).

## TARTIŞMA

Sekonder metabolitlerin bir grubu olan terpenler, farklı bitkilerden doğal olarak elde edilip hem bilimsel hem de ekonomik yönden değerlendirilmektedir. Terpenler 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 kozmetik sektöründe (Hammer ve ark., 1999; Mouhssen, 2004), farklı bioaktivitelerine göre de diyabet, damar tıkanıklığı, alzheimer, kanser gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Kırbağ & Bağcı, 2000; Arıca, 2017). Ancak terpenlerin doz-süre etkileşimine dikkat edilmeden, önerilen miktarların dışında kullanımlarına bağlı olarak toksik, genotoksik

ve mutajenik etkili olabileceği de birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Stammati ve ark., 1999; İpek ve ark., 2005). *Litsea cubeba* (dağ biberi)'nin içermiş olduğu neral, geranial, sitral ve limonen gibi metabolitler farelere oral olarak, deri ve solunum yoluyla uygulandığında mikronükleus oluşumuna ve kromozomal aberasyonlara sebep olmuştur (Luo ve ark., 2005). Maymun hücrelerine uygulanan kafur, okaliptol ve tujon terpenlerinin apoptoza, terpinen metabolitinin DNA kırılmalarına ve metil öjenolün de sıçanlarda karaciğer, akciğer, mesane, kemik iliği ya da böbrek dokusunda DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Ding ve ark., 2011). Monoterpenler grubuna ait olan ve boğmaca, öksürük, sinir sistemi zafiyeti, romatizma ve bağırsak hastalıklarına karşı özellikle çay olarak kullanılan timol ve karvakrol metabolitlerinin sıçan kemik iliği hücrelerinde yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerini uyardıkları ve mitotik indeksi doza bağlı olarak azalttıkları tespit edilmiştir (Azirak & Rencüzoğulları, 2008). Yine Büyükleyla ve Rencüzoğulları (2009), timolün yapısal kromozomal anormalliklerini, kardeş kromatid değişimlerini ve mikronükleus oluşumunu uyardığını, aynı zamanda replikasyon indeksini ve mitotik indeksi azaltarak sitotoksositeye neden olduğunu bildirmiştir.

*Dianthus caryophyllus* (karanfil), *Thymus vulgaris* (kekik), *Cinnamomum verum* (tarçın) ve *Zingiber officinale* (zencefil) gibi bitkilere ait timol, gingerol, öjenol, mirsen, metil öjenol terpenlerinin köpek kemik iliği mezenkimal hücreleri ve enterosit hücrelerinde (ince bağırsak mukozasının epitelinde bulunan emme hücreleri) toksik etki sergilediği Ortega ve ark. (2016) tarafından gösterilmiştir. Benzeri toksik etkiler öjenol, beta-karyofilen, metil öjenol ve humulen gibi terpenlerin, insanlar tarafından kullanımlarına (8-10 ml) bağlı olarak karaciğer yetmezliği şeklinde gözlenmiştir (Eisen ve ark., 2004). Tıbbi ve farmakolojik olarak çeşitli uygulamalarda kullanılan *Artemisia absinthium* (pelin otu) bitkisine ait tujon, timol, pinen, karyofilen gibi metabolitlerin *Saccharomyces cerevisiae* D7 suşunda mutajenik ve toksik etkili olduğu ayrıca mitokondriyal DNA'da mutasyona sebep olduğu da Bakkali ve ark. (2005) tarafından bildirilmiştir. Timolün fare beyin asetilkolinesteraz (AChE) enzimi üzerinde önemli bir artışa neden olduğu, özellikle 20 ve 40 mg/kg timol uygulanan farelerde sodyum-potasyum pompası (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPaz) aktivitesinin inhibe edildiği de belirlenmiştir (Baldissera ve ark., 2018).

Diterpenlerin bir çeşidi olan dehidroabietik asit, balıklarda karaciğer fonksiyon bozukluğu, hemoliz ve sarılığa neden olmuştur (Bushnell ve ark., 1985). Dehidroabietik asit ve abietik asitin olası ömür uzunluğu ve gelişim toksisitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, bu metabolitlerin artan konsantrasyona bağlı olarak (0.25-8 mg/L) *Daphnia magna* Straus, 1820 (su piresi)'de hayatta

kalma süresini kısalttığı, akut ve kronik toksisite geliştirdiği ve ayrıca total vücut büyüklüğünde küçülmenin meydana geldiği gözlenmiştir (Kamaya ve ark., 2005). Diğer bir diterpen çeşidi olan retinolün yüksek konsantrasyonlarda tüketilmesi sonucu karaciğerde enfeksiyon ve tümör oluşumu gibi metabolik bozukluklara neden olduğu Rajoshok ve Sumathi (2015) tarafından gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada da retinol ve abietik asitin toksik etki göstererek *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarının yaşam süresini kısalttığı belirlenmiştir (Uysal & Oruç, 2018; Çelik & Uysal, 2020).

Birçok sağlık ve kozmetik ürünlerinde doğal bir bileşen olarak kullanılan guazilen ve azulen seskiterpenlerinin *Salmonella typhimurium*'da mutajenik olduğu Struwe ve ark. (2011) tarafından bildirilmiştir. Guazilenin doz-süre etkileşimine bağlı olarak *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarında ömür uzunluğunu kısalttığı ve somatik mutasyonları uyararak genotoksik etki gösterdiği (Çelik & Uysal, 2019), yine guazilen ile abietik asitin insan lenfosit hücrelerinde mikronükleus frekansında artışa neden oldukları ve konsantrasyon artışına bağlı olarak sitotoksik ve genotoksik aktivite sergiledikleri de tespit edilmiştir (Çelik & Uysal, 2020). Edwards ve ark. (2016), astaksantin tetraterpeninin artan konsantrasyonuna bağlı olarak (40, 200, 1000 mg) dişi farelerde iyi huylu, hepatoselüler adenom oranında artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Azqueta ve Collins (2012) tarafından yapılan farklı bir çalışmada da astaksantin ve zeaksantin terpenlerinin pro-oksidan aktivite ile yüksek konsantrasyonlarda insan periferik hücrelerinde, fare, sıçan, beagle köpekleri ve bir çeşit kemirgen olan gerbil (*Pachyromys duprasi* Lataste, 1880)'de DNA hasarına neden oldukları gözlenmiştir.

Yapılan tüm bu çalışmalarda ortak görüş, farklı grup terpenlerin artan konsantrasyonu ve kullanım süresinin, oksidatif stresi ve genotoksik etkiyi uyardığı yönündedir (Chang ve ark., 2014). Vücut içerisinde bulunan ve canlı dokularda kontrollü ve sürekli olarak üretilen oksijen radikalleri ile antioksidanların normal düzeyde tutulabilmesi için antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Diğer birçok canlıda olduğu gibi *Drosophila*'da da katalaz, süperoksit dismutaz, indirgenmiş glutatyon, glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimleri oksidanları nötralize etmede yetersiz kaldığında, oksidan/antioksidan arasındaki denge oksidanların lehine bozulmaktadır. Ortaya çıkan bu durum da oksidatif stres olarak tanımlanan doku hasarına yol açmaktadır. Clarkson ve Thompson (2000)'a göre, lipid, protein, karbonhidrat ve nükleik asit gibi makromoleküllerde meydana gelen reaksiyonel hasarlar oksidatif strese sebep olmaktadır. Hücre yapısında serbest radikallerin neden olduğu lipid

peroksidasyonu sonucunda başlayan ve birbirini takip eden zincirleme reaksiyonlar ile organizmada oluşan hasarlar, hücresel düzeyde DNA mutasyonlarına ve ilerleyen süreçte kanser ve genetik hastalıklara yol açabilmektedir (Marnett, 2002). Serbest radikallerden etkilenebilen diğer bir grup ise proteinlerdir. Aminoasitlerde meydana gelen yanlış bağlanma ve yanlış katlanmalar DNA mutasyonlarına, baz modifikasyonlarına, RNA'da yanlış kodlama ve yanlış eklemelere neden olabilmektedir (Davies & Goldberg, 1987).

SMART testinde gözlenen tek tip klonlar DNA'da nokta mutasyon, delesyon, translokasyon, kromozom kaybı ya da kromozom ayrılmaması ve mitotik rekombinasyon, ikiz klonlar ise sadece mitotik rekombinasyon ile oluşmaktadır. "Farklı konsantrasyonlarda SKU'ya maruz kalan transheterozigot larvaların imajinal disk hücre gruplarında farklı genetik mekanizmalardan kaynaklanan KTT, BTT ve ikiz klonlar, oksidatif stres sonucu indüklenen somatik mutasyonların fenotipe yansımalarıdır" diyebiliriz. Bize göre, "bu çalışmada SKU terpeninin konsantrasyon artışı, metabolik yollarda bozukluklara ve hasar birikimine neden olarak somatik hücrelerde genotoksik aktiviteye dayalı mutant klonların oluşumunu indüklemiştir". Sunulan bu çalışmadan elde edilen tüm veriler, hücre bölünmesi sırasında SKU terpeninin genomik stabilite için ket vurucu ajan olduğunu ve kromozomal aberasyonlara yol açtığını göstermektedir. Uygulama gruplarına ait %KİF oranlarında kontrol gruplarına göre gözlenen artış bizim bu görüşümüzü destekler niteliktedir (Çizelge 1).

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi -FHD-2019-7000- kodu ile desteklenen Hatice ÇELİK'in "***Drosophila Melanogaster*'de Doz-Süre Etkileşimine Bağlı Olarak Terpenlerin *In Vivo* Toksik ve Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi**" adlı Yüksek Lisans Tez Projesi olup, tezin gerçekleştirilmesine maddi destek sağlayan Atatürk Üniversitesi BAP birimine katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## KAYNAKLAR

Ahıskahoğlu, A. (2007). *Anemone narcissiflora* Bitkisinin Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi. (Tez No:20012)[Yüksek

- Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı]. Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi.
- Alanis-Garza, B.A., González-González, G.M., Salazar-Aranda, R., Waksman De Torres, N. & Rivas-Galindo, V.M., (2007). Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *Journal Ethnopharmacology*, 114, 468-471.
- Arıca, Ş.Ç. (2017). Yaşlanma ve alglerin anti-gerontolojik etkileri. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(4), 469-474.
- Azirak, S. & Rencuzogullari, E. (2008). The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 23(6), 728-735.
- Azqueta, A. & Collins, A.R. (2012). Carotenoids and DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1-2), 4-13.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A. & Idaomar, M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(1-2), 1-13.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., De Matos, A.F.I.M., Doleski, P.H., Baldisserotto, B., Da Silva, A.S. & Monteiro, S.G. (2018). Blood-brain barrier breakdown, memory impairment and neurotoxicity caused in mice submitted to orally treatment with thymol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 62, 114-119.
- Briksin, D.P. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. *Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. Plant Physiology*, 124(2), 507-514.
- Bushnell, P.G., Nikinmaa, M. & Oikari, A. (1985). Metabolic effects of dehydroabiatic acid on rainbow trout erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 81(2), 391-394.
- Büyükleyla, M. & 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. & Jan, C.R. (2014). Effects of thymol on Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptosis in MDCK renal tubular cells. *Chinese Journal of Physiology*, 57(2), 90-98.
- 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. & 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. & Uysal, H. (2019). Abietik asitin *Drosophila melanogaster*'deki bio-toksik etkileri. MAS International Conference on Mathematics-Engineering-Natural and Medical Science-V, Erzurum, Turkey, 2-5 Mayıs 2019.
- Çelik, H. & Uysal, H. (2019). Guaiiazulen terpeninin *in vivo* bio-etkileri. Eurasianbiochem, Ankara, Turkey, 28-29 Haziran 2019.
- Çelik, H. & Uysal, H. (2020). Abietik asit ve guaiiazulen terpenlerinin "sekonder metabolit" genotoksik potansiyellerinin *in vitro* mikronükleus testi ile belirlenmesi. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 13(2), 1-10.
- 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.
- Davies, K.J. & Goldberg, A.L. (1987). Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 262(17), 8220-8226.
- Ding, W., Lev, D.D., Bishop, M.E., Lyn-Cook, L.E., Kulkarni, R., Chang, C.W., Aidoo, A. & 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.
- Dorman, H.J., Bachmayer, O., Kosar, M. & Hiltunen, R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected lamiaceae species grown in turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 762-770.
- Edwards, J.A., Bellion, P., Beilstein, P., Rumbeli, R. & Schierle, J. (2016). Review of genotoxicity and rat carcinogenicity investigations with astaxanthin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 75, 5-19.
- Edwin, E., Edwin, S. & Amalraj, A. (2006). Antihyperglycemic activity of *Bougainvillea glabra* choisy. *Planta India*, 2, 25-26.
- Eichorn, S.E. & Evert, R.F. (2016). *Raven Bitki Biyolojisi*. Çeviri Editörü: İsmail Türkan, Palme Yayıncılık.
- 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.
- Elumalai, A., Eswaraiah, M.C., Lahari, K.M. & Shaik, H.A. (2012). *In vivo* screening of *Bougainvillea glabra* leaves for its analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities. *Asian Journal Research in Pharmaceutical Sciences*, 2, 85-87.
- Erdem, S. & Eren, P.A. (2009). Tedavi amacıyla kullanılan bitkiler ve bitkisel ürünlerin yan etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 133.
- Erdoğan, E.A. (2012). Using fields of plant essential oils and potential genetic effects. *Lokman Hekim Journal*, 2(2), 21-24.
- Frei, H. & 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.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán-Rincón, J. & Würzler, F.E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), 203-209.
- Gupta, J., Siddique, Y.H., Beg, T., Ara, G. & Afzal, M. (2009). Protective role of green tea extract against genotoxic damage induced by anabolic steroids in cultured human lymphocytes. *Biology and Medicine*, 1(2), 87-99.
- Güçlü, İ. & Yüksel, V. (2017). Fitoterapide antiviral bitkiler. *Deneysel Tıp Dergisi*, 7(13), 25-34.
- 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.
- Huang, Z.R., Lin, Y.K. & Fang, J.Y. (2009). Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, 14(1), 540-54.
- İpek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuglu, 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.
- Kırbağ, S. & Bağcı, E. (2000). *Picea abies* (L.) karst. ve *Picea orientalis* (L.) link uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma. *Journal of Quafqaz University*, 3(1), 183-188.
- Luo, M., Jiang, L.K. & Zou, G.L. (2005). Acute and genetic toxicity of essential oil extracted from *Litsea cubeba* (lour.) pers. *Journal of Food Protection*, 68(3), 581-588.
- Marnett, L.J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181, 219-222.
- Moon, H.I., Cho, S.B., Lee, J.H., Paik, H.D. & Kim, S.K. (2011). Immunotoxicity activity of sesquiterpenoids from black galangale (*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. & Forsyth, A. (1995). Contact sensitivity to menthol and peppermint in patients with intra-oral symptoms. *Contact Dermatitis*, 32(5), 281-284.
- Mouhssen, L. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
- 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.
- Osborn, A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*, 8(10), 1821.
- Öztürk, M., Temel, M., Tınmaz, A.B. & Kil, L. (2012). Tıbbi ve aromatik bitkilerin dış ticaretimizdeki yeri. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu 13-15 Eylül 2012 Tokat, s.33-44.
- Rajoshok, G. & Sumathi, P. (2015). A comparative study in the efficacy of tamoxifen vs efficacy of ormeloxifen in benign proliferative breast diseases. *Journal of Dental and Medical Sciences*, 17(6), 12-15.
- Rani, J.M.J., Chandramohan, G. & Renganathan, R. (2012). Antioxidant activity, preliminary phytochemical investigation and gc-ms study of *Bougainvillea glabra* choicy leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 12-16.
- Saltan, G. (2012). Eczanelerde *Hazırlanabilecek bitkisel preparatlar ve çaylar*. Eczane Eczacılığında Fitoterapötikler, Homeopatikler ve Aromatikler Çalıştayı, Antalya.
- Shah, M., Lewis, F.M. & 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.
- Sökmen, A. & Gürel, E. (2001). Sekonder metabolit üretimi. *Bitki Biyoteknolojisi*, 1, 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.
- Struwe, M., Csato, M., Singer, T. & Gocke, E. (2011). Comprehensive assessment of the photomutagenicity, photogenotoxicity and photo (cyto) toxicity of azulene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 723(2), 129-133.
- Uysal, H. & Oruç, 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*.
- Valerio, L.G. & 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.
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Ten Hoopen, H.J.G. & Memelink, J. (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21(6), 467-479.