



***DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE DOZ-SÜRE
ETKİLEŞİMİNE BAĞLI OLARAK TERPENLERİN
İN VİVO TOKSİK VE GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Hatice ÇELİK
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı
2020
(Her Hakkı Saklıdır)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI

***DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE DOZ-SÜRE ETKİLEŞİMİNE BAĞLI
OLARAK TERPENLERİN *İN VİVO* TOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

(Determination of *In vivo* Toxic and Genotoxic Effects of Terpenes in *Drosophila melanogaster* Depending on Dose-Time Interaction)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice ÇELİK

Danışman: Prof. Dr. Handan UYSAL

Erzurum

Haziran, 2020

KABUL ve ONAY TUTANAĞI

***DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE DOZ-SÜRE ETKİLEŞİMİNE BAĞLI OLARAK TERPENLERİN *İN VİVO* TOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Handan UYSAL danışmanlığında, Hatice ÇELİK tarafından hazırlanan bu çalışma, 23/06/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisan tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı ve Prof. Dr. Handan UYSAL

Danışman:

Atatürk Üniversitesi

.....

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Özkan AKSAKAL

Atatürk Üniversitesi

.....

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Erzurum Teknik Üniversitesi

.....

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../.... tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN

Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: FHD-2019-7000

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Handan UYSAL danışmanlığında sunulan “*Drosophila melanogaster*'de Doz-Süre Etkileşimine Bağlı Olarak Terpenlerin *In vivo* Toksik ve Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	8	30
Kuramsal Temeller	8	30
Materyal ve Yöntem	12	35
Bulgular	14	20
Tartışma	8	20
Tezin Geneli	11	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Hatice ÇELİK	Prof. Dr. Handan UYSAL
27.5.2020	27.5.2020
İmza:	İmza:

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup, “Terpenler ile Somatik Mutasyonların Uyarımı Üzerine Araştırmalar” isimli (FHD-2019-7000) proje kapsamında Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Öncelikle değerli desteklerinden dolayı Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı’na,

Çalışmamız süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, bu çalışmanın planlama ve gerçekleştirme aşamalarında değerli katkı, öneri ve desteklerini hiç esirgemeyen, tezimin hazırlanma aşamasında büyük emeği olan ve eğitim hayatımın bu döneminde bana öğretmiş olduğu her türlü bilgi ve beceri için çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Handan UYSAL’a,

Tezimin tüm aşamalarında bana destek ve yardımcı olan Dr. Halit Kızılet’e ve laboratuvar çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca ilgi, sevgi ve desteklerini her daim arkamda hissettiğim aileme, arkadaşlarıma ve Erzurum’da devam ettiğim eğitim hayatımda bana ikinci bir aile olan değerli dayım, yengem ve kuzenlerime teşekkür ederim.

Hatice ÇELİK

Haziran, 2020

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE DOZ-SÜRE ETKİLEŞİMİNE BAĞLI OLARAK TERPENLERİN *İN VİVO* TOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Hatice ÇELİK

Haziran 2020, 148 sayfa

Amaç: Bitkisel kökenli çeşitli terpenler gıda, temizlik, tıp, eczacılık ve kozmetik alanlarında pek çok ürünün içinde bulunmakta ve canlı sistemlere değme ya da oral yolla alınmaktadır. Ayrıca alternatif tedavi amaçlı olmak üzere alınmaları önerilmekte ancak sürekli maruziyetin ortaya çıkarabileceği durumlar pek fazla bilinmemektedir. Bu durumda birkaç soru akla gelmektedir. “Terpenler ömür uzunluğu üzerine toksik etkili olabilirler mi?” ya da “genotoksik etkiyi uyarak somatik mutasyonlara sebep olabilir mi?” Bu çalışma, terpenlerin doz-süre etkileşimine bağlı olarak olası toksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi için yapılmıştır.

Yöntem: Bu tez çalışmasında model organizma olarak seçilen *Drosophila melanogaster*'in yabancıl ve mutant soyları ile iki farklı kısa süreli test tekniği kullanılmıştır. Bunlardan birisi *in vivo* ömür uzunluğu, diğeri ise somatik mutasyon ve rekombinasyon testi/ kanat benek testidir.

Bulgular: Elde edilen verilere göre, farklı gruplara ait terpenlerin kronik olarak uygulanan tüm dozlarda toksik etkiye dayalı ömür uzunluğunu kısalttığı belirlenmiştir. Bu durum *D. melanogaster*'in hem dişi hem de erkek popülasyonlarında gözlenmiştir. Ayrıca tüm terpenlerin somatik mutasyon frekansını artırdığı da tespit edilmiştir.

Sonuç: Sunulan tez çalışması kapsamında, günümüzde çeşitli sektörlerde ve özellikle alternatif tıp yöntemlerinde kullanılan terpenlerin doz-süre etkileşimine dayalı olarak toksik ve genotoksik etkili olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Terpenler, *Drosophila melanogaster*, ömür uzunluğu, SMART, toksisite, genotoksisite.

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

DETERMINATION OF *IN VIVO* TOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF TERPENES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* DEPENDING ON DOSE-TIME INTERACTION

Hatice ÇELİK

June 2020, 148 pages

Purpose: Various terpenes of vegetable origin are found in many products in the fields of food, cleaning, medicine, pharmacy and cosmetics and are taken by contact with live systems or orally. In addition, they are recommended to be taken for alternative treatment purposes, but situations where continuous exposure may occur are not known much. In this case, a few questions come to mind. "Can terpenes be toxic to life?" or "can it cause somatic mutations by stimulating genotoxic effect?" This study was conducted to determine the possible toxic and genotoxic effects of terpenes based on dose-time interaction.

Method: In this thesis, *Drosophila melanogaster*, chosen as a model organism, uses wild and mutant strains and two different short-term test techniques. One of them is *in vivo* life span, the other is somatic mutation and recombination test/wing spot test.

Findings: According to the data obtained, it has been determined that terpenes belonging to different groups shorten their lifetime based on toxic effects at all doses administered chronically. This has been observed in both female and male populations of *D. melanogaster*. It was also found that all terpenes increase the somatic mutation frequency.

Results: Within the scope of the presented thesis study, it is determined that terpenes used in various sectors and especially in alternative medicine methods are toxic and genotoxic based on dose-time interaction.

Keywords: Terpenes, *Drosophila melanogaster*, life span, SMART, toxicity, genotoxicity.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY TUTANAĞI	ii
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xi
GİRİŞ.....	1
Sekonder Metabolitler	4
Büyük moleküllü sekonder metabolitler.	6
Küçük moleküllü sekonder metabolitler.	7
Tez Kapsamında Kullanılan Terpenler.....	11
Monoterpenler.	11
Seskiterpenler.	13
Diterpenler.	15
Triterpenler.	16
Tetraterpenler (Karotenoidler).....	17
Yaşlanma	19
Yaşlanma teorileri.	20
Yaşlanmaya etkileyen diğer iç ve dış faktörler.	25
Genetik Toksikoloji	30
Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi.	32
KURAMSAL TEMELLER.....	37
MATERYAL VE METOT.....	49
Materyal.....	49
Kullanılan organizma.	49
Kullanılan kimyasal maddeler.	58
Kullanılan alet ve cihazlar.	58
Yöntem	59
Besiyeri ortamının hazırlanması.....	59
Eterizasyon (bayıltma) yöntemi.	60
Ömür uzunluğu testi için ön kültürlerin oluşturulması ve ergin bireylerin toplanması. ..	60

Ömür uzunluğunda kullanılacak terpenlerin stok solüsyonlarının hazırlanışı.	60
Ergin bireylere terpenlerin uygulanması.	60
Ömür uzunluğu testinden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri.	61
SMART için ön kültürlerin oluşturulması ve ergin bireylerin toplanması.	62
Trans-heterozigot larvaların elde edilmesi.	62
SMART’da kullanılacak terpenlerin stok solüsyonlarının hazırlanışı.	63
Trans-heterozigot larvalara terpenlerin uygulanması.	63
Başkalaşımı tamamlayan ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması.	63
Kanat preparatlarının mikroskopik analizi.	64
Klon indüksiyon frekansının hesaplanması.	65
SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi.	66
ARAŞTIRMA BULGULARI	67
<i>In vivo</i> Ömür Uzunluğu Testinden Elde Edilen Bulgular.	67
Kontrol gruplarına ait ömür uzunluğunun belirlenmesi.	67
Timol monoterpenin ömür uzunluğu toksisitesi.	68
Guazilen seskiterpeninin ömür uzunluğu toksisitesi.	70
Abietik asit diterpeninin ömür uzunluğu toksisitesi.	72
Skualen triterpeninin ömür uzunluğu toksisitesi.	74
Astaksantin tetraterpenin ömür uzunluğu toksisitesi.	77
<i>In vivo</i> Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular.	79
Negatif ve pozitif kontrol gruplarından elde edilen SMART bulguları.	79
Timol monoterpenine ait SMART bulguları.	85
Guazilen seskiterpenine ait SMART bulguları.	87
Abietik asit diterpenine ait SMART bulguları.	89
Skualen triterpenine ait SMART bulguları.	91
Astaksantin tetraterpenine ait SMART bulguları.	93
TARTIŞMA ve SONUÇ	95
KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ	134

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Terpenlerin Sınıflandırılması</i>	10
Tablo 2. <i>Yaşlanma Teorilerin Sınıflandırılması</i>	20
Tablo 3. <i>Yaşlanmayı Etkileyen İç ve Dış Faktörler</i>	25
Tablo 4. <i>D. melanogaster'in Gelişim Evreleri ve Süreleri</i>	55
Tablo 5. <i>Ömür Uzunluğu Test Yönteminde Kullanılan Kimyasal Maddeler</i>	58
Tablo 6. <i>SMART'da Kullanılan Kimyasal Maddeler</i>	58
Tablo 7. <i>Genetik Laboratuvarında Kullanılan Cihaz ve Malzemeler</i>	59
Tablo 8. <i>Standart Drosophila Besiyeri İçeriği</i>	59
Tablo 9. <i>Faure Solüsyonunun İçeriği</i>	64
Tablo 10. <i>Orijinal (Ho) ve Alternatif (Ha) Hipotezlerin Değerlendirilmesi</i>	66
Tablo 11. <i>D. melanogaster'in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Distile Su ve DMSO Kontrol Gruplarına ait Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması</i>	68
Tablo 12. <i>Kronik Olarak TİM Uygulanmış D. melanogaster'in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması</i>	69
Tablo 13. <i>Kronik Olarak GUA Uygulanmış D. melanogaster'in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması</i>	71
Tablo 14. <i>Kronik Olarak ABA Uygulanmış D. melanogaster'in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması</i>	73
Tablo 15. <i>Kronik Olarak SKU Uygulanmış D. melanogaster'in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması</i>	75
Tablo 16. <i>Kronik Olarak ASTA Uygulanmış D. melanogaster'in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması</i>	77
Tablo 17. <i>Negatif ve Pozitif Kontrol Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistik Analiz Sonuçları</i>	84
Tablo 18. <i>Timol Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistik Analiz Sonuçları</i> ..	86
Tablo 19. <i>Guazilen Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistik Analiz Sonuçları</i>	88
Tablo 20. <i>Abietik Asit Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistik Analiz Sonuçları</i>	90
Tablo 21. <i>Skualen Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistik Analiz Sonuçları</i>	92
Tablo 22. <i>Astaksantin Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve Analiz Sonuçları</i>	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İzopren birimi.	10
Şekil 2. Timolün kimyasal yapısı.....	13
Şekil 3. Guazilenin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 4. Abietik asitin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 5. Skualenin kimyasal yapısı.	17
Şekil 6. Astaksantin kimyasal yapısı.	18
Şekil 7. Genotoksik maddelerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları.....	31
Şekil 8. <i>D. melanogaster</i> 'in embriyonal gelişim evresindeki larval dönemine ait imajinal disklerin ergin bireyde oluşturdukları vücut kısımları.	32
Şekil 9. a) Oregon-R yabancı tip bireylere ait kanat yapısı (10x10), b) Kanat kıllarının mikroskopik görüntüsü (10x40).	33
Şekil 10. a) <i>mwh/mwh</i> geni taşıyan multipli wing hair bireylerine ait kanat yapısı (10x10), b) Çoklu kanat kıllarının mikroskopik görüntüsü (10x40).....	34
Şekil 11. a) <i>flr³/TM3</i> geni taşıyan <i>flare</i> bireylerine ait kanat yapısı (10x10) b) Kanat kıllarının mikroskopik görüntüsü (10x40)	34
Şekil 12. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin uygulama şekli.	36
Şekil 13. Somatik mutasyon ve rekombinasyonların oluşum mekanizmalarına ait şematik gösterimi.	37
Şekil 14. <i>D. melanogaster</i> Oregon-R yabancı soyuna ait ♀ ve ♂.....	50
Şekil 15. <i>D. melanogaster</i> 'in baş bölgesi.	51
Şekil 16. <i>D. melanogaster</i> 'in vücut yapısı ile dişi ve erkek bireyler arasındaki karın bölgesinin görünümü.....	52
Şekil 17. <i>D. melanogaster</i> 'in bacak yapısı ve erkek bireylerde bulunan eşey tarağı.	52
Şekil 18. <i>D. melanogaster</i> 'in dişi ve erkek bireylerine ait karyotipler.	53
Şekil 19. <i>D. melanogaster</i> 'in hayat döngüsü.	55
Şekil 20. <i>mwh</i> ve <i>flr</i> belirleyici genlerinin III. kromozom üzerindeki lokasyonları.	57
Şekil 21. <i>Flare</i> mutant türüne ait erkek birey (ok işareti testere dişi şeklindeki kanat yapısını göstermektedir).	57
Şekil 22. <i>Multiple wing hair</i> mutant türüne ait dişi birey.	57
Şekil 23. Normal ve serrat kanat fenotiplerine ait sektörler.	64
Şekil 24. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi sonuçlarının mikroskopik gösterimi (10x40).	65
Şekil 25. TİM uygulanmış <i>D. melanogaster</i> 'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.....	70
Şekil 26. GUA uygulanmış <i>D. melanogaster</i> 'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.....	72
Şekil 27. ABA uygulanmış <i>D. melanogaster</i> 'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.....	74

Şekil 28. SKU uygulanmış <i>D. melanogaster</i> 'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.....	76
Şekil 29. ASTA uygulanmış <i>D. melanogaster</i> 'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.....	78
Şekil 30. Yabanıl tip bireylere ait kanat kılı yapılarının mikroskopik görünüşü (10X40).	79
Şekil 31. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klonlarının mikroskopik görünüşü (10X40).....	80
Şekil 32. Büyük tek tip <i>mwh</i> mutant klonlarının mikroskopik görünüşü (10X40).....	81
Şekil 33. İkiz mutant klonların mikroskopik görünüşü (10x40).....	82



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

TİM	: Timol
GUA	: Guazilen
ABA	: Abietik asit
SKU	: Skualen
ASTA	: Astaksantin
Bd^S	: Serratlık geni
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
EMS	: Etil metansülfonat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
UV	: Ultra viyole
KİF	: Klon indüksiyon frekansı
Na	: Sodyum
K	: Potasyum
MN	: Mikronükleus
NBİ	: Nükleer bölünme indeksi
SDB	: Standart <i>Drosophila</i> besiyeri
DIM	: <i>Drosophila</i> Instat Medium
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
NRP	: Ribozomal olmayan peptitler
PCB	: Poliklorlu bifeniller
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
SCGE	: Tek hücre jel elektroforezi
ROS	: Reaktif oksidan seviyesi
TOS	: Total oksidan seviyesi
AChE	: Asetilkolinesteraz

CAT	: Katalaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GR	: Glutatyon redüktaz
GST	: Glutatyon S-transferaz
MSR	: Metionin sülfoksit redüktaz
TRXP	: Tioredoksin peroksidaz
SMART	: Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
TM3	: Dengeleyici kromozom
BTT	: Büyük tek tip
KTT	: Küçük tek tip
<i>flr³</i>	: <i>Flare</i> geni
<i>mwh</i>	: <i>multiple wing hair</i> =Çoklu kanat kıllığı geni
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
R	: Korelasyon değeri
Σ	: Toplam
H₀	: Orijinal (null) hipotez
H_a	: Alternatif hipotez
♀	: Dişi
♂	: Erkek
α	: Alfa
β	: Beta
°C	: Santigrat derece
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
%	: Yüzde

GİRİŞ

Canlı varlıklar için hayatın vazgeçilmez temel besin ve oksijen kaynaklarından birisi olan bitkiler, tarihin çok eski devirlerinden beri insanlar tarafından çeşitli hastalıklara karşı tedavi edici olarak da kullanılmaktadır. Albert Szent-Gyorgyi “Yaşamı sürükleyen.... Güneş ışığı tarafından yakalanan küçük bir akımdır” derken fotosentez olayının ve fotosentez ile canlılar için ihtiyaç duyulan oksijen ve besin bileşenlerinin üretiminin yeryüzünde gerçekleşen en büyük mucize olduğunu vurgulamaktadır. Bitkiler yaşam için elzem olan bu bileşenleri üreterek örneğin; giysi yapımı için iplik, kitaplar için kağıt, doğrudan yiyecek ya da baharat şeklinde kullanılırlar. Ancak baharat derken sadece lezzet verici değil aynı zamanda antimikrobiyal özellikteki bileşenleri nedeniyle yiyecekleri mikrobiyal bozulmalara karşı koruyucu olarak tercih edilirler (Billing and Sharman 1998; Tapsell *et al.* 2006). Ayrıca bitkilerle tedaviyi tercih eden canlıların sadece insanlar olmadığı hayvanların da hasta oldukları dönemlerde bazı bitkileri özellikle tercih ettikleri bildirilmiştir (Sumner 2000). Öyle ki; bir tür dağ keçisi olan Bezuvar, günlük otlamaları sırasında yemedikleri *Euphorbia* (sütlege) bitkisini yılan sokması esnasında yemekte ve bu bitkide bulunan “öforbon” maddesini panzehir olarak kullanmaktadırlar.

Bitkisel tedavi yöntemlerinin kökeninin antik çağlara dayandığı, 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 şekillerde uyguladıkları bilinmektedir (Eichorn and Evert 2016). Sümerler döneminde Mürrüsafi ya da mirra ağacı olarak bilinen *Commiphora myrrha*’dan elde edilen mür’ün ve *Papaver somniferum* L.’dan elde edilen afyon’un, Antik Mısır döneminde ise papirüs, aloe, kenevir, hint otu, sarımsak, ardıç ve mandrake gibi 800’den fazla bitkinin ilaç üretiminde kullanıldığının yazılı belgelerde yani kil tabletlerinde gösterilmesi o dönemlerde bitkilerle tedavi yöntemlerinin tercih edildiği kanıtlamaktadır (Sumner 2000). Milattan sonra ise bitki bileşenlerinin nasıl elde edilebileceği ve bu bileşenlerin hangi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği 11. yüzyılda çeşitli dillere çevrilip eğitim amacıyla kullanılan Hekimliğin Yasası adlı eserde İbn-i Sina tarafından etraflıca ortaya konulmuştur.

Ayrıca tıbbın babası olarak bilinen Hipokrat, sağlıklı yaşam için bitkilere yer verilmesi gerektiğini ve vücuda uygulanan masajlarda dahi onların kullanılmasının faydalı olabileceğini belirtmiştir. Fransız edebiyatçı Montaigne’nin “Hekimler kokulardan daha fazla

yararlanmalılar çünkü kokuların ruh halini deðiřtirdiğini kendimde gözlemliyorum” ifadesi 16. yüzyılda da bitkilerin tedavide kullanıldığının göstergesidir. 19. ve 20. yüzyıllarda ise bitkilere olan ilginin daha da arttığı yapılan araştırmalardan anlaşılmaktadır. Şöyle ki; 1910 yılında Gattefosse laboratuvar çalışmalarını sürdürürken başına gelen kaza sonucu rastgele karşılaştığı lavanta yağının antiseptik ve iyileştirici etkisi ile bitkisel tedavi yöntemlerine yönelmiştir (Gattefosse 2012). Fransız Dr. Valnet ise fitoterapinin babası olarak kabul edilmekte ve bulunduğu dönemde savaşta yaralanmış olan askerlere antiseptik ve tedavi amaçlı çeşitli bitkilerin (kekik, biberiye vs.) yağlarını kullanmıştır (Valnet 2012). Aynı zamanda bu bitkilerin bilimsel olarak etkilerini de belirlemeye çalışmıştır.

Geleneksel tıp yöntemleri yüzyıllardır süre gelmiş ve geliştirilmiştir. Günümüzde ise bitkilerden bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, biyolojik olarak parçalanabilen plastik üretimi, tarımda zararlılara karşı mücadele, aşı üretimi ve ilaç yapımı gibi alanlarda sıklıkla yararlanılmaktadır (Eichorn and Evert 2016).

Özellikle “tıbbi” olarak tanımlanan bitkilerin, ilaç endüstrisindeki teknolojik gelişmelere rağmen yadsınamayacak derecede kullanım alanına sahip olduğu bilinmektedir (Aslan 2005). Ancak ilaç endüstrisinde bitkilere bu denli yer veriliyor olmasına karşın “doğaya dönüş” sloganıyla doğal beslenme ve doğal ürünlerle tedaviyi tercih edip sentetik ürünlerden uzaklaşmak isteyen toplumların gün geçtikçe alternatif tıba olan merakının artması da dikkat çekmektedir (Aslan 2005). Bu merakı ticari bir faaliyet haline dönüştürmek isteyenler ise “şıfa doğada”, “doğanın mucizevi iyileştirici gücü” gibi abartılı sloganlarla kendi çıkarları doğrultusunda şıfalı olarak bilinen bu bitkilerin hiçbir yan etkisinin olmadığı düşüncesini savunmaktadırlar (Erdem ve Eren 2009). Alternatif tıp kapsamında tedavi amaçlı olarak kullanılan ancak etkilerine yönelik tam bir bilgiye sahip olunmayan bitkilerin amaçlanan aksine istenmeyen sonuçlar doğurduğu da bilinmektedir (Calixto 2000; Valerio and Gonzales 2005). Ortaya çıkan bu tip durumlara sebep olduğu/olabileceği düşünölen bitkilere ait bileşenler ise bilim dünyasında yeni bir araştırma alanı oluşturmuştur. Bu yüzden özellikle son yıllarda tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin içermiş oldukları etken maddelerin ve fonksiyonlarının ne olduğunun tam olarak anlaşılabilmesi için yapılan araştırmalar hız kazanmıştır.

Yapılan araştırmalar neticesinde ise çalışılan bitki bileşenlerinin antienflamatuvar, antioksidan, antimutajen, toksik ve mutajenik gibi çeşitli bio-aktivitelere sahip olabilecekleri görölmüştür (Dorman *et al.* 2004; Clark 2009; Moon *et al.* 2011; Erdoğan 2012). Etkinlikleri belirlenmiş bitki bileşenlerinin yararlı etkilerinden faydalanmak için hangi dozlarda kullanılması gerektiğine dair bilgiler de yapılan bu çalışmalarda sunulmaktadır. Ancak ne yazık ki elde edilen bu bilgiler kulak ardı edilip çoğu zaman “fazla kullanırsam daha etkili olur”

düşüncesiyle hareket edildiği görülmektedir. NCAHF Home Page (2009)'de yer alan “doğada her şey zehir niteliğinde olup, bir nesneyi zehir yapan alınan dozudur” ve İbn-i Sina'nın “her bitki ilaç, her bitki zehir” şeklindeki alınan dozun önemini vurgulayan ifadelerle rağmen insanlar hatalı kullanım nedeniyle önemli düzeyde sağlık problemleri ile karşılaşmaktadırlar. Örneğin morfin, digitalin, kürar gibi bitki bileşenlerinin önerilen dozları tedavi edici etki gösterirken aynı türevlerin yüksek dozları ölümcül/toksik etki gösterebilmektedir (NCAHF Home Page 2009).

İlaç firmaları geleneksel olarak kullanımı yaygın olan bitkilerdeki tedavi edici etkiye sahip bileşenleri belirleyip ayırıştırarak güvenilir doz standardizasyonu sağlamışlar ve vücuttaki etkilerini önceden tahmin edebilmeyi başarmışlardır. Ancak unutulmamalıdır ki gerekli güvenlik testlerinden geçirilerek ruhsatlandırıldıktan sonra piyasaya sürülen ilaçlar bile potansiyel yan etkiler gösterebilmektedir (Calixto 2000). Tedavi amaçlı kullanılan bu bitkilerin de diğer bitkiler gibi çok sayıda bileşen içermeleri nedeniyle etkinliği belirlenmiş muhtemel farklı bir bileşenin sağlık açısından olumsuz etkiler oluşturabileceği de göz ardı edilmemelidir. Örneğin, bazı zayıflama çaylarında isimleri belirtilmeyen bileşenlerin tansiyon yükseltici ya da Na, K, kandaki renin ve aldosteron düzeylerini düşürücü etkilere ve hatta ölümlere neden olabilecekleri çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Boullata and Nace 2000; Kuruvilla 2002; Street *et al.* 2008; Van Breemen *et al.* 2008). Diğer taraftan benzer sonuçlar çağımızın vebasası olan kanser hastalıklarına iyi geldiği iddia edilen ve antioksidan, antikanserojen vb. etkili diye hazırlanmış karışımlar içinde geçerli olup istenmeyen etkiler bu karışımların kullanımı sonrasında da görülebilmektedir (Cupp 2000; Haller and Benowitz 2000; Gurley *et al.* 2000; Bush *et al.* 2007; Van Breemen *et al.* 2008). Ortaya çıkan bu tip durumlara sebep olduğu/olabileceği düşünülen bitkileri tanıma ve içerdikleri bileşenlerin tümünün fonksiyonlarını belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar neticesinde, bitkilerin onların yaşamsal işlevleri ile birincil derece ilişkili olmayan çeşitli organik bileşikler/metabolitler içerdikleri belirlenmiştir.

Hücrede meydana gelen metabolik reaksiyonların ana ürünleri olan bu metabolitlerin bulundukları organizmaların normal büyüme, gelişme, çoğalma ile ilgili yaşamsal faaliyetlerinde rol oynayan çeşidine primer (birincil) metabolitler denilmektedir (Cowan 1999). Primer metabolitlerin aksine bitkiler, bazı hayvanlar ve bakteriler tarafından sentezlenebilen organizmanın yaşamsal faaliyetlerinde doğrudan yer almayan metabolitlere ise sekonder (ikincil) metabolitler denilmektedir.

Bitkilerin sentezlemiş oldukları bu metabolitler teknolojinin ve bilimin gelişmesiyle sahip oldukları özellikler doğrultusunda gıda, ilaç, kozmetik sanayi gibi farklı endüstriyel

alanlara ilaveten alternatif tıp ve aromaterapi gibi oldukça geniş bir yelpazede kullanım alanı bulabilmektedir. Özellikle son yıllarda bazı sekonder metabolitlerin antimitojen, antioksidan ve antikanserojen aktivitelerinin belirlenmesiyle kanserin de dahil olduğu birçok hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel kullanım alanı oluşturabileceği ifade edilmekte ve bu bileşenlerin besin maddeleri ile alınması önerilmektedir (Erdoğan 2012). Ancak katkı maddesi, lezzet verici madde, gıda boyası, pestisit, renk ve koku verici madde olarak birçok alanda kullanılabilmesi sekonder metabolitlerin hiçbir şekilde zararlı etkilerinin olmadığı anlamına gelmemektedir. Görüldüğü gibi hayatın içinde farklı canlı grupları ve özellikle insanlar çoğunlukla bitkisel kaynaklı olmak üzere sekonder metabolitlere günlük hayatta kullandığımız pek çok ürünle birlikte farklı oranlarda temas ya da oral yolla maruz kalmaktadır. Tüm bu özelliklerinin yanında sekonder metabolitlerin olumsuz etki oluşturabilecekleri de göz önünde bulundurularak, kullanım süresinin ve dozunun çok iyi bir şekilde ayarlanması gereklidir. Ayrıca sekonder metabolitlerin ve bileşenlerinden bazılarının genotoksik aktivitesinin belli doz artışına paralel olarak ortaya çıktığı da yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Williams 1989; Lewis *et al.* 1995; Morton *et al.* 1995; Shah *et al.* 1996). Bu durumda amaca yönelik model organizmalar kullanılarak laboratuvar şartlarında *in vivo* ya da *in vitro* çalışmalarda farklı dozlarda, akut ya da kronik alımlara bağlı olarak sekonder metabolitler ve alt gruplarına ait bileşenlere yönelik akademik çalışmalar önem kazanmıştır.

Sekonder Metabolitler

Hücrede çeşitli enzimler tarafından kataliz edilen ve metabolik reaksiyonların ara ürünleri olan organik bileşikler primer ve sekonder metabolitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Primer metabolitler prokaryotik ve ökaryotik canlılarda bulunan moleküller olup organizmaların normal büyüme, gelişme ve çoğalma ile ilgili faaliyetlerinde doğrudan görev alırlar. Aminoasitler, basit şekerler, nükleik asitler ve proteinler primer metabolit örnekleridir (Eichorn and Evert 2016).

İlk kez 1891 yılında Kossel tarafından primer metabolitlerin karşısı olarak tanımlanan sekonder metabolitler, bitkiler tarafından üretilen fotosentez ürünü olmayıp, birtakım fizyolojik mekanizmaların fonksiyonlarıyla oluşan ve hayati fizyolojik olaylarda mutlak görev almayan metabolitler olarak tarif edilmiştir (Theis and Lerdau 2003). Sekonder metabolitler hayati fonksiyonlardan daha ziyade bulundukları bitkilere diğer yabancı türlere karşı mücadelede (Verpoorte *et al.* 1999), kuraklık, tuzluluk, UV ışınları gibi çevresel stres şartlarına uyum sağlamada (Sökmen ve Gürel 2001), tozlaşmada böcekleri çekme ve simbiyotik ilişkilerin kurulmasında (Briksin 2000), bakteriyel ya da fungal patojenlere karşı geliştirilen savunma mekanizmalarında (Osbourne 1996) rol almaktadırlar. Bu metabolitlerin türe özgü üretilenleri

olmakla beraber bahsi geçen faaliyetler esnasında geniş ya da sınırlı düzeylerde sentezlendikleri bilinmektedir (Verpoorte *et al.* 1999; Sökmen ve Gürel 2001). Farklı bio-aktivitelere sahip bu bileşikler fonksiyonlarına göre gıda, ilaç ve kozmetik sanayi gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmakta ve bazı hastalıkların tedavisi için de alternatif tıp yöntemlerinde tercih edilmektedirler (Kırbağ ve Bağcı 2000). Örneğin, *Salix* (söğütgiller)'den elde edilen salisilik asit analjezik (ağrı kesici), *Papaver somniferum* (haşhaş)'dan elde edilen kodein öksürük kesici ve analjezik, *Ephedra sinica* (Çin çayı)'dan elde edilen efedrin (tüm amfetaminlerin annesi olarak bilinmekte) bronş açıcı, *Digitalis purpurea* (yüksük otu)'dan elde edilen digitoksin kardiovasküler hastalıklarda kullanılan sekonder metabolitlerdendir. Aynı zamanda besin endüstrisinde sentetik katkı maddelerinin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilerinin ortaya çıkması ile doğal ürünlere duyulan ilgi artmakta bu da sekonder metabolitlerin tat, koku ve renk verici olarak sıklıkla tercih edilmesine sebep olmaktadır.

Gıda endüstrisinde metabolitlerin kullanımlarına örnek olarak, Afrika yağmur ormanlarında bulunan *Thaumatococcus danielli* (Afrika ağaç katemfe/mucize meyveleri)'den elde edilen thaumatin, düşük kalorili ve sakkarozdan (çay şekeri) 2000 kat daha tatlı olması nedeniyle tatlandırıcı, *Crocus sativa* (safran)'da elde edilen krosetin renklendirici, koku ve aroma verici olarak *Vanilla planifolia* (vanilya)'dan vanillin verilebilir. Doğal olmaları ve diğer sentetik pestisitler gibi çevreye olumsuz etki yapmamaları sebebiyle sekonder metabolitler zirai mücadelede de sıklıkla tercih edilmektedirler. Suni ilaçların toprağa, bitki örtüsüne, havaya ve diğer hedef olmayan organizmalara olan zararlı etkileri her geçen gün önemini artırmakta, çiftçilerin bilinçlenme oranının artışına paralel olarak da zirai mücadelede doğal yöntemlere başvurma oranı hızla yükselmektedir. Örneğin; *Nicotiana tabacum* (tütün)'dan elde edilen nikotin ve *Chrysanthemum cinerariaefolium* (dalmaçya pire otu)'dan elde edilen piretrin, sinerin ve yasmolin insektisit olarak, *Anacardicum occidentale* (kaju)'dan elde edilen anakardik asit ise mollusisit olarak kullanılmaktadır.

Yine farklı bir sektör olan ve hemen hemen herkesin kullandığı yumuşatıcı, iyileştirici vs. etkiye sahip kremlerde, parfüm, deodorant, losyon, sabun ve şampuanlarda da bu metabolitlerden faydalanılmaktadır. Örneğin; gül yağı ve gül suyunda, salatalık özlü ve hindistan cevizli kremlerde, ya da saçların daha gür ve ışıltılı olması için evlerde de hazırlanabilen badem yağı ve sarımsak gibi birçok bitkisel ürün karışımı içinde farklı metabolitler bulunabilmektedir. Bu metabolitler, *Lavandula officinalis* (lavanta çiçeği)'den elde edilen lavanta yağı, *Rosa damascena* (Isparta gülü)'den elde edilen gül yağı ve *Jasminum* spp. (yasemin)'den elde edilen yasemin yağı ve birçok farklı bitkide de bulunmaktadır.

Sekonder metabolitler büyük ve küçük moleküllü olma şekillerine göre iki ana gruba ayrılmıştır.

Büyük moleküllü sekonder metabolitler.

- Poliketidler
- Yağ asidi
- Ribozom dışı peptitler

Poliketidler.

Poliketidler ya değişken karbonil ve metilen grupları (-CO-CH₂-) ya da bu türden değişken grupları içeren büyük moleküllü sekonder metabolitlerdir. Mantarlar tarafından üretilen mikotoksinler, poliketidlere örnektir (Huffman *et al.* 2010). Poliketidler çeşitli biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik özellikleri olan doğal ürünlerdir. Geldanamisin, doksisiklin, eritromisin gibi birçok poliketid antimikrobiyal, antibiyotik, immünosupresif, antifungal, sitostatik antiparaziter ve doğal insektisit olarak çeşitli sektörlerde kullanılmaktadır (Katz 1997).

Yağ asitleri.

Yağ asitleri genellikle organizmalarda üç ana ester sınıfı olan trigliserit, fosfolipit ve kolesterol formunda yer alan sekonder metabolitlerdir (Moss *et al.* 1997). Yağ asitleri hem hayvansal organizmalar için önemli besin kaynaklarıdır hem de hücreler için önemli yapısal bileşenlerdir. Yağ asitlerinin sabun üretiminde kayganlaştırıcı, emülgatör (yoğunlukları farklı bileşenlerin homojen karışmasını sağlayan madde), tekstüre edici (sentetik ipliklerin doğal görünümüne dönüştürülmesi), ıslatıcı, köpük önleyici veya dengeleyici maddeler olarak kullanımları mevcuttur. Aynı zamanda sorbitol, etilen glikol gibi daha kompleks alkollere sahip yağ asitlerinin esterlerinin gıdalarda tüketildiği ve kişisel bakım ürünlerinde de tercih edildikleri bilinmektedir.

Ribozomal olmayan peptitler.

Ribozomal olmayan peptitler (NRP), bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir (Ding and Dai 2012). NRP, yüksek molekül ağırlıklı multifonksiyonel Nonribozomal Peptit Sentetazlar (NRPS) ile sentezlenirler. Amino asitler bu enzimler ile ribozomlar olmaksızın yan yana gelip birleşirler (Turgay *et al.* 1992). NRP'ler, antimikrobiyal, antienflamatuar gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik özellikleri olan toksin, siderofor (demir şelasyonu yapan bileşikler) veya pigment halinde olan doğal

ürünlerdir. NRP'lerin antibiyotik, sitostatik ve immünsüpresan (bağışıklık baskılayıcı) olarak ticari satışı bulunmaktadır (Walton 2006).

Küçük molekülü sekonder metabolitler.

- Alkaloidler
- Flavonoidler
- Glikozitler
- Doğal fenoller
- Fenazinler
- Bifeniller
- Terpenler

Alkaloidler.

Bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanlar dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalar tarafından üretilen alkaloidler (Robert 2013), bağımlılık yapıcı ve iyileştirici özellikleri ile bilinen güçlü metabolitlerdir. Farklı etkilere sahip olan alkaloidler tıpta büyük önem taşımakta ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Örneğin, haşhaştan elde edilen morfin ağrı ve öksürük kesici ilaçlarda (Raymond *et al.* 2010), efedrin nezle, soğuk algınlığı, saman nezlesi ve bronşiyal astım gibi hastalıklara karşı üretilen ilaçlarda (Kittakoop *et al.* 2014), ritim düzenleyici ilaçlarda (Raymond *et al.* 2010), atropin göz hastalıklarında, kokain göz ve diş ameliyatlarında anestezi madde olarak çeşitli amaçlarda kullanılan alkaloidlerdir (Eichorn and Evert 2016). Bunların yanında keleritrin ve homoharringtonin gibi çeşitli alkaloidler antibakteriyel ve antikanser etkinlikler sergilemelerinden dolayı alternatif tıp yöntemlerinde de tercih edilmektedirler. Tedavi amaçlı kullanımlarının yanı sıra nikotin ve anabasin tuzları gibi bazı alkaloidlerin sentetik pestisitlerin üretiminden önce böcek öldürücü olarak kullanıldıkları da bildirilmiştir (Matolcsy *et al.* 1989). Yine Matolcsy *et al.* (1989) tarafından sağlık alanında kullanılan bu ilaçların yüksek dozlarda kullanımının bağımlılığa neden olduğu ve toksik etki gösterebildiği (Robbers *et al.* 1996), aynı şekilde tarımda zirai ilaç olarak kullanılan alkaloidlerin de toksik etkili olabilecekleri belirlenmiştir.

Flavonoidler.

Bitkilerde bulunan pigment bileşikleri olup, hücre içinde kimyasal haberci, fizyolojik düzenleyici veya hücre döngüsünün inhibitörleri olarak görev yapmaktadırlar (Galeotti *et al.* 2008). Flavonoid içeriği en yüksek olan yiyecekler arasında maydanoz, soğan, yaban mersini, siyah-yeşil çay, muz, narenciye meyveleri, karabuğday ve bitter çikolata gösterilmektedir

(Oomah and Mazza 1996). Bu bileşiklerin antialerjik, antioksidan, antienflamatuar, antimikrobiyal, antikanser ve antidiyare gibi aktivitelerinin olduğu bilinmektedir (Yamamoto and Gaynor 2001; Cushnie and Lamb 2005; Friedman 2007; Cazarolli *et al.* 2008; Cushnie and Lamb 2011; Manner *et al.* 2013). Flavonoid eksikliğinin kanser, yaşlanma, arterioskleroz, iskemik yaralanma, inflamasyon ve nörodejenaratif hastalıklar (parkinson, alzheimer) ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir. Farmasötik ilaçlar olarak tercih edilen flavonoidlerin potansiyel sağlık yararları konusunda araştırmalar devam etmektedir (EFSA/EFSA Panel on Dietetic Products 2010).

Glikozitler.

Glikozitler, bir şekerin glikozidik bağ yoluyla başka bir fonksiyonel gruba bağlandığı moleküllerdir. Çiçeklerin birçok renkli pigmentleri, doğal olarak bulunan boya maddeleri ve aromatik maddeler glikozit halindedir. Glikozitler bitkilerin yaprak, kabuk ve köklerinde, acı badem, kayısı ve şeftali gibi meyvelerin de çekirdeklerinde bulunurlar (Brito-Arias 2007). Özellikle meyankökü içinde bulunan glikozitler tıbbi olarak değerli olup çeşitli aşılar, balgam söktürücülerde, kortikoid ve iltihap önleyici ilaçlarda, progesteron gibi steroid hormonlarının üretilmesinde kullanılmaktadırlar (Nahrstedt and Davis 1983; Sun *et al.* 2009; Patra and Saxena 2009).

Doğal fenoller.

Bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen fenolik bileşikler organizmaların biyolojik mücadelesinde görev almaktadırlar (Robbins 2003; Amorati and Valgimigli 2012; Khoddami *et al.* 2013). Genellikle çevresel stres koşulları, UV radyasyonu ve yaralama gibi ekolojik baskılara cevap olarak bitkilerin fenolik bileşikleri sentezledikleri bilinmektedir (Robert 2013; Klepacka *et al.* 2011; Mishra and Tiwari 2011).

Yeşil ve siyah çay, kırmızı şarap, kahve, çikolata, zeytin ve zeytin yağı, baharatlar, şifalı bitkiler, kabuklu yemişler en çok fenol içeren gıdalardır. Fenoller gıdalarda lezzet verici ve kendine özgü renk oluşturmada (Carr *et al.* 2010), bitkileri haşere ve mikroorganizmalara karşı korumada (Perumalsamy *et al.* 2015), ishalin tedavisi için üretilen ilaçlarda, antimitojen, antikanserojen, antimikrobiyal ve antioksidan etkileri ile de alternatif tıp yöntemlerinde tercih edilmektedirler (Kopáček *et al.* 1995; Lee *et al.* 2005; Carr *et al.* 2010). Ayrıca fenoller patlayıcı madde, plastik, kağıt, boya, ilaç, pestisit ve antioksidan yapımında da kullanılırlar.

Fenazinler.

Bu bileşiklerinin bilinen biyolojik kaynakları *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. ve *Pantoea* ssp. bakterileridir (Pierson and Pierson 2010). Fenazinler toluen kırmızısı, indulin ve safranin gibi birçok boyanın ana maddesini oluşturmaktadırlar (Berneth 2000). Fenazin bileşikleri, bulundukları canlılarda çevresel şartlara uyumu ve rekabet güçlerinin artırılmasını sağlamaktadır. Örneğin, *Pseudomonas* tarafından üretilen fenazin-1-karboksilik asidi bu canlıların hayatta kalma şanslarını yükseltmektedir (Turner and Messenger 1986; Mc Donald *et al.* 2001; Dietrich *et al.* 2013).

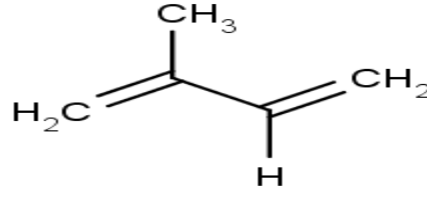
Bifeniller.

Renksiz kristaller oluşturan ve kendilerine özgü hoş kokuları olan aromatik organik bileşiklerdir. Bifenillerin kömür katranı, ham petrol ve doğal gazdan damıtma yoluyla izole edildikleri bilinmektedir (Adams and Richardson 1953). Dielektrik akışkanlar ve ısı transfer maddeleri olan poliklorlu bifenillerin (PCB) üretimi için sanayide, küf mantarlarının büyümesini inhibe ettikleri için narenciyelerin korunmasında, deri enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotiklerin, solunum, kas, iskelet sistemi ve kardiovasküler hastalıklarda analjezik olarak kullanılan ilaçların aktif grubunu oluşturmak için eczacılıkta, ayrıca optik parlaticılar, bitki koruma ürünleri ve plastik üretimi için de kullanılan bir ara üründür (Mouquinho *et al.* 2011).

Terpenler.

Sekonder metabolitler içerisinde belirlenmiş 2000'den fazla kimyasal bileşenin en geniş ve en yaygın grubunu terpenler oluşturmaktadır (Ceylan 1987). Terpenler, hidrokarbonların bir sınıfı olup ve esansiyel yağ, reçine, mum, kauçuk gibi doğal ürünlerin ana bileşenini meydana getirmektedirler. Çoğunlukla bitkisel kökenli olup özellikle çam (*Pinus*), köknar/göknar (*Abies*), ardıç (*Juniperus*) ve ladin (*Picea*) gibi iğne yapraklı bitkilerden elde edilmektedirler (Başer vd 2005). Ancak bu maddelerin *Papilionidae* (kılıçkuyruklular) familyasına ait kelebekler tarafından salgılandıkları da bilinmektedir. İzopren birimlerden oluşan terpenler, $(C_5H_8)_n$ ve katları şeklindeki kimyasal formüle sahiptir. İncelenen terpenlerin temel yapısı olan izopren (2-metil 1,3 bütadien), 5 karbon ve 2 çift bağ içeren kısa karbonlu birimlerdir (Şekil 1). Bu birimlerinin baş-kuyruk şeklinde bağlanarak düz zincirler veya halkalar şeklinde bileşikleri meydana getirdikleri bilinmekte ve izopren birimlerinden oluşan zincirlerin sayısı ile de terpenlerin sınıflandırılması yapılmaktadır. Terpenler içerdikleri izopren birim sayısına göre hemiterpen, monoterpen, seskiterpen, diterpen, sesterpen, triterpen, tetraterpen ve politerpenler

şeklinde sınıflandırılmaktadırlar (Tablo 1). İzopren birimlerinin peş peşe dizilimiyle oluşan terpenler, kimyasal yapılarına ve biyolojik özelliklerine göre farklılık göstermektedirler.



Şekil 1. İzopren birimi.

Tablo 1. *Terpenlerin Sınıflandırılması*

Terpenler	İzopren birimleri	Karbon atomları
Hemiterpenler	1	5
Monoterpenler	2	10
Seskitrpenler	3	15
Diterpenler	4	20
Sesterpenler	5	25
Triterpenler	6	30
Tetraterpenler (Karotenoidler)	8	40
Politerpenler	>100	>500

Kırca *et al.* (2006)'a göre, antioksidan, antimutajen ve antikarsinojen özellikler gösteren terpenler, bu potansiyel etkilerinden dolayı biyolojik yönden aktif bileşiklerin kaynağını oluştururlar. Günümüzde bu bileşenler, oldukça farklı bitkilerden ve onların ana etken maddelerinden elde edilip hem ekonomik hem de bilimsel yönden değerlendirilmektedir. Farag *et al.* (1989)'a göre, hayvan ve insanlarda hastalıklara direnç ve immün yeterlilik, antioksidatif mekanizma ile ilişkilendirilmektedir ve sardunya (*Pelargonium sp.*), limon nanesi (*Monarda citriodora*), misk cevizi (*Myristica fragrans*), yabani mercan köşkü (*Origanum vulgare* sp.), kekik (*Thymus vulgaris*) ve kozalaklı ağaçlar gibi çok farklı bitkilerden hatta mavi süt mantarı (*Lactarius indigo*)'ndan elde edilen terpenlerin bu özelliklere sahip olduğu Dorman *et al.* (2004) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca farmakolojik yönden de incelenerek aromaterapi ve fitoterapi alanında yine terpenlerden faydalanılmaktadır (Kırbağ ve Bağcı 2000).

Çeşitli araştırmalar sonucunda farklı özellikleri belirlenmiş olan terpenler gıda, temizlik, kozmetik, tıp, eczacılık gibi farklı sektörlerde sıklıkla tercih edilir hale gelmiştir. Bu sektörlerde üretilen ve günlük hayatta kullandığımız pek çok ürünün içinde farklı oranlarda bulunan bu maddeler kullanım şekline bağlı olarak canlı sistemlere değme ya da oral yolla alınmaktadır. Ayrıca son yıllarda alternatif tedavi amaçlı olmak üzere bitkisel kökenli çeşitli terpenlerin besin maddeleri ile alınması önerilmektedir. Görüldüğü gibi hayatın içinde farklı canlı grupları ve özellikle insanlar, çoğunlukla bitkisel ya da nadir olmakla birlikte hayvansal orijinli terpenlere sürekli maruz kalmaktadırlar. Sürekli maruziyetin canlıların üzerindeki yansımaları elbette kısa sürede gözlenemeyecektir. Hatta “bitkilerle beslenen ve farklı habitatlarda yaşayan binlerce farklı hayvansal organizmada terpenlerin etkileri neler olabilir?” sorusuna doğa koşullarında/ekosistem içinde cevap verebilmek bile oldukça güçtür. Ayrıca beklenen etkiler canlı vücudunda bulunan çeşitli koruma mekanizmaları ile baskılanabilir. Ancak sürekli alındığında doz-süre etkileşimi ile uygun organ/organellerde birikmeye devam da edebilir. Fakat bu durum canlının/canlıların bu maddelerden etkilenmediği anlamına gelmemektedir.

Oldukça geniş bir şekilde endüstriyel alanda ve alternatif tıp yöntemlerinde tercih edilen terpenlerin olumsuz bio-aktivitelerinin de bulunduğu dair bilgiler bu tez çalışmasının şekillenmesine neden olmuştur. Farklı gruplara ait terpenlerin doz-süre etkileşimine bağlı olarak model bir organizma olan *Drosophila melanogaster*'in Oregon-R yabanıl soyunda ömür uzunluğu toksisitesini ve yine *Drosophila melanogaster*'in mutant soylarında somatik mutasyon ve rekombinasyon testi kullanılarak genotoksisiteyi uyarıp/uyarmadığı bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.

Tez Kapsamında Kullanılan Terpenler

Monoterpenler.

İki izopren biriminden oluşan ve $C_{10}H_{16}$ moleküler formülüne sahip olan terpen çeşididir (Karahana 2007). 150'den fazla çeşidi olan monoterpenler bazı denizel organizmalarda feromonlarda ve yüksek yapılı bitkilerde böceklerden korunma için salınan kimyasal savunucularda bulunmaktadır (Umay 2007). Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda monoterpenlerin antiseptik, antibakteriyel ve antifungal özelliklerinin olduğu da bildirilmiştir (Zarrini *et al.* 2010; Nieto 2017). Monoterpen çeşitleri aroma ve koku verici katkı maddesi olarak gıdalarda (Berger 2007; Seifried *et al.* 2007), insektisidal ve pestisidal etkileri ile de ziraat ve hayvancılıkta (Janmaat *et al.* 2001; Sampson *et al.* 2005) kullanılmaktadır. Kekik (*Thymus vulgaris*)'ten elde edilen timol (TİM), *Mentha arvensis* (Japon nanesi) 'ten elde

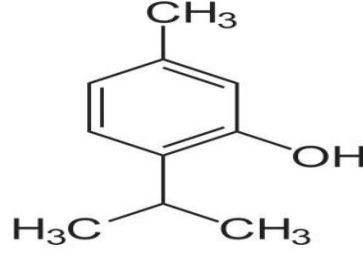
edilen mentol, *Origanum vulgare* (keklik otu)'den elde edilen karvakrol, *Pelargonium hybrida* L. (sardunya)'den elde edilen geraniyol, limon kabuğundan elde edilen limonen, *Litsea cubeba* (dağ biberi)'dan elde edilen sitral, *Lamiaceae* (ballıbabagiller)'den elde edilen linalool monoterpenlerin en bilinen örneklerindendir.

Timol.

Monoterpen ailesine ait olduğu bilinen TİM, nane, kimyon, okaliptus, defne, kekik gibi bitkilerden elde edilen bir metabolittir. İki izopren halkasından oluşur ve $C_{10}H_{14}O$ moleküler formülüne sahiptir (Şekil 2). TİM'in, antioksidan, antienflamatuar, antikarsinojen, antiseptik özelliklerinin olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Stammati *et al.* 1999; Renkema *et al.* 2017). Bu terpen antiseptik ve antioksidan etkileri nedeniyle ilaç ve kozmetikte, kalıcı olmayan pestisit olarak tarımda ve antioksidan, antifungal etkileri nedeniyle de gıda sektöründe kullanılmaktadır (Hammer *et al.* 1999).

Yapılan *in vitro* çalışmalarda da TİM'in çeşitli alanlarda kullanılabileceği bilgisi verilmektedir. Örneğin, gıdalarda kontaminasyonu önlemek (Nieto 2017) ve *Drosophila suzukii*'ye karşı temas toksisitesi sergilediği için kullanılmaktadır (Pavela 2008). Dall'Acqua (2013) tarafından yapılan çalışmada da TİM ve karvakrolün merkezi sinir sistemi hastalıklarında etkili olduğu bilinen asetilkolinesteraza karşı inhibitör etkili oldukları gösterilmiştir. *Timus vulgaris* (bahçe kekiği) ve *Thymbra spicata* (çay kekiği)'den elde edilen TİM, antimikrobiyal özelliğinden dolayı sabun, diş macunu, şampuan, deodorant ve ağız gargaraları da dahil olmak üzere birçok farklı üründe kullanılırken antioksidan özelliği ile de akciğer rahatsızlıklarında, balgam söktürücü ve kas gevşetici olarak önerilmektedir (Manou *et al.* 1988; Shapiro *et al.* 1994).

Ancak bu maddelerin “organizmalar üzerinde mutajenik, genotoksik ve sitotoksik etkilere sebep olduğu/olabileceği de çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Whysner and Williams 1996; Franzios *et al.* 1997; Karpouhtsis *et al.* 1998; Gomes-Carneiro *et al.* 1998; Stammati *et al.* 1999; İpek *et al.* 2005). Örneğin Azirak and Rencüzoğulları (2008)'nın yapmış oldukları bir çalışmada sıçanların kemik iliği hücrelerinde farklı dozlarda karvakrol ve timolün *in vivo* genotoksik etkileri araştırılmış ve hem karvakrol hem de TİM'in yapısal ve toplam kromozom anormalliklerini önemli ölçüde uyardıkları tespit edilmiş ve aynı zamanda tüm uygulama gruplarında mitotik indeksin de doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. TİM'in yapısal kromozomal anormalliklerini, kardeş kromatid değişimlerini ve mikronükleus oluşumunu uyardığı da yine Büyükleyle and Rencüzoğulları (2009) tarafından gözlenmiştir.



Şekil 2. Timolün kimyasal yapısı.

Timol'ün Kimyasal Özellikleri

Bilinen Diğer İsimleri: Kekik kafur, timik asit

CAS Kayıt No: 89-83-8

Kapalı Formülü: $C_{10}H_{14}O$

Molekül Ağırlığı: 150.22 g/mol

Erime Sıcaklığı: 49-51°C

Kaynama Sıcaklığı: 232°C

Yoğunluğu: 0.965 g/cm³

Suda Çözünürlüğü: Suda çok az çözünür

Fiziksel Durumu: Toz halinde ve renksiz

Saflık Düzeyi: %99.6

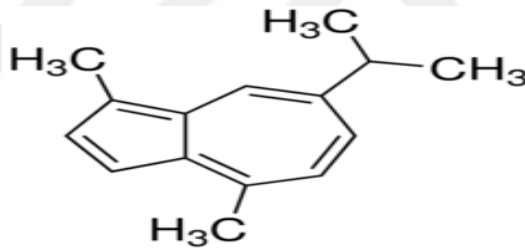
Seskiterpenler.

Terpenlerin en geniş sınıfı olan seskiterpenler üç izopren biriminden oluşurlar ve $C_{15}H_{24}$ molekül formülü ile gösterilirler. *Matricaria recutita* (Alman papatyası)'da bulunan bisabolol, *Artemisia absinthium* (pelin otu)'da bulunan kamazulen, *Vachellia farnesiana* (akasya ağacı)'da bulunan farnesol ve kimyon (*Cuminum cyminum*) papatya (*Asteraceae*) ile mavi süt mantarı (*Lactarius indigo*)'nda bulunduğu bilinen guazilen (GUA) önemli seskiterpenlerdir (Fischer *et al.* 1990; Connolly and Hill 1991). Yurdumuzda 133 kadar cinsi ve 1156'dan fazla türü olan *Compositae* familyasının üyeleri (Tosun and Özkal 2000), bazı *Juniperus* (Tümen ve Hafizoğlu 2003), *Salvia* (Bağcı ve Koçak 2008), *Centaurea* (Arif *et al.* 2004), *Prunella* L. (Ahmed ve Ezer 2008), *Satureja* (Azaz vd 2002) türleri ve *Umbelliferae* familyasındaki *Seseli* türleri (Tosun and Özkal 2003) bol miktarlarda seskiterpen yapısında bileşikler içerir.

Guazilen.

Seskiterpen grubuna ait olan GUA yabani kimyongiller olarak bilinen *Guaiacum officinale*, *Guaiacum sanctum*, *Guaiacum coulteri* türlerinde, papatya (*Matricaria recutita*)’da, mavi süt mantarı (*Lactarius indigo*)’nda ve yumuşak mercanlarda pigment olarak bulunmaktadır (Fiori *et al.* 2011). Üç izopren biriminden oluşan guazilen C₁₅H₁₈ moleküler formülüne sahiptir (Şekil 3). Çeşitli araştırmacılar GUA’nın da diğer terpenler gibi antioksidan, antimikrobiyal ve antienflamatuar özelliklere sahip olduklarını bildirmişlerdir (Guarrera *et al.* 2001; Sleha *et al.* 2014). Bu özelliklerinden dolayı da günümüzde kozmetik alanında saç ve cilt bakımı, banyo ve temizlik ürünleri, saç boyası yapımı gibi kişisel bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ancak kozmetik alanında cilt iyileştirici ajan olarak kullanılan GUA’nın yüksek dozlarda *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 suşlarına uygulandığı zaman mutasyona sebep olduğu görülmüştür (Wang *et al.* 2003). Togar *et al.* (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 (0-400 µg/mL⁻¹) sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir (Togar *et al.* 2015b).



Şekil 3. Guazilenin kimyasal yapısı.

Guazilen’in Kimyasal Özellikleri

Bilinen Diğer İsimleri: Vetivazulen, azulon

CAS Kayıt No: 489-84-9

Kapalı Formülü: C₁₅H₁₈

Molekül Ağırlığı: 198.309 g/mol

Erime Sıcaklığı: 31.5°C

Kaynama Sıcaklığı: 153°C

Yoğunluğu: 0.976 g/cm³

Suda Çözünürlüğü: Çözünür

Fiziksel Durumu: Mavi renkli ve katı

Saflık Düzeyi: %99

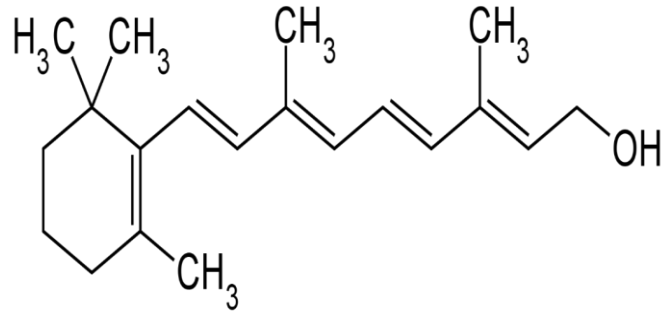
Diterpenler.

Dört izopren birimine sahip olan diterpenler $C_{20}H_{32}$ formülüyle gösterilirler. Doğada yaygın olarak bulunurlar ve çeşitli farmakolojik etkili bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Örneğin, *Taxus* (porsukgiller) cinsi bitkilerden elde edilen diterpenlerin günümüzde prostat, yumurtalık, akciğer ve meme kanseri tedavisinde kullanıldıkları çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Di Costanzo *et al.* 2009; Çetin 2011). Balık, süt ürünleri ve ette bulunan retinol, havuç, ıspanak ve balıkta bulunan retinal ve iğne yapraklı ağaçların reçinelerinde bulunan abietik asit (ABA) diterpenlerin yaygın örnekleridir.

Abietik asit.

Bu çalışmada genotoksitesisi test edilen ve diterpen çeşidi olan ABA terpeni özellikle kozalaklı ağaçların reçinelerinde yaygın olarak bulunmaktadır. $C_{20}H_{30}O_2$ moleküler formülüne sahip olan ABA, dört izopren biriminden oluşmaktadır (Şekil 4). Fallarero *et al.* (2013) ABA'nın bakteriyel enfeksiyonlara karşı güçlü bir iyileştirici ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Yine *Pimenta racemosa* (yenibahar bitkisi)'dan elde edilen ABA diterpeninin fare ve sıçanda meydana gelen kulak, pençe vb. ödemlere karşı antienflamatuar etki gösterdiği belirlenmiştir (Fernandez *et al.* 2001) ve antimikrobiyal, antioksidan özelliklere sahip olduğu da ayrıca farklı bir çalışmada ifade edilmiştir (Breitmaier 2006). ABA sabun üretiminde, vernik ve cila yapımında, ayrıca ilaç ve kozmetik sektöründe de kullanılmaktadır (Hammer *et al.* 1999).

Ancak terpenlerin mutajenik ve genotoksik etkilerinin olduğuna dair bilgilere de dayanarak yapılan birkaç çalışmada (Bhardwaj *et al.* 2001; Wang *et al.* 2003; Clark 2009; Moon *et al.* 2011) dehidroabietik asit ve abietik asit reçine metabolitlerinin 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 küçülmenin meydana geldiği gözlenmiştir (Kamaya *et al.* 2005). Yine Peng and Roberts (2000)'a göre, akut uygulama ile izopimarik asit, pimarik asit ve ABA metabolitleri *Salmo gairdneri* (gökkuşağı alabalığı) ve *D. magna*'da toksik etkiye dayalı olarak bu organizmaların hayatta kalabilme oranlarını azaltıcı etkilidir.



Şekil 4. Abietik asitin kimyasal yapısı.

Abietik Asit'in Kimyasal Özellikleri

Bilinen Diğer İsimleri: Abietat, silvik asit

CAS Kayıt No : 514-10-3

Kapalı Formülü: $C_{20}H_{30}O_2$

Molekül Ağırlığı: $302.458 \text{ g/mol}^{-1}$

Erime Sıcaklığı: 173.5°C

Kaynama Sıcaklığı: 482°F , 9 mm Hg

Yoğunluğu: 1.06 g/ml

Suda Çözünürlüğü: Çözünmez, aseton, DMSO ve etanolde çözünür

Fiziksel Durumu: Toz halinde ve sarı renkte

Saflık Düzeyi: %75

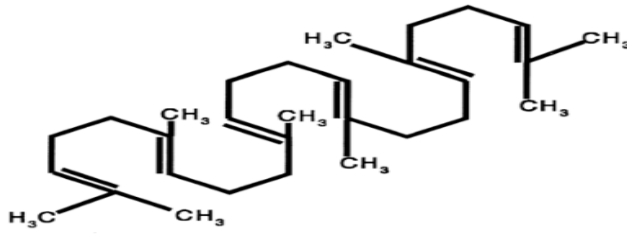
Triterpenler.

$C_{30}H_{48}$ formülüne ve altı izopren birimine sahip olan terpenlerdir. Hayvanlar, bitkiler ve mantarların tümü tarafından triterpenler üretilmektedir (Davis and Croteau 2000). Köpek balığı karaciğer yağında bulunan skualen (SKU) ile soya fasulyesi, baklagiller ve kuruyemişlerde bulunan stigmasterol, oleanan ve ursan bu gruba örnek olarak verilebilir. Antioksidan özelliklerinden dolayı gıda ve kozmetikte kullanılan triterpenler aynı zamanda ilaç endüstrisinde de tercih edilmektedirler (Huang *et al.* 2009).

Skualen.

Altı izopren biriminde oluşan ve $C_{30}H_{50}$ moleküler yapısına sahip olan SKU, bir triterpen metabolitidir (Şekil 5). Bu metabolit amarant çiçeği, zeytin, buğday tohumu, pirinç kepeği yağları ve köpekbalığı karaciğer yağı gibi farklı ürün gruplarında bulunmaktadır. Fitol, stigmasterol, geraniol, abietik asit, oleanan terpenleri gibi SKU'nun da antioksidan, antienflamatuar ve nöroprotektif etkilere sahip olduğu Rani *et al.* (2012) tarafından

bildirilmiştir. *Bougainvillea glabra* (begonvil) yapraklarından elde edilen triterpen çeşitlerinin antibakteriyel (Gupta *et al.* 2009), anti-hiperglisemik (Edwin *et al.* 2006), antifungal (Alanis-Garza *et al.* 2007), analjezik ve antienflamatuar aktiviteye sahip olduğu da bildirilmiştir (Elumalai *et al.* 2012). SKU'nun bilinen antioksidan ve antikanserojen özellikleri nedeniyle cilt korunması, saç dökülmesinin önlenmesi gibi amaçlarla kozmetik ve ilaç endüstrilerinde kullanıldığı bilinmektedir (Pappas 2009). Huang *et al.* (2009) tarafından yapılan toksikolojik çalışmalarda kozmetik ürünlerde kullanılan SKU'nun yüksek konsantrasyonlarda düşük akut toksisiteye sahip olduğunu ancak ciltte tahriş edici olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 5. Skualenin kimyasal yapısı.

Skualen'in Kimyasal Özellikleri

Bilinen Diğer İsimleri: Supraen, spinesen

CAS Kayıt No: 111-02-4

Kapalı Formülü: $C_{30}H_{50}$

Molekül Ağırlığı: 410.73 g/mol

Erime Sıcaklığı: $-5^{\circ}C$

Kaynama Sıcaklığı: $285^{\circ}C$

Yoğunluğu: 0.858 g/cm³

Suda Çözünürlüğü: Suda çözünmez ya da çok az çözünür

Fiziksel Durumu: Hafif bir kokuya sahip berrak, hafif sarı bir sıvıdır

Saflık Düzeyi: %98

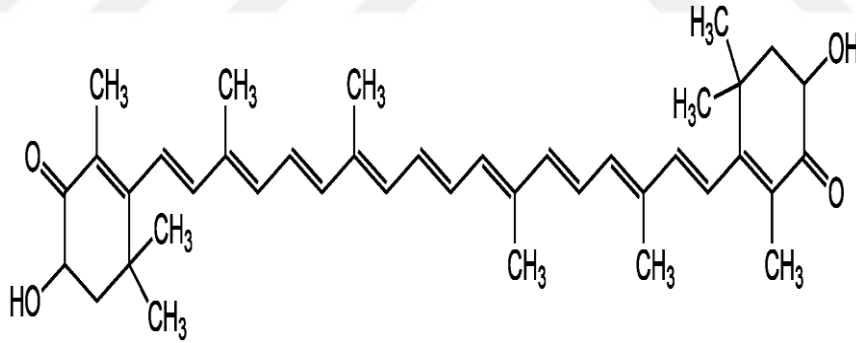
Tetraterpenler (Karotenoidler).

Bu terpenler $C_{40}H_{56}$ formülü ile tanımlanmaktadır (Davis and Croteau 2000). Sekiz izopren biriminden oluşan tetraterpenlere örnek olarak şeftali, havuç, kayısı, ıspanak ve biberde bulunan karotenoidler gösterilebilir. Karotenler, ışık yakalama, antioksidan aktivite ve serbest radikallere karşı koruma, bitki hormonlarının sentezi ve membranların yapısal bileşenleri olarak önemli biyolojik fonksiyonlara sahip tetraterpenlerdir (Karahana 2007). Karotenoidler ayrıca gıda ve ilaç endüstrisi için yüksek değerli bileşiklerdir ve fotosentetik ve fotosentetik olmayan

organizmalar tarafından sentezlenebilmektedir. Ksantofiller doğada yaygın olarak tetraterpen pigmentlerinin başka bir grubudur (Domonkos *et al.* 2013). Domateste yüksek oranlarda bulunan fitoen ve fitofluen de tetraterpen olup karaciğer, akciğer, meme, prostat, kolon ve cilt dahil olmak üzere birçok kanser türüne karşı antikanser özellik göstermektedirler (Khachik *et al.* 2009). Bu karotenoidlerde antioksidan ve antienflamatuar ajan olarak işlev görmekte ve özellikle cildin korunmasında görev almaktadır (Fuller *et al.* 2006).

Astaksantin.

Tetraterpen ailesine ait sekiz izopren halkasından oluşan ve $C_{40}H_{52}O_4$ moleküler yapısına sahip olan ASTA kırmızı renge sahip bir pigmenttir (Şekil 6). Rodofit olarak bilinen alglerde bulunan bu pigment somon, alabalık, istakoz, karides ve diğer denizel organizmalarda pembe veya kırmızı rengin oluşumuna neden olmaktadır. ASTA da diğer terpen çeşitleri gibi antioksidan, antienflamatuar, antitümör aktiviteler göstermektedir. Örneğin, alfa-tokoferol ve ASTA ile yapılan bir çalışmada tavşan aterom (atardamar duvarında gelişen lezyon)'larında apoptoz gerilemiştir (Li *et al.* 2004). Hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçlarda ASTA'nın sıklıkla tercih edildiği bilinmektedir (Hussein *et al.* 2006). Aynı zamanda antitümör (Jyonouchi *et al.* 2000), antiaging (Arıca 2017) ve gıda renklendirici özelliklerinin olduğu da bildirilmiştir.



Şekil 6. Astaksantin kimyasal yapısı.

Astaksantin'in Kimyasal Özellikleri

Bilinen Diğer İsimleri: Ovoester, trans-astaksantin

CAS Kayıt No : 472-61-7

Kapalı Formülü: $C_{40}H_{52}O_4$

Molekül Ağırlığı: 596.84 g/mol

Erime Sıcaklığı: 216°C

Kaynama Sıcaklığı: 774°C

Yoğunluğu: 1.071 g/mL

Suda Çözünürlüğü: Aseton, dimetilsülfoksit içinde çözünür.

Fiziksel Durumu: Kırmızı renkte ve toz halinde

Saflık Düzeyi: %97

Yaşlanma

Yaşlanma, hücrelerden organlara kadar tüm yapılarda meydana gelen oldukça karmaşık bir süreç olup, canlı organizmaların büyüme ve gelişmesinde zamanla oluşan hasarların toplamı ve fonksiyonel olarak yeteneklerin azalmasıdır. Geri dönüşü olmayan, fonksiyonel ve yapısal değişikliklerin tümünü kapsayan yaşlanma olgusu doğumla başlayan fizyolojik bir süreçtir (Sadock and Sadock 2006). Bu süreç genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucunda gelişen ancak bireyler arasında sabit olmayan dinamik bir olaydır (Minciullo *et al.* 2016). İlerleyen yaşla birlikte çeşitli çevresel değişikliklere karşı artan hassasiyet sebebiyle hastalık gelişimine ve ölüme neden olan etkilerin zamanla birikiminin bir sonucu olan yaşlanma her canlıda görülmektedir (Harraan 1955; Cutler 1991). Yaşlılığın başlangıcı ve ömür uzunluğu türden türe değiştiği gibi aynı tür içinde dahi cinsiyet, eğitim düzeyi, ekonomik koşullar, fizyolojik ve psikolojik yaşa göre de kişisel farklılıklar göstermektedir (Arıoğlu vd 2006). Laboratuvar koşullarında ve doğal ortamda yapılan çalışmalar aynı türe ait popülasyonların ömür uzunlukları, yaşlanmanın genetik olarak düzenlendiğine ilişkin en önemli kanıtları oluşturmaktadır (Çalışkan 2019). Yaşlanma ile ilgili çalışmaların 2500 yıl öncesine kadar uzanan bir geçmişi bulunmakta ve son yıllarda da bu konuya özellikle yoğunlaşılmaktadır (Cristofalo 1991). Yaşlanma süreci hücreden hücreye, dokudan dokuya ve organizmadan organizmaya farklı şekilde meydana geldiği için bu sürecin açıklanması ve anlaşılması adına birçok teori geliştirilmiştir (Troen 2003). Bu teoriler geliştirilirken şu 5 temel ortak özellik üzerinde durulmaktadır; yaşla birlikte artan mortalite, yaşlanan dokulardaki biyokimyasal değişiklikler, fizyolojik kapasitede azalma, çevresel uyarılara karşı verilen tepkideki azalma, hastalığa karşı artan duyarlılık ve savunmasızlık (Ferrucci 2008). Oluşturulan teoriler anlamaya yönelik çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Bu sınıflandırmaların bilinen en yaygın hali Tablo 2’de gösterilmektedir.

Tablo 2. Yaşlanma Teorilerin Sınıflandırılması

Dış Etkenler	İç Etkenler (Gelişimsel-Kalıtımsal)
Somatik Mutasyon ve DNA Tamir Teorileri	Uzun Yaşam Genleri
Proteinlerin Değişikliğe Uğraması	İvmelenmiş Yaşlılık Sendromları
Serbest Radikal Teorisi	İmmunolojik Teori
	Hücrel Yaşlılık Teorisi
	Hücre Ölümü Teorisi
	Antagonistik Pleiotropi Teorisi

Yaşlanma teorileri.

Dış etkenler.

Evrimsel alanda yaşlanma teorisini ilk geliştiren biyolog August Weismann 1891 yılında, popülasyondaki yaşlı üyelerin elemine edilmesi için doğal seleksiyon tarafından belirlenen spesifik bir ölüm mekanizmasının olduğuna inanmış ancak bu mekanizmanın doğal seçim tarafından nasıl meydana getirildiğini tam olarak ifade edememiştir (Williams 1957). Canlılar arasındaki ömür uzunlukları farklılıklarının meydana gelmesinde genetik ve çevresel etkenlerin rol oynadığı bilinmekte ve daha uzun ömür için bu etkenler üzerinde oluşturulacak manipülasyonların etkili olabileceği düşünülmektedir (Freeman and Herron 2007). Ancak ortaya atılan yaşlanma teorilerinde doğal seçilimin daha uzun ömür sağlamadığı görülünce yaşlanmayı açıklamak için çeşitli teoriler oluşturulmuştur.

Somatik mutasyon ve DNA tamir teorileri.

Medawar tarafından 1952 yılında ileri sürülen bu teoride yaşlanma, hücrelerde rastgele oluşan değişimlerin birikmesi olarak tanımlanmakta ve doğal seleksiyon azaldıkça organizmalarda biriken somatik mutasyonların sayılarının arttığı düşünülmektedir (Vijg 2000). Hücrelerde somatik mutasyonlara sebep olabilecek her türlü madde ya da etken bu teori kapsamında kabul edilmektedir. Örneğin radyasyona bağlı oluşan mutasyon frekansındaki artış sonucu hücre fonksiyonlarında meydana gelen azalmalar neticesinde görülen ölümler bu teoriyi güçlendirmektedir (Ljubuncic and Reznick 2009). Somatik hücrelerde yaşam boyu biriken mutasyonların birçok hastalığa neden olduğu yaş ilerledikçe onkogenik mutasyonların somatik hücrelerde birikmesi sonucu kanser görülme sıklığının arttığı belirtilmektedir (Curtis 1966).

DNA tamir mekanizmasına dayandırılan teori ise somatik mutasyon teorisinin daha özel şekli olup, DNA hasarı tespiti, hasara verilen cevabı, tamiri ve apoptoz ile hücre siklusunun kontrolü aşamalarını kapsamaktadır (Slijepcevic 2006). Bu teori değişik türlerden elde edilen hücre kültürlerinde UV kullanılarak DNA’da meydana getirilen hasara karşı verilen cevapla yaşam uzunluğu arasındaki ilişkiyi anlamaya yönelik yapılan çalışma ile geliştirilmiştir. Yeterli olmasa da elde edilen verilere göre yaşla DNA tamir yeteneğinin azalmadığı ancak DNA özel bölgelerinin tamir yeteneğinde azalmanın olduğu görülmüş bunun da yaşlanma olgusuyla doğrudan ilişkili olduğu kabul edilmiştir (Orgel 1963).

Ölümcül hata teorisi.

Bu teoriye göre yaşlanmaya RNA’dan sentezlenen enzim ve proteinlerde birikmiş olan hataların neden olduğu savunulmaktadır (Arı vd 2008; Öksüzokyar vd 2016). Protein sentezi sırasında hatalar meydana gelebilir ancak sağlıklı hücrelerde bu hatalar sentez esansında düzeltilir ve temizlenir. Fakat yaşlanmış hücrelerde bu hatalar elemine edilemez ve birikerek hücreleri olması gereken zamandan önce yaşlanma döngüsüne sürükleyerek organizma ölümüne sebep olduğu düşünülmektedir (Levine and Stadtman 1996).

Proteinlerin değişikliğe uğraması.

Proteinlerin yapısında oluşan değişiklikler aynı zamanda fonksiyonlarında da meydana gelebilmektedir (Nalbant 2006). Bu değişiklikler protein yapısındaki enzimlerle gerçekleşmekte ve böylece enzimlerin fonksiyonlarında, reaksiyonlara ve diğer etkenlere verilen cevaplarda da değişiklik meydana getirmektedir (Gracy 1985). Bu teoride de proteinlerin hem yapısal hem de fonksiyonlarında meydana gelen değişikliklerin metabolik reaksiyonlarda aksaklıklar meydana getirerek farklı sağlık problemlerine yol açabilecekleri ve yaşlanmaya neden olabilecekleri kabul edilmektedir.

Serbest radikal teorisi.

Bu teoride yaşlanmanın sebebi aerobik metabolizma esnasında oluşan serbest radikallerin dokularda birikmesiyle oluşan hasarlara bağlanmaktadır (Aslan ve Hocaoglu 2017). İlk olarak 1956 yılında Harman tarafından oluşturulan bu teori yaşlanma teorileri arasında en çok kabul gören teoridir (Harraan 1955). Serbest radikaller yapılarında bağ yapmamış elektron bulunduran, bu sebepten dolayı da farklı ataomların elektronlarını paylaşmak için oldukça aktif olan maddelerdir (Nalbant 2006). Hem iç hem de dış etkenlere bağlı olarak meydana gelen serbest radikaller oksijenli solunum sonucunda doğal olarak üretilmektedir. Oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerin iyonları, hidroksil

radikalleri bilinen en önemli serbest radikallerdir (Demir ve Uysal 2017). Metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan bu radikaller uygun konsantrasyonlarda normal aktivite gösterirken hücre içinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak toksisite gösterebilmektedirler. Hücre zarını, proteinleri, lipitleri DNA'yı hasarak uğratarak genetik ve metabolik bozukluklara ve çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Harman 1981; Ames *et al.* 1993; Droge 2002).

Serbest radikaller dış etkenler ile de vücut içerisinde oluşturulabilmekte ve oluşumuna neden olan faktörlere oksidan denilmektedir. Radyasyon, virüsler, UV ışınları, enfeksiyon hastalıkları, stres, çeşitli ilaçlar ve kimyasallar gibi etkenler dış kaynaklı oksidanlara örnek olarak verilebilir (Kılınç ve Kılınç 2003). Oksidanlar serbest radikal oranının artmasına yol açarak vücut içerisindeki tüm moleküllerin etkilenmesine neden olmaktadır. Vücut içerisindeki tüm moleküller oksidanlardan etkilenmektedir. Ancak bu moleküllerden en hassas olanları arasında lipitler bulunmaktadır. Hücre membranlarında bulunan lipitler serbest radikallerle etkileşime girerek peroksidasyon ürünleri meydana getirirler ki yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak bilinen peroksidasyon oldukça zararlı olup geri dönüşümsüz mebran hasarları oluştururlar (Alem 2007).

Aynı zamanda lipit peroksidasyonu gibi geri dönüşü olmayan hasarlara neden olan serbest radikallere karşı vücut içerisindeki denge için bir savunma mekanizması da bulunmaktadır. Bu savunma sistemi antioksidan savunma sistemi olarak bilinir. Antioksidanlar, oksidanların meydana getirdiği oksidatif strese karşı görev yapmaktadır. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon gibi antioksidanlar vücut içinde doğal olarak bulunurken besinlerle alınanları da mevcuttur (Kılınç ve Kılınç 2003). Canlılarda oksidan ve antioksidan dengesinin korunması sağlık için son derece önemlidir. Bu teoriye göre yaşam boyu oksidanlara olan sürekli maruziyetin dengeyi olumsuz yönde etkilediği ve biyolojik fonksiyonlarda değişikliklere yol açarak hastalıklara ve ölümlere neden oldukları düşünülmektedir (Ames *et al.* 1993). Yaşa bağlı olarak serbest radikallere yeteri kadar cevap verilemediğinden vücut içerisinde biriken radikallerin yaşlanma ile doğrudan ilişkili olduğu kabul görmektedir (Sestini *et al.* 1991; Orr and Sohal 1994; Fışkın *et al.* 1994; Jordens *et al.* 1999; Zou *et al.* 2000). Diğer teoriler gibi bu teorinin de tek başına yaşlanmayı açıklamayacağı da unutulmamalıdır. Ancak bilimsel olarak yaşlanma bu teori ile de tam olarak açıklanamasa da yaşlanmayı yavaşlattığı koenzim, tokoferol, nikotinamid, askorbik asit, kalori kısıtlaması, A, E, C vitaminleri ve çeşitli antioksidanlar ile gözlenmiştir (Wallace 1992; Zainal *et al.* 2000).

İç Etkenler.

Uzun yaşam genleri.

Organizmalarda hücre içinde iç veya dış etkenlere bağlı meydana gelebilecek olan hasarlara karşı çeşitli kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar da görevli genler “uzun yaşam genleri” olarak tanımlanmakta ve oluşan hasarlara uygun yanıtlar oluşturarak hasarın onarılmasında görev yapmaktadır (Jazwinski 1996; Murakami and Johnson 1996). Bu teoride de hasarlara karşı uygun yanıt verilememesi durumunda hücre içinde biriken hasarların yaşlanmaya neden olduğunu savunmaktadır.

İvmelenmiş yaşlılık sendromları.

İvmelenmiş yaşlılık sendromlarında üzerinde en çok araştırma yapılan türler arasında Werner, Down ve Hutchinson-Gilford Sendromları yer almaktadır. Bu sendromların taşımış oldukları yaşlanmanın bütün genotipik ve fenotipik etkilerinin kısa sürede gözleniyor olması araştırmacılar için çok önemlidir (Nalbant 2006). Sendromlarda görülen yaşlılık etkilerinin belirlenmesi amacıyla modellemeler yapılmış ancak oluşturulmuş modellemeler ile amaçlanan hedefe ulaşılamamıştır. Halen devam eden araştırmalarda bu sendromların taşımış oldukları yaşlılık aktiviteleri değerlendirilmektedir.

Nöroendokrin teori.

Bu teoriye göre yaşlanmanın, organizmanın hormonal mekanizmasında meydana gelen fonksiyon kaybına bağlı olarak geliştiği savunulmaktadır (Nalbant 2006). Metabolizmada ve özellikle hipofiz bezinde oluşan değişikliklerin yaşlanmada önemli rol oynadığı görüşü hakimdir (Cutler 1991). Bu teoride özellikle yaşlanma negatif feedback mekanizmasında oluşan fonksiyon kaybına bağlanmakta ve bunu destekler çalışmaların var olması da bu görüşü güçlendirmektedir. Şöyle ki; dişi farelerle yapılan bir testte üretkenlik azalmasına bağlı olarak hipofiz fonksiyonlarında da önemli düzeyde azalma görülmüştür (Mobbs 1996). Aynı zamanda Pineal bezden salgılanan ve uyku düzenlenmesinde görev alan “melatonin” hormonu (Reiter 1994) ile böbrek üstü bezinden salgılanan “dehidroepiandrosteron (DHEA)” hormonunun vücutta bulunan normal seviyesindeki azalmaya (Barrou *et al.* 1997) bağlı olarak yaşlanma meydana gelebileceği bildirilmiştir. Elde edilmiş bu verilerde hormonal mekanizmalarda meydana gelen hasarların yaşlanmayla doğrudan ilişkili olabileceği yönünde önemli bir kanıttır.

İmmunolojik teori.

İmmunolojik teoride yaşlanma endokrin teorideki gibi hormon azalmasına bağlanmaktadır. Ancak bu teoride hormon azalmasının bağışıklık sistemi üzerindeki etkisinin yaşlanmada olan rolüyle ilgilenilmektedir. Şöyle ki; bağışıklık sisteminde görev alan T-lenfosit hücrelerinin (Walford 1980) kalitesinde ve sayısında meydana gelen düşüşe neden olarak timüs bezinde meydana gelen fonksiyon azalması gösterilmektedir. Timüs bezinin fonksiyonlarında ergenliğe girildikten sonra azalma görülmesi ise bağışıklık sisteminde zayıflamaya, çeşitli otoimmün hastalıkların baş göstermesine ve bunun da yaşlanmaya sebebi olabileceği düşünülmektedir (Cutler 1991).

Hücrel yaşlılık teorisi.

Hücrel yaşlanmada çeşitli etkenlere bağlı olarak oluşan yaşlanma teorilerden farklı olarak kromozomların uçlarında bulunan ve kromozomal stabilite ile hücre ölümüyle ilişkili olan telomer yapıları ile yaşlanmanın meydana geldiği düşünülmektedir (Tosato *et al.* 2007). Organizmalarda telomer boyları sabit olup sürekli bölünebilen ve hücrel yaşlanmanın görülmediği hücre tipleri olan üreme hücreleri ve kök hücrelerin aksine somatik hücrelerde her bölünme esnasında telomer boyunda kısalma meydana gelmektedir. Meydana gelen bu kısaltmalar hücreyi ölüme bir adım daha yaklaştırmaktadır (Olovnikov 1996; Hemann *et al.* 2001). Hücrelerde telomer uzunluklarını belirleyen telomeraz enzimi ise her hücre tipinde bulunurken aktivitesi hepsinde farklıdır. Telomeraz aktivitesi hücrelerde arttırılarak yaşlanmanın durdurulması ya da yavaşlatılması düşünülmüş ancak daha sonraları hücrelerde kanserleşme meydana gelebilmesi riskinden dolayı gerçekleştirilememiştir (Gülmez 2014). Hücrelerde telomeraz aktivitesini ve telomer boyundaki kısaltmaları stres, sigara, obezite, egzersiz eksikliği, kötü beslenme alışkanlıkları ve reaktif oksijen türlerinin de etkilediği bu teoride kabul görmektedir (Desai *et al.* 2010).

Hücre ölüm teorisi.

Hücrelerde meydana gelen nekroz ve apoptoz hücre ölümlerinden; nekroz rastlantısal olarak gerçekleşirken, apoptoz kontrollü bir ölüm yolağıdır. Hücre içi dengenin korunmasında apoptoz önemli olup bu yolda meydana gelen herhangi hasar hücrede fonksiyon kaybına neden olarak maling hücreler oluşumuna neden olmaktadır (Nalbant 2006). Bu teoride de ölüm yolaklarında stres, radikaller vb. etkilere dolay meydana gelebilecek herhangi bir hasarın hücrel yaşlanmaya neden olduğu savunulmaktadır.

Antagonistik pleiotropi teorisi.

Antogonistik teoriye göre yaşam süresini düzenleyen allellerin, yaş ile beraber ömür uzunluğu üzerinde olumsuz etkiye sahip olabileceklerini savunulmaktadır. Şöyle ki; yaşam süresini düzenleyen genlerin sahip oldukları pleiotropik etkilerinin yaşa bağlı olarak ömür uzunluğunu olumsuz etkileyerek yaşlanmayı hızlandırdığı düşünülmektedir (Williams 1957; Rose 1999).

Sonuç olarak açıklanan teorilerin tek başına yaşlanmayı açıklamak için yeterli olmadığı, yaşlanma olgusunu ifade ederken tüm bu teorilerin birlikte değerlendirilmesi gerektiği ve aynı zamanda yaşlanmayı etkileyecek anasal yaş, cinsiyet, genetik yapı, beslenme, radyasyon gibi diğer faktörlerle beraber ele alınması gerektiği anlaşılmaktadır. Yaşlanmayı etkileyebilecek bu faktörlerin *in vivo* ömür uzunluğu test yöntemindeki etkileri yapılan çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir. Bu etkenler iç ve dış faktörler olmak üzere 2 şekilde sınıflandırılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. *Yaşlanmayı Etkileyen İç ve Dış Faktörler*

İç Faktörler	Dış Faktörler
Anasal yaş Fekundite (Yumurta üretimi) Cinsiyet Genetik yapı	Beslenme Radyasyon Popülasyon yoğunluğu Işık Sıcaklık

Yaşlanmaya etkileyen diğer iç ve dış faktörler.

İç faktörler.

Anasal yaş.

Bilim dünyasında anasal etki olarak kabul gören ve araştırılan bu faktörün genetik olmayan fakat sitoplazmik ya da epigenetik faktörler ile aktarılan anne yaşının ömür uzunluğu üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Lints and Lints 1969). *Philodina citrina* (rotifer) hayvanları kullanılarak yapılan bir çalışmada yaşlı dişiler tarafından bırakılan yumurtalardan gelişen bireyler incelenmiş ve ömür uzunluklarının giderek kısaldığı belirlenmiştir (Lansing 1952).

Drosophila serreta ile yapılan farklı bir çalışmada da yine artan anasal yaş ile beraber yavru bireylerin ömür uzunluklarının kısaldığı gözlenmiştir (Hercus and Hoffman 2000). Yapılan bu çalışmalardan elde edilen verilerin aksine Yılmaz *et al.* (2008), annenin yaşı ile yavru dölün ömür uzunluğu arasında bir ilişki olmadığını *D. melanogaster* bireyleri üzerinde belirlemiş olup, Kern *et al.* (2001)'da anasal yaş arttıkça yavru döl ömür uzunluğunun azalmasını, annede geç yaşlarda etkili olan zararlı mutasyonların etkisine bağlamışlardır.

Fekundite (Yumurta üretimi).

Çiftleşmenin ve yumurta üretiminin dişilerin ömür uzunlukları üzerinde olumsuz etkileri olduğu Tatar and Promislow (1997) tarafından bildirilmiştir. Üreme ve yaşam süresi arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada bakire (virgin) dişilerin, çiftleşmiş ve yumurta üreten dişilere göre daha uzun bir yaşam süresine sahip oldukları belirlenmiştir (Gowen and Johanson 1946). Ömür uzunluğu üzerinde etkili olan bu parametrenin cinsiyete bağlı olarak değişkenlik gösterdiği de Iliadi *et al.* (2009) tarafından bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda *D. melanogaster*'in yabanıl tip Oregon-R (OR) ve Canton-S (CS) soylarında çiftleşmiş erkeklerin çiftleşmemiş erkeklere göre, virgin dişilerin de çiftleşmiş dişilere göre daha uzun yaşadıkları gözlenmiştir.

Cinsiyet.

Cinsiyete bağlı olarak meydana gelen ömür uzunluğu farklılıkları yapılan çeşitli çalışmalar ile dişilerin erkeklere göre daha uzun yaşam süresine sahip oldukları belirlenmiştir. Eşey karaktere bağlı olarak oluşan bu farklılığın metabolizma kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Metabolizmal farklılıkların araştırıldığı bir çalışmada *D. melanogaster*'in dişi ve erkek bireyleri kullanılmış ve dişilerde DNA, RNA ve protein seviyelerinin erkek bireylere göre çok daha fazla olduğu görülmüştür (Samis *et al.* 1971).

Genetik yapı.

Bir organizmanın yaşam periyodu ve değişik soylarında görülen gelişim periyotları ve yumurta verimlerindeki farklılıkların genetik etmenlere bağlı olduğu düşünülmektedir (Keller and Mitchell 1964; Mc Millan *et al.* 1970; Lints 1971). Ömür uzunluğu üzerinde gen kombinasyonlarının ve meydana gelen spesifik mutant genlerin etkisinin olduğu *D. melanogaster* ile yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Gonzales 1923). Yapılan çalışmalarda *D. melanogaster*'in yabanıl olmayan ve 5 mutant genini barındıran soylarında yaşam sürelerinin yabanıl soylara oldukça kısa olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu 5 mutant genini

barındıran mutant soyun 5 genden her birine ayrı ayrı sahip olan mutant soylara göre daha kısa yaşadıkları da görülmüştür.

Yine *Drosophila*'nın yabanıl ve mutant soyları ile yapılan farklı çalışmalarda soylar ait genetik yapı çeşitliliğinin bir nedeni olarak gelişim dönemleri, yavru döl sayıları ve yumurta verimlerinde farklılık gözlenmiştir (Yeşilada ve Bozcuk 1991). Bireylerde oluşan heterozigotluk seviyesi arttığında gelişimin hızlandığı ve yumurta verme kapasitesinde de yükseliş olduğu tespit edilmiştir (Keller and Mitchell 1964). *Drosophila*'nın yabanıl bireylerine göre artmış heterozigotlukları reaktif oksijen türlerini elemine eden enzimlerin mekanizmalarının daha aktive edilmiş oldukları, aynı zamanda bunun da ömür uzunluğu üzerinde olumlu etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Orr and Sohal 1994).

Dış faktörler.

Beslenme.

Diğer canlılarda olduğu gibi böceklerde de beslenme, gelişimi etkileyen parametrelerden biridir. Özellikle laboratuvar ortamında kültüre edilmiş olan böceklerin besiyeri ortamlarının uygunsuzluğu gelişimi yavaşlatmaktadır (Ashburner 1989). Yine laboratuvar ortamında kültüre alınan *D. melanogaster* ile yapılan bir çalışmada besiyeri ortamında zamanla meydana gelen değişikliklerin ömür uzunluğu üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda besiyeri ortamında bulunan larval yoğunluğa bağlı olarak biriken nitrojenli artıkların besiyerinde fizyolojik strese neden olduğu görülmüştür. Oluşan bu fizyolojik stresinde larvaların yetersiz beslenmesine neden olarak larvaların bir sonraki gelişim evresine geçiş süresinin uzamasına ve gelişimin normale göre daha uzun sürede tamamlanmasına yol açtığı gözlenmiştir (Foley and Luckinbill 2001). Beslenmenin gelişim süresi üzerindeki etkilerinden yola çıkarak yapılan çeşitli araştırmalarda bu beslenme bileşenlerinin çeşitli parametrelerinin de yaşam süresi üzerindeki etkileri deneysel olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Örneğin; *Drosophila* besiyerinde maya miktarını azaltarak besinsel kısıtlama yapılmış ve besinsel kısıtlamaya maruz kalan *Drosophila* bireylerinin kontrol gruplarına göre yaşam sürelerinin daha uzun olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda besin kısıtlamasına maruz bırakılan bireylerin açlık stresine karşı normal şartlarda yaşatılan bireylere göre daha dirençli olduğu da saptanmıştır (Chippindale *et al.* 2004). Diğer bir çalışmada *Drosophila*'nın besiyeri ortamına eklenen maya miktarında değişiklik yapılarak değişik oranlarda hazırlanan besiyeri ortamının bireyler üzerindeki ömür uzunlukları karşılaştırılmıştır. Besiyerinde %1, %2, %4, %8, %16 oranlarında kullanılan mayanın derişimi arttıkça (%2'den %16'ya doğru) ortalama ömür uzunluğunun azaldığı bulunmuştur (Min and Tatar 2006). Yine *Drosophila*'da çok düşük

derişimlerde (%1) agar kullanılarak hazırlanan besiyerlerinde bireylerin gelişimlerinin normal olduğu ve yaşam sürelerinin uzadığı belirlenmiştir. Ancak erginlerin yumurta verimlerinde düşüşe ve yaşam sürelerinde kısalmalara neden olduğu (Min and Tatar 2006), agarın %8'lik derişiminde erkek bireylerin normal şartlarda yaşayan erkek bireylerine göre daha uzun yaşadıkları diğer çalışmalarla belirlenmiştir (David *et al.* 1971). Uysal *et al.* (2000), tek hücre proteinlerinin besiyerine katılmasıyla daha fazla yavru birey elde edilebildiğini de göstermiştir.

Popölasyon yoğunluğu.

Popölasyon yoğunluğunun bireyler arasındaki rekabeti artırarak gelişimi yavaşlattığı ve bireylerin beslenme yetersizliğine bağlı olarak vücut büyüklüklerinde küçülmelere neden olduğu bildirilmiştir (Economos and Lints 1984; Yonemura *et al.* 1991; Foley and Luckinbill 2001). Artan popölasyon yoğunluğunun *Drosophila*'da larval ve pupa yaşayabilirliğini azalttığı ve gelişimin yavaşladığı belirlenmiştir (Ashburner 1989; Mc Intyre and Gooding 2000).

Graves and Mueller (1993)'in yaptıkları bir çalışmada artan popölasyon yoğunluğunun ortamdaki besin miktarını azaltacağı ve bunun sonucunda da besiyeri ortamında meydana gelen değişikliklerin hastalık gibi birçok faktörü etkileyeceğinden ömür uzunluğunun azalmasına neden olabileceği düşünülmüştür.

Nem oranı.

Larva ve pupalarının neme olan duyarlılığı soylar ve türler arasında farklılık göstermesine rağmen birçok *Drosophila* türünün normal gelişimi için yüksek nem oranı gereklidir (Ashburner 1989). *Drosophila* pupalarının yaşayabilmesi ve normal olarak gelişebilmesi için nem oranının %55'in altına inmemesi ve en uygun nem oranının %40-60 olduğu yapılan çeşitli araştırmalar ile rapor edilmiştir (Al-Saffar *et al.* 1996). Larvaların beslendiği ortamın nem içeriğinin ergin hale gelen *D. melanogaster*'de vücut büyüklüğünü ve bireylerin gelişim süresini etkilediği bildirilmiştir (Hodge 2001). Nem oranının düşük olması gibi yüksek nemli ortamların da pupaların yaşayabilirliğini azalttığı ve larvaların gelişim sürelerini kısalttığı ifade edilmiştir.

Radyasyon.

Tüm canlılar gibi böceklerde de radyasyona oldukça dayanıklı canlılar olup özellikle ergin *Drosophila*'nın iyonize radyasyona duyarlılığının oldukça az olduğu bilinmektedir (Bozcuk 1970). Yüksek dozadaki radyasyonun somatik mutasyon birikimine neden olarak ömür uzunluğunu kısalttığı bilinmektedir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda düşük dozadaki radyasyonun bilinenin aksine ömür uzunluğunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Ömür uzunluğunda

meydana gelen bu artışın muhtemelen bazı enfeksiyonların radyasyon etkisiyle azalmasına ya bireylerin çevresel direncinin artması sonucu olduğu düşünülmektedir (Ashburner and Novitski 1976). Ergin sineklerin somatik hücrelerinin bölünerek yenilenmemesi radyasyona dayanıklılık nedenlerinden birisidir (Bozcuk 1970).

Işık.

Işık, *D. melanogaster*'in metabolik ve gelişim evrelerinde rol alan önemli bir parametre olup, yumurta ve pupadan çıkış süresinde (Qiu and Hardin 1996), metabolik hızda (Lanciani *et al.* 1991) ve ömür uzunluğunda (Sheeba *et al.* 2000) etkili olduğu tespit edilmiştir. *D. melanogaster* ile yapılan çalışmalarda gelişimde farklılığa neden olabilecek diğer faktörlerin aynı olması koşulunda sadece ışık parametresindeki değişikliğin bile bireylerde metabolik hızda farklılıklara neden olduğu gözlenmiştir. Şöyle ki; genel olarak kısa gün şartlarına maruz kalanlardaki metabolik hızın, uzun gün şartlarına maruz kalanlardan daha yüksek olduğu, dolayısıyla kısa gün şartlarında gelişmenin daha hızlı gerçekleştiği ifade edilmiştir (Lanciani *et al.* 1991). Sürekli ışıklı ortamın ergin bireylerde ömür uzunluğunu kısalttığı (Allemand *et al.* 1973; Klarsfeld and Rouyer 1998), buna karşın sürekli karanlık ortamda yaşatılan *D. melanogaster* erkeklerinde %20, dişilerinde ise %43'e varan ömür uzunluğu artışının olduğu gözlenmiştir (Allemand *et al.* 1973; Bağcı ve Bozcuk 1991).

Sıcaklık.

Böceklerin poikilothermal (soğukkanlı) canlılardır ve sıcak değişimleri bu canlıları direkt olarak etkilemektedir. Metabolik aktivitenin ve solunumun hızlanması ile serbest radikallerin seviyindeki artış, hücrel hasarlara ve ömür uzunluğunda kısalmaya neden olmaktadır (Sestini *et al.* 1991).

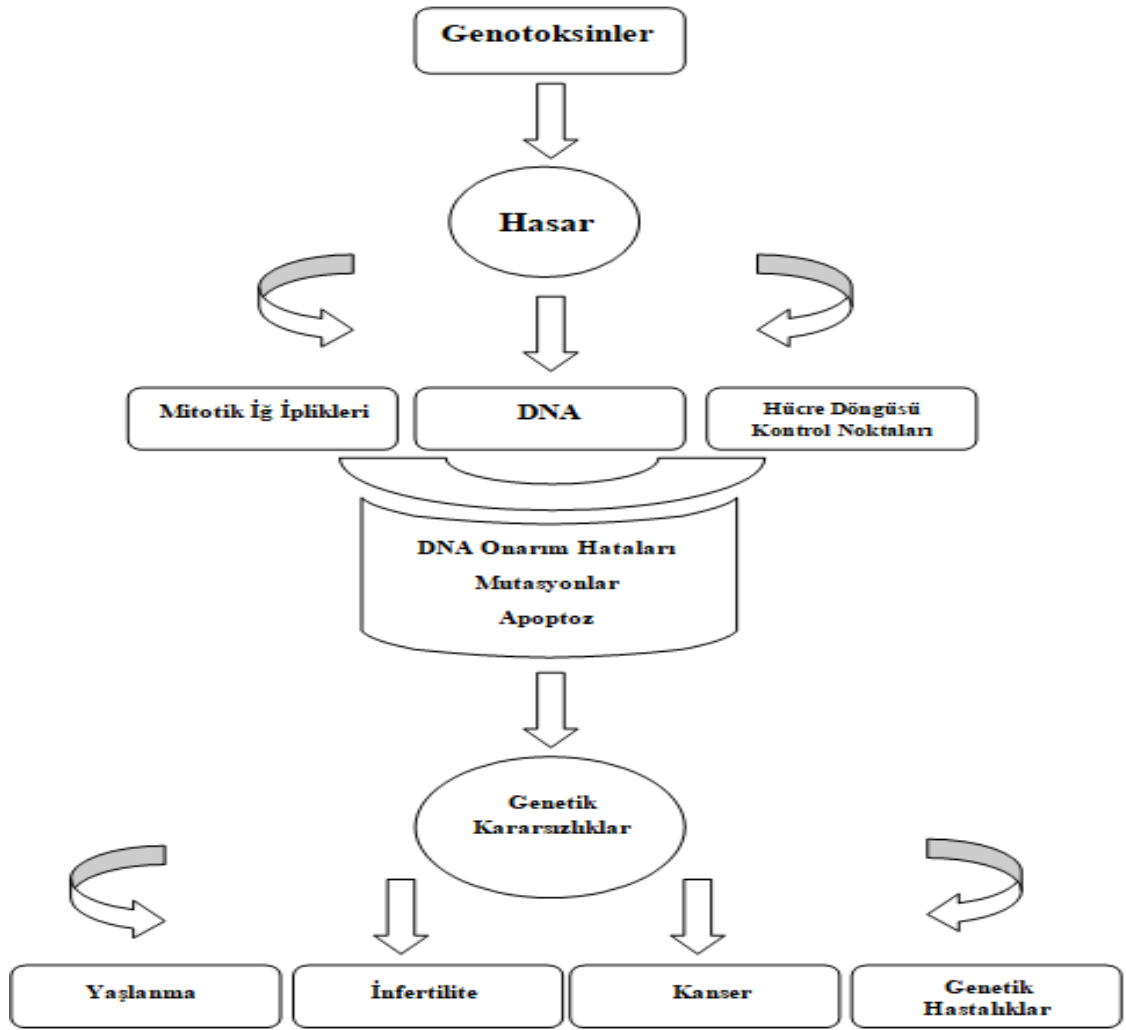
Bu düşünce etrafında yapılmış çalışmalardan birinde farklı sıcaklıkların (20, 25, 30.5 ve 33°C) *D. subobscura*'da ömür uzunluğu üzerine etkileri araştırılmış ve sıcaklık artışı ile beraber ömür uzunluğunun azaldığı belirlenmiştir (Maynard-Smith 1966). *D. melanogaster* üzerinde sıcaklığın yaşam süresiyle olan ilişkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada 19, 24 ve 29°C olarak belirlenen sıcaklık parametreleri çalışılmış ve sıcaklık artışı ile yaşam süresinin kısaldığı bildirilmiştir (Sestini *et al.* 1991). *D. melanogaster*'in Oregon-R yabanıl ve *vestigial* mutant soylarının dişi ve erkek bireylerinin kullanıldığı bir çalışmada da bu kez sıcak şok uygulaması yapılmış (39°C) ve her iki türün dişi ve erkek bireylerinde artan uygulama süreleriyle (1, 2 ve 3 saat) doğru orantılı olarak ortalama ömür uzunluklarının kısaldığı belirlenmiştir (Ayar *et al.* 2010). Optimum sıcaklık sınırının altındaki sıcaklık değerlerinin de yaşam süresini etkileyebilecek bir faktör olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. Şöyle ki; soğuk şok

uygulamalarının (-3°C) *D. melanogaster*'in yabancıl ve mutant soylarının dişi ve erkek bireylerinde artan uygulama sürelerine (1, 2 ve 3 saat) paralel olarak ortalama ömür uzunluklarının kısalttığı Ayar *et al.* (2010) tarafından gözlenmiştir.

Genetik Toksikoloji

Genetik materyalin kopyalanmasında görev alan enzimlerle etkileşime girerek mutasyonlara neden olan maddeler “genotoksik madde”, bu maddelerin DNA’ da bazı değişimlere yol açarak hasar meydana getirmesi de “genotoksik etki” olarak tanımlanmaktadır (Zeiger 2004). Genotoksik maddelerin çekirdek, kromozom ve DNA yapısında gen mutasyonlarını indükleyerek kromozom yapısı anormallikleri, DNA eklentileri veya kırıklarını meydana getirmesine “genetik toksisite” bunları inceleyen bilim dalına “genetik toksikoloji” denilmektedir (Choy 2001; Young 2002; Zeiger 2004; Vural 2005). DNA molekülünde mutasyonlara yol açan maddeler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yollarla göstermekte, DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yolaklardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite, bazı genetik ve multifaktöriyel hastalıklara (Şekil 7) yol açmaktadır (Kirsch-Volders *et al.* 2003; Mateuca *et al.* 2006).

1927 yılında Müller’in çalışmaları ile başlayan genetik toksikoloji günümüzde de mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik etkilerini belirlemek için kullanılmaktadır. Genotoksikoloji gelişen teknoloji ve yenilenen analiz yöntemleri ile önemli araştırma alanlarından biri olmuştur (Bedir vd 2004). Oluşturulan test yöntemleri DNA’da meydana gelen hasarları saptamak amacıyla genellikle *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilir niteliktedirler (Choy 2001; Zeiger 2004; Vural 2005). Genotoksikolojide asıl hedef DNA molekülü olmasından dolayı kullanılan model organizmalardan elde edilen veriler sayesinde araştırılan genotoksik maddelerin insan sağlığı üzerinde meydana getirebileceği etkileri belirlemeye çalışmaktır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Bu testler sayesinde çeşitli ektsraktlar, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateryaller, parazitik enfeksiyonlar, sigara, UV ve pestisit gibi pek çok etkenin genotoksik ve karsijenik etkileri belirlenmektedir. Aynı zamanda ilaç güvenirliliği tespiti gibi farklı amaçlarla da kullanılmaktadır (Preston *et al.* 1981; Choy 2001; Jena *et al.* 2002; Mateuca *et al.* 2006).



Şekil 7. Genotoksik maddelerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları.

Son yıllarda artan genetik hastalıkların ve kanser vakalarının sayısının nedenleri her ne kadar spontan mutasyonlara bağlanıyor olsa da çevremizde sürekli maruz kaldığımız fiziksel ve kimyasal ajanların etkileri de oldukça önemlidir. Genotoksisitesi araştırılan ve ciddi risk oluşturabilecek maddelere karşı önlemlerin alınması için genotoksisite testleri önem arz etmektedir. Bu testlerin kullanımları ile bireylerin herhangi bir kimyasal ajana verecekleri genetik cevabın önceden belirlenmesi, metabolizma bozuklukları ve kanser gibi hastalıkların klinik belirti vermeden saptanması sağlanabilmektedir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

Genotoksik etkilerin tam manasıyla belirlenmesi için uygulanan tek bir yöntem yeterli gelmeyecektir. Bundan dolayı bir seri test yönteminin kullanılması gerekliliği unutulmamalıdır (Zeiger 1998; Albertini *et al.* 2000; Mortelmans and Zeiger 2000). Mikroorganizmaların, bitkilerin, böceklerin ve omurgalı hayvanların kullanılabileceği yüzlerce kabul gören geneotoksik test yöntemleri bulunmaktadır (Olaharski *et al.* 2006). Sıklıkla kullanılan

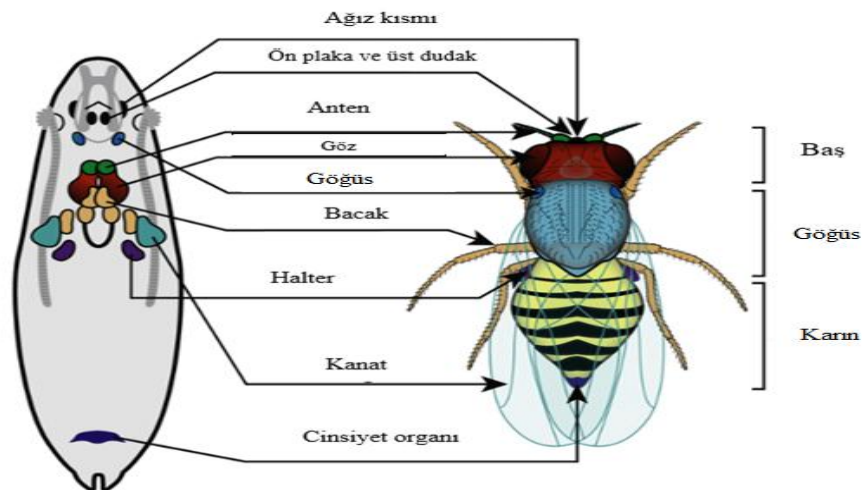
genotoksisite testleri arasında *Allium* testi (Levan 1938), *Salmonella* testi (Mc Cann *et al.* 1975), mikronükleus testi (MN) (Mac Gregor *et al.* 1987), kardeş kromatid değişimi testi (KKD) (Latt 1981), tek hücre jel elektroforezi (SCGE) (Fairbairn *et al.* 1995) ve somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) (Graf *et al.* 1984) yer almaktadır.

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi.

In vivo somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) genotoksikoloji test sistemleri içerisinde model organizma olarak *Drosophila*'nın kullanıldığı test sistemlerinden birisidir. SMART yöntemi günümüzde fiziksel, kimyasal ve biyolojik maddelerin mutajenik ve rekombinojenik etkilerini saptamak amacıyla kullanılmaktadır (Graf *et al.* 1984). Son yıllarda sıklıkla tercih edilen SMART nokta mutasyon, delesyon, kromozom bozukluğu ve mitotik rekombinasyonun tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. SMART'ın tercih edilmesinde

1. Genotoksik hasarı belirlemek için yalnızca bir jenerasyona ihtiyaç duyulması,
2. Çok sayıda hücrenin analizine olanak sağlaması,
3. Hızlı, ekonomik ve güvenilir olması rol oynamaktadır (Graf *et al.* 1984).

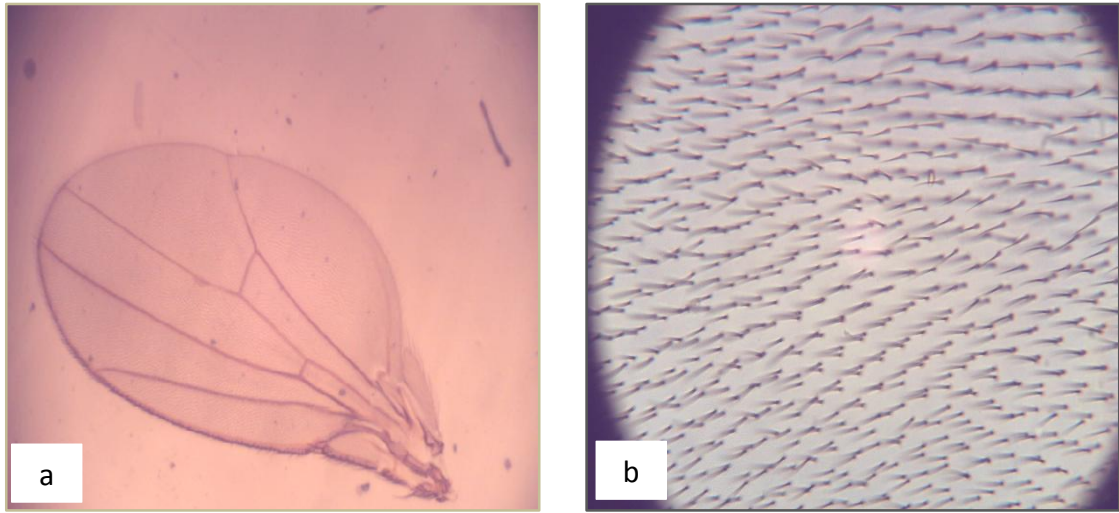
SMART *Drosophila*'nın göz ve kanatlarında meydana gelebilecek genotoksik hasarları saptamak amacıyla iki farklı yöntemle yapılabilmektedir. Ancak her iki yöntem de larvanın embriyonik gelişim dönemindeki imajinal disk adı verilen büyük hücre gruplarını hedef almaktadır. Bu büyük hücre grupları larval gelişim esnasında mitozla çoğalıp, metamorfoz ile ergin bireyin kanat, göz, bacak gibi farklı vücut yapılarını oluşturur (Şekil 8).



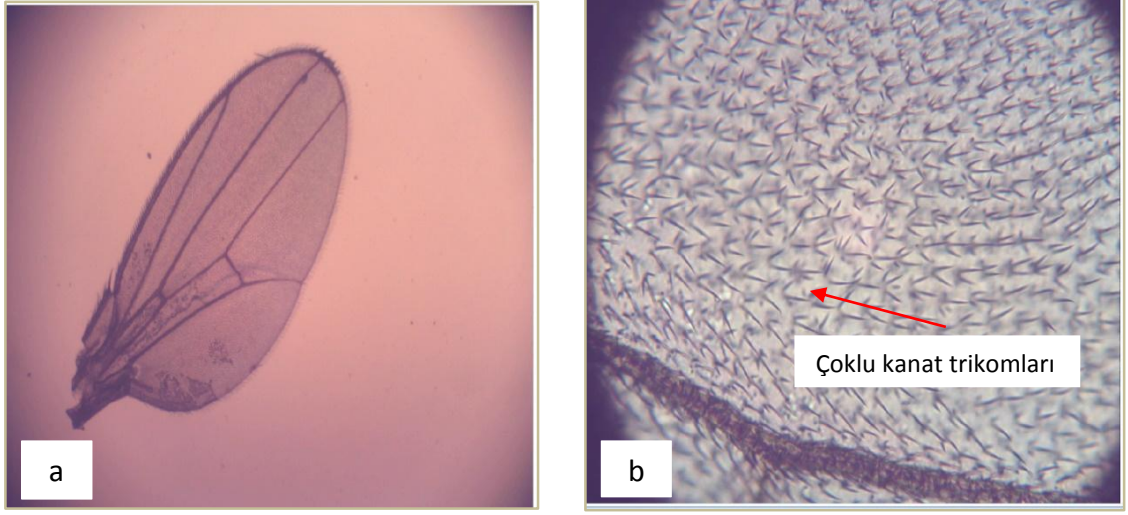
Şekil 8. *D. melanogaster*'in embriyonik gelişim evresindeki larval dönemine ait imajinal disklerin ergin bireyde oluşturdukları vücut kısımları.

Eğer bu imajinal disk hücrelerinin herhangi birinde bir genetik değişiklik meydana gelirse bu değişiklik mitozla çoğalan hücrelere aktararak normal fenotipten farklı olan mutant hücre grupları (klonlar) oluşur. Meydana gelen bu genetik değişiklik eğer fenotipte gözlenebilecek şekilde olursa ergin sineğin kanatlarında ve gözlerinde çoklu trikom fenotipi veya trikom körelmesi gibi klonlar ortaya çıkar. SMART, ergin sineklerde mutasyonla ortaya çıkan gen işaretlerinin heterozigotluk kaybını esas alarak geliştirilen bir test yöntemidir. Bu test yöntemi kimyasal veya fiziksel ajanlara maruz bırakılan sineklerde indüklenmiş mutant klonların toplam sayısı, uygulanan genotoksik ajanın toplam genotoksik aktivitesi ile ilgili istatistiksel sonuçlar ve mutant klonların oluşumunda rol alan mutasyonel mekanizmaların anlaşılması hakkında bilgilerin elde edilmesini sağlamaktadır (Graf *et al.* 1984; Guzman-Rincon and Graf 1995).

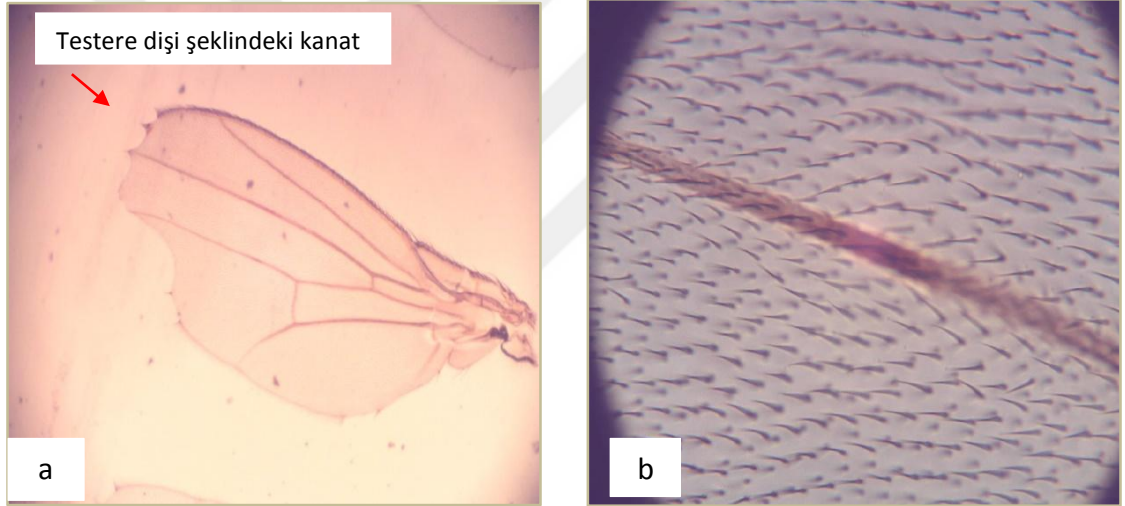
SMART, iki işaret genini baz alan ve bu genlere ait fenotipik etkilerin kanatlarda gözlenebildiği bir test yöntemidir. Bu genlerden birisi yabanıl tip kanat yapısında olan kanat trikomlarının (Şekil 9) aksine çoklu kanat trikomlarının oluşumuna neden olan *multipli wing hair (mwh)* geni (Şekil 10) ile diğeri kanat trikomlarının şeklini etkileyen *flare (flr³)* genleridir (Şekil 11). *Flare* genini taşıyan bireyler normal kanat kılına sahip olmakla beraber heterozigotluk kaybı ile trikomların şekli değişir.



Şekil 9. a) Oregon-R yabanıl tip bireylere ait kanat yapısı (10x10), b) Kanat kıllarının mikroskopik görüntüsü (10x40).



Şekil 10. a) *mwh/mwh* geni taşıyan multipli wing hair bireylerine ait kanat yapısı (10x10), b) Çoklu kanat kıllarının mikroskopik görüntüsü (10x40)



Şekil 11. a) *flr³/TM3* geni taşıyan *flare* bireylerine ait kanat yapısı (10x10) b) Kanat kıllarının mikroskopik görüntüsü (10x40)

Resesif bir gen olan *mwh* üçüncü kromozomun telomere yakın (3-0,3) kısmında bulunur. Bulunduğu canlıda homozigot durumda iken hücre başına bir kanat trikomu yerine birden fazla trikom oluşmasına neden olmaktadır. Diğer işaret genlerinden olan *flr³* ise kanat trikomlarının şeklini etkileyen resesif bir olup, üçüncü kromozomun sentromerine yakın kısmında bulunmaktadır (3-38,8). Ancak homozigot *flr³* geni bulunduğu bireyin embriyonik döneminde letalite göstermekte ve ergin döneme ulaşamadan bireyler ölmektedir. Bu *flr³* geninin üç mutant alleli bilinmekte ancak bilinen bu mutant allellerde homozigot durumda letalite sergilememektedir. Bu bireylerin dengeleyici bir kromozom olan *TM3*, *Bd^s* kullanılarak

heterozigot haline getirilen $flr^3/TM3$, Bd^s bireyleri yaşatılabilmektedir. Heterozigotluk kazandırmak için kullanılan genlerden Bd^s bireyin yaşamasını sağlarken aynı zamanda bireylerin uzun kanatlarının son kısmını normalden farklı olarak testere dişi şeklinde olmasına neden olmaktadır (Şekil 11).

SMART yönteminde meydana gelen mutant fenotipleri belirlemek amacıyla mwh veya flr^3 fenotipini taşıyan bireyler arasından yapılan çaprazlamalardan elde edilen heterozigot larvalar kullanılmaktadır. Bu larvalar başkalaşımalarını tamamlayıp ergin hale gelince kanat yapılarına göre morfolojik olarak ayırt edilerek olası mutant klonların analizleri yapılmaktadır (Şekil 12). Kanat morfolojilerine göre;

- a) Trans-heterozigot bireyler (normal kanatlı, mwh/flr^3)
- b) Dengeleyici-heterozigot bireyler (serrat kanatlı, $mwh/TM3$)

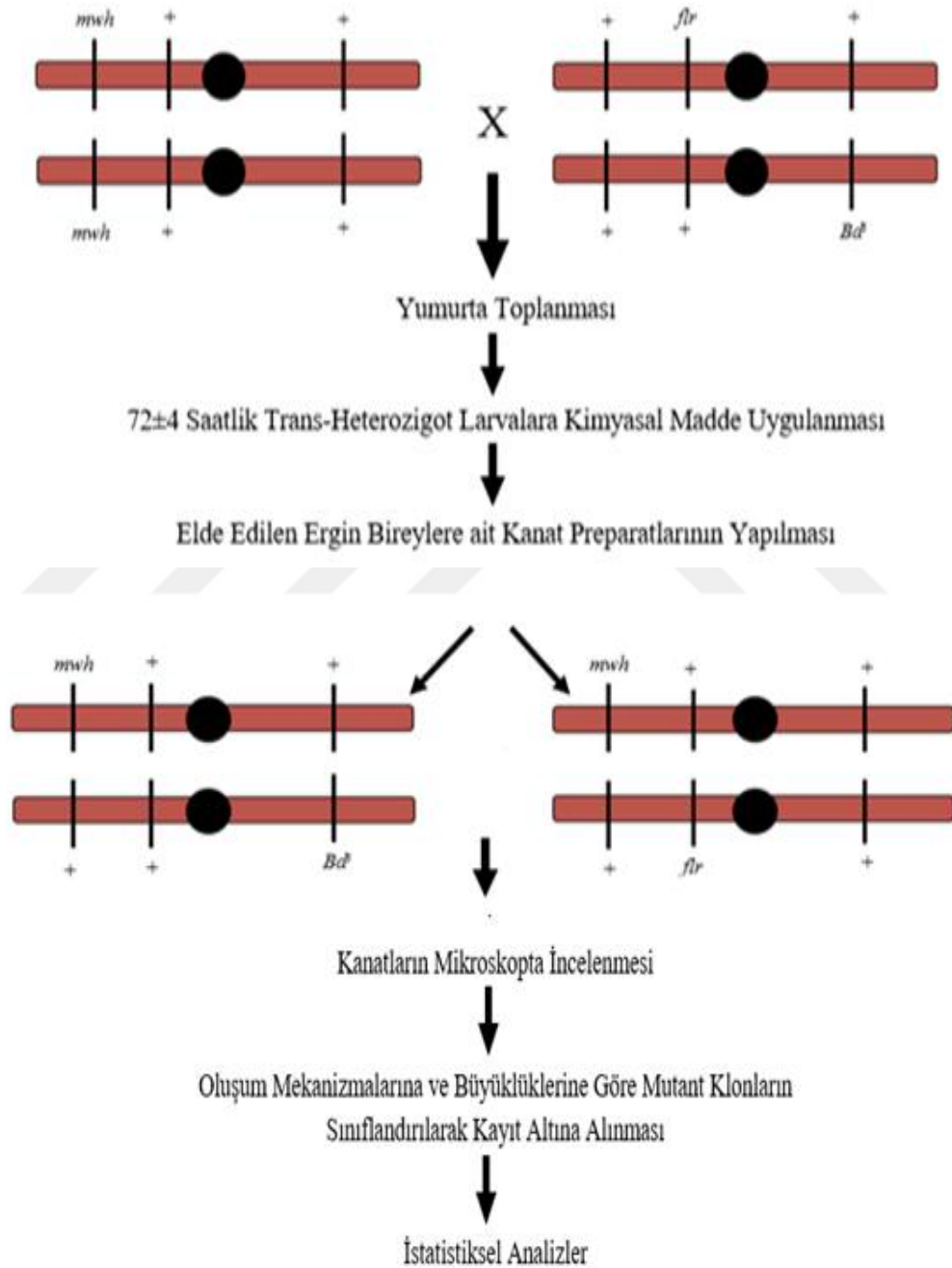
Trans-heterozigot bireylerde (normal kanatlılarda) mutant klonlar nokta mutasyonu, delesyon, ayrılmama ve iki işaret geni olan mwh ve flr^3 arasındaki mitotik rekombinasyon ile meydana gelebilirken, dengeleyici kromozomun ($TM3$) rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece bu bireylerde mutant klonlar mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Böylece normal ve serrat kanatlı bireylerden elde edilen verilerle çalışmada kullanılan ajanın mutajenik veya rekombinojenik etkisi de belirlenebilmektedir (Vogel 1992; Frei and Würzler 1996).

Çeşitli mekanizmalar ile oluşan mutant hücre klonları farklı benek gruplarına ayrılarak incelenmektedir. Bu benek çeşitleri;

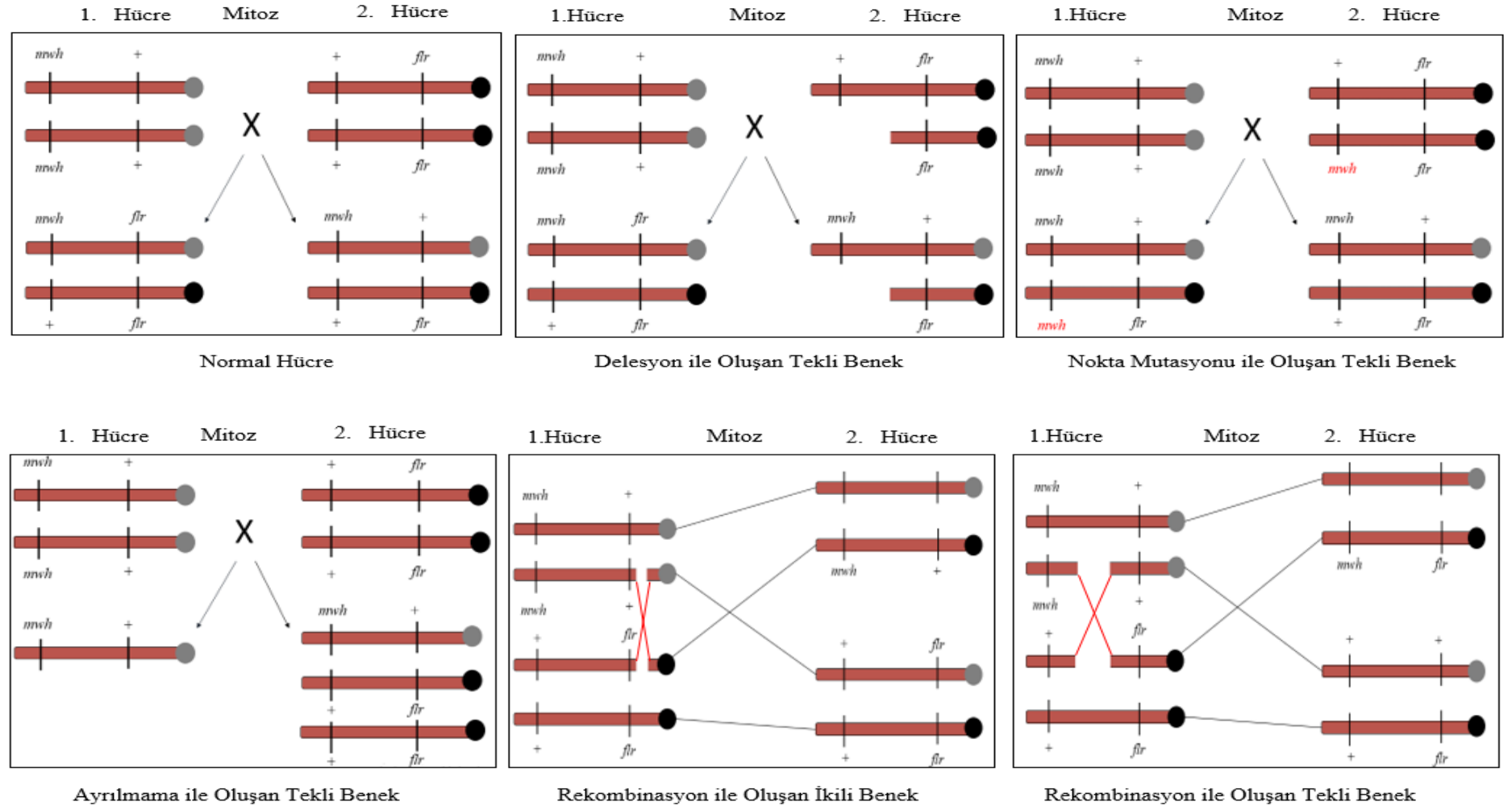
- a) Küçük tek tip klon (1-2 mwh mutant klon içeren benek tipi)
- b) Büyük tek tip klon (≥ 3 mwh veya ≥ 4 flr^3 mutant klon içeren benek tipi)
- c) İkiz klon (mwh ve flr^3 genlerinin ikisini de birlikte aynı klonda bulunduran klon benek tipi)

Benek tiplerinden tek tip klonlar nokta mutasyonu, delesyon, ayrılmama ve rekombinasyon sonucu meydana gelirken (Şekil 13), ikiz klon tipi üçüncü kromozomun sentromeri ve flr^3 geni arasındaki rekombinasyon ile oluşmaktadır. Somatik hücrelerde meydana gelen genetik değişikliklerin indüklendiği evre ile beneklerin sayısında meydana gelen artış arasında doğru orantı olduğu belirtilmektedir. Eğer mutasyon hücre bölünmelerinin yoğun olduğu erken emriyonal evrelerde oluşursa mutant hücrelerin sayısı da artmaktadır. Benek tiplerinin sınıflandırılmasına göre oluşturulan veriler ile istatistiksel analizler yapılmakta ve etkinliği araştırılan olası genotoksinin mutajenik veya rekombinojenik olup olmadığı da belirlenebilmektedir (Uysal *et al.* 2006).

Sunulan bu çalışmada, farklı gruplara ait olan beş farklı terpenin *D. melanogaster*'in yabanıl bireylerinde ömür uzunluğunu etkileyici bir parametre olup olmadığı ve yine aynı terpenlerin *D. melanogaster*'in iki farklı mutant soyunda genotoksik etki gösterip göstermediği incelenmiştir. Bu amaçla tez kapsamında toksik ve genotoksik etkileri belirlemek için *in vivo* ömür uzunluğu testi ile somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılmıştır.



Şekil 12. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin uygulama şekli.



Şekil 13. Somatik mutasyon ve rekombinasyonların oluşum mekanizmalarına ait şematik gösterimi.

KURAMSAL TEMELLER

Doğal ürünlerin en yaygın gruplarından birisi olan ve sekonder metabolit olarak tanımlanan terpenler esansiyel yağ, reçine, mum ve kauçuk gibi doğal ürünlerin ana bileşenini oluştururlar (Başer vd 2005). Terpenler, son zamanlarda birçok bilim insanının dikkatini çekmiş ve kimyasal yapıları ile biyolojik aktiviteleri bakımından araştırılmaya başlanmıştır (Ceylan 1987). Yapılan incelemeler sonucunda bu doğal bileşiklerin farklı özellikleri dikkate alınarak farklı alanlarda kullanılabileceği Mouhssen (2004) tarafından bildirilmiştir. Günümüzde özellikle ticari olarak kozmetik, ilaç, gıda sanayi ve endüstriyel alanlarda bu bileşikler kullanılmaktadır (Hammer *et al.* 1999). Ayrıca farmakolojik özellikleri incelenerek aromaterapi ve fitoterapi alanında da kullanılabileceği Kırbağ ve Bağcı (2000) tarafından bildirilmiştir. Kırca *et al.* (2006)'a göre, terpenler antioksidan, antimutajen, antikarsinojen özelliklere sahiptirler ve bu potansiyel etkilerinden dolayı biyolojik yönden aktif bileşiklerin kaynağı olabilirler. Bu bileşenler, oldukça farklı bitkilerden ve onların ana etken maddelerinden elde edilip hem bilimsel hem de ekonomik yönden değerlendirilmektedir. Ancak yaptığımız literatür çalışmalarında terpenlerin hem ekonomik yönden farklı sektörlerde kullanıldığı/kullanılabileceği hem de kullanım esnasında toksisiteye bağlı hasarların da oluşabileceği bilgisine rastlanmıştır. Özellikle kozmetik, temizlik ürünleri, ilaç yapımı, gıda sanayi, aromaterapi ve fitoterapi gibi kullanım alanlarının insanlarla doğrudan ilişkili olduğu göz önüne alındığı zaman, genotoksik etkilerin de dikkate alınması gerektiği fikri bu alanda çalışma yapan araştırmacıların tümü tarafından kabul görmektedir.

Sekonder metabolitlerin yararlı özelliklerinin yanı sıra yan etkiler de oluşturabileceği göz önünde bulundurularak kullanılacağı yer ve dozunun da çok iyi bir şekilde ayarlanması gerektiği ve özellikle bazı metabolitlerin genotoksik aktivitesinin doz artışına paralel olarak ortaya çıktığı da yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Williams 1989; Lewis *et al.* 1995; Morton *et al.* 1995; Shah *et al.* 1996).

Aynı zamanda sekonder metabolitlerin olası toksik ve genotoksik etkilerinin içermiş oldukları terpen çeşitliliğine bağlı olduğu/olabileceği düşünülmüş (Sacchetti *et al.* 2005) ve terpenler ile yapılan toksikoloji çalışmalarında terpenlerin toksik, genotoksik ve mutajenik etkili olabileceği de birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Whysner and Williams 1996; Franzios *et al.* 1997; Gomes-Carneiro *et al.* 1998; Stammati *et al.* 1999; İpek *et al.* 2005; Korkmaz 2005).

Prokaryotik canlıların yanı sıra ökaryotik organizmalarla yapılan çalışmalarda da çeşitli terpenlerin toksik etkiler sergileyebildikleri bildirilmiştir. Bu çalışmalardan bazıları kronolojik olarak şöyledir;

Diş hekimliğinde antiseptik ve ağrı kesici olarak kullanılan karanfil (*Eugenia caryophyllata*) ve özellikle Güneydoğu Çin’de kullanılan Çin tarçını (*Cinnamamum cassia*) bitkilerinde bulunan öjenol, öjenol asetat ve karyofilin metabolitlerinin *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde mutajen oldukları tespit edilmiştir (Sekizawa and Shibamoto 1982).

Sindirimi güçlendirici, gaz söktürücü, kramp çözücü hatta anne sütünü artırıcı gibi çeşitli alternatif tedavi yöntemlerinde kullanımı mevcut olan dere otu (*Anethum graveolens*) bitkisinin içerdiği d-limonen ve simen terpenlerinin dört farklı dozda yeni doğmuş farelere intraperitoneal yolla verilmesi sonucu bu terpenlerin farelerin karaciğer hücrelerinde DNA’ya bağlandığı ve tümör oluşumuna sebep olduğu gözlenmiştir (Phillips *et al.* 1984).

Yine Phillips *et al.* (1984) tarafından yapılan bir çalışmada, apiol, pinen, felandren gibi metabolitleri içeren ve özellikle mutfakta kullanımı olan ve ayrıca çayı da yapılan maydanoz (*Petroselinum crispum*)’un 0.25, 0.5, 1.0 ve 3.0 µmol dozları yeni doğmuş farelere intraperitoneal yolla verilmiş ve farelerin karaciğer hücrelerinde de tümör oluşumuna rastlanmıştır.

Benzeri etkilere ceviz (*Juglans regia*), tarçın (*Cinnamomum verum*), siyah biber (*Piper nigrum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), karanfil (*Eugenia caryophyllata*) ve limon otunda (*Cymbopogon citratus*) bulunan metilöjenol ve karyofilin terpenlerinin de sebep olduğu aynı araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Phillips *et al.* 1984; Howes *et al.* 1990).

Diterpenler grubuna ait çeşitli metabolitler ile de toksikolojik çalışmalar yapılmış ve konsantrasyon artışına bağlı olarak istenmeyen etkiler meydana gelebileceği görülmüştür. Örneğin; antioksidan ve antibakteriyel etkili olduğu bilinen dehidroabietik asitin balıklar üzerinde karaciğer fonksiyon bozukluğu, hemoliz ve sarılık meydana getirdiği bulunmuştur (Bushnell *et al.* 1985).

Tıp, kozmetik ve gıda gibi çeşitli sektörlerde tercih edilen aynı zamanda çay ve baharat olarak da kullanımı mevcut olan mentol, menton gibi terpenler özellikle nane bitkisinden doğal bir şekilde elde edilebilmektedir. Geniş kullanım alanına sahip bu terpenler ile yapılan toksikolojik çalışmalardan birinde Haseman *et al.* (1986) hem erkek hem de dişi farelere yüksek dozda mentol uygulamışlar ve erkek farelerde özellikle yüksek dozlarda karaciğer kanseri oluşumunun arttığını gözlemişlerdir.

Reçine metabolitlerinden *olan* dehidroabietik asit diterpeninin eklem bacaklılardan olan *Daphnia magna* ve *Daphnia pulex* (su piresi)'de akut ve kronik toksisite geliştirdiği belirlenmiştir (Servizi *et al.* 1986). Aynı metabolitlerin *Salmo gairdneri* (gökkuşluğu balığı)'ye 2-0.4 mg/l uygulanması sonucunda karaciğer fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak sarılığın oluştuğu gözlenmiştir (Mattsoff and Oikari 1987). Büyük bir olasılıkla reçine metabolitleri eritrositlerin parçalanmasına yol açmakta ve bilirubinin salgılanmasında görev alan bazı yollarda inhibisyona neden olmaktadır (Mattsoff and Nikinmaa 1988).

Kozmetik, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan monoterpen çeşitlerinin biyokimyasal ve farmakolojik özelliklerini belirlemek için birçok çalışma yapılmış ve bunlardan özellikle İzmir (*Origanum onites*) ve karabaş (*Thymbra spicata*) kekiklerinden elde edilen timol ve karvakrol terpenlerinin şempanze, arap babunu ve insan lökosit hücrelerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sergiledikleri (Suzuki *et al.* 1987), ancak aynı terpenlerin *Drosophila melanogaster*'de asetilkolinesteraz enzim inhibitörü olarak toksisiteye sebep oldukları bildirilmiştir (Quinn 1987).

Pteridium aquilinum (kartal eğreltisi)'dan elde edilen ptaquilosid seskiterpeninin insanlarda yemek borusu ve mide kanserine, oral uygulama ile sıçanlarda da idrar kesesi tümörlerinin oluşumuna neden olduğu Hirono *et al.* (1987) tarafından belirlenmiştir.

Gossypium (yayla pamuğu) cinsinden elde edilen gosipol metaboliti de periferik lenfosit hücrelerinde kardeş kromatit değişimini uyarak genotoksikiteye sebep olmuştur (Best and McKenzie 1988).

İçerisinde fitosterol ve stigmasterol gibi terpenleri barındıran soya fasülyesi (*Soja hispida*)'nin *Salmonella* mutasyon testi ve farklı ileri mutasyon testlerinde mutajenik aktivite gösterdiği, ayrıca fare kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatid değişimini ve mikronükleus oluşumunu indükleyerek genotoksik etkili olduğunu saptanmıştır (Qu *et al.* 1992).

Melaleuca (hint defnesi)'da bulunan limonen, α -terpinen, aromadendren, terpinen-4-ol ve p-simen gibi metabolitler ile *Lavandula* (lavanta)'da bulunan pinen, sineol ve borneol metabolitlerinin deride alerjik reaksiyonlara sebep olduğu (Knight and Hausen 1994) ve ayrıca limonen terpeninin erkek sıçanlara yüksek dozlarda uygulanması sonucunda sıçanlarda böbrek tümörleri meydana getirdiği tespit edilmiştir (Hard and Whysner 1994).

Tıp, eczacılık ve gıda endüstrisinde kullanılan sitral ve 1,8-sineol terpenlerinin insan lenfositlerinde sitotoksik ve genotoksik olduğu da Nogueira *et al.* (1995) tarafından bildirilmiştir.

Renk ve koku verici olarak kozmetikte ve lezzet verici madde olarak da gıdalarda kullanıldığı bilinen terpinen monoterpeninin sıçanlar kullanılarak embriyo fototoksik etkisi araştırılmış ve çalışma sonunda 30, 60, 125 ve 250 mg/kg terpinenin yüksek dozlarda uygulanmasına bağlı olarak gecikmiş ossifikasyon belirtileri (zayıf kemikleşmiş ve kemikleşmemiş kemikler ve düzensiz süngerimsi kemikler) ve düşük düzeyde de olsa iskelet malformasyonu gösterdiği belirlenmiştir (Araujo *et al.* 1996).

Liss *et al.* (1997)'a göre, dehidroabietik asit diterpeni gibi çeşitli reçine metabolitleri omurgasızlar ve algler dahil olmak üzere çeşitli sucul organizmalarda toksisiteye sebep olmaktadır.

Tarçın (*Cinnamomum verum*), karanfil (*Eugenia caryophyllata*) ve limon otunda (*Cymbopogon citratus*) bulunan metil öjenolün kemirgenlerde yüksek dozlarda karsinogenik etki göstermesi nedeniyle insan sağlığı açısından da risk taşıyabileceği Gardner *et al.* (1997) belirtilmiştir.

Nane (*Mentha piperita*)'den elde edilen ve gıdadan eczacılığa farklı birçok sektörde kullanıldığı bilinen menta, mentol, pulegon gibi terpenlerin *D. melanogaster*'de sitotoksik ve genotoksik etkili olduğu Franzios *et al.* (1997) tarafından tespit edilmiştir.

Pteridium aquilinum (kartal eğreltisi)'dan elde edilen ptaquilosid seskiterpeninin sıçanlara intravenöz olarak uygulanması ile meme bezi tümörlerinin oluşmasına yol açabilecek DNA alkilleyici bir ajan olabileceği bildirilmiştir (Shahin *et al.* 1998).

Coridothymus capitatus (acıkekik) ve *Satureja thymbra* (karakekik) bitkilerinde bulunan ve GC-MS yöntemiyle belirlenen karvakrol, timol, terpinen ve simen metabolitleri ile yapılan somatik mutasyon ve rekombinasyon testi sonucunda özellikle karvakrol ve timolün *D. melanogaster* üzerinde genotoksik etkili olduğu ve somatik mutasyonları uyardığı belirlenmiştir (Karpouhtsis *et al.* 1998).

Antifungal aktivite gösterdiği bilinen sinnamaldehit, karvakrol, timol ve karvon terpenlerinin sitotoksitesi ve genotoksitesi yapılan *in vitro* mikrobiyal ve memeli testleri ile araştırılmış ve bu dört terpenin Hep-2 hücrelerinin doza bağlı bir şekilde yaşayabilirliğini ve çoğalmasını inhibe ettiği belirlenmiştir. Ames ve SOS kromotestlerinde bu terpenlerin toksik etkili olabileceği de gözlenmiştir (Stammati *et al.* 1999).

Dehidroabietik asit ve izopimarik asit terpenlerinin toksisitelerinin belirlendiği diğer bir çalışmada, gökkuşağı balığı (*Melanotaenia trifasciata*) kullanılmış ve artan terpen konsantrasyonuna bağlı olarak dehidroabietik asitin hücre hasarı, kalsiyum homeostazi bozuklukları ile bazı fizyolojik bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir (Rabergh *et al.* 1999).

Yine yapılan diğ er bir çalışmada, akut uygulanmış izopimarik asit, pimarik asit ve abietik asit *metabolitlerinin Salmo gairdneri* (gökkuşağı alabalığı) ile *D. manga*'da toksik etkiye dayalı olarak hayatta kalabilme oranlarını azalttığı belirtilmiştir (Peng and Roberts 2000).

Hint defnesi olarak da bilinen *Melaleuca*'da bulunan limonen, α -terpinen, aromadendren, terpinen-4-ol ve p-simen gibi metabolitler ile *Lavandula* (lavanta)'da bulunan pinen, sineol ve borneol metabolitlerinin insanlarda deride alerjik reaksiyonlara sebep olduğı Sugiura *et al.* (2000) tarafından bildirilmiştir.

Monoterpenlerin bir çeşidi olan metil öjenolün kemirgenlerde yüksek dozlarda karsinojenik etki göstermesi nedeniyle insan sağığı açısından da risk taşıdığı (Burkey *et al.* 2000; De Vincenzia *et al.* 2000) ve çimlenme döneminde yine bir monoterpen olan sitrale maruz bırakılan buğdayda  imlenememe durumundan dolayı monoterpenlerin büyüme inhibitörü olabileceğı bildirilmiştir (Dudai *et al.* 2000).

Lazutka *et al.* (2001)'da, yine nane bitkisinden elde ettikleri menton, limonen, timol gibi monoterpenlerin insan lenfositlerinde doz artışına bağılı olarak kromozomal aberasyonları ve kardeş kromatit değışimlerini artırdığını, *D. melanogaster*'de de *in vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testi sonucunda somatik mutasyonlara sebep olduğunu belirlemişlerdir.

Aynı araştırmacılar nanenin dışında dere otundan elde ettikleri karvon, d-limonen ve simenin olası toksik etkilerini yine insan lenfosit kültürleri üzerinde *in vitro* kromozomal aberasyon ve kardeş kromatit değışim testi ile belirlemiştir ve doz artışına bağılı olarak genotoksik etkili olduğunu gözlemişlerdir (Lazutka *et al.* 2001).

Akciğer ve kalp hastalıklarının tedavisinde tercih edilen ve ana bileşenlerinin dehidroabietik asit, abietik asit, izopimarik asit gibi diterpenler olduğı bilinen sarıçam (*Pinus sylvestris*) bitkisi ile yapılan çalışmalarda da bu terpenlerin genotoksik etkili olduğı belirlenmiştir. Bu terpenlerin doz artışına bağılı olarak kromozomal aberasyonları ve kardeş kromatit değışimlerini artırdığı ve *D. melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) sonucunda somatik mutasyonlara sebep olduğı da bildirilmiştir (Lazutka *et al.* 2001).

Nane'de bulunan mentol, menton, pulegon, limonen terpenlerinin sıçanlara akut olarak ağız yolu ile verilmesi sonucu düşük derecede toksik oldukları tespit edilmiş, subkronik oral çalışmalarda ise beyinde kistik lezyonlara sebep oldukları bildirilmiştir (Nair 2001). Aynı araştırmacı tarafından menton terpeninin tavşanlarda intradermal uygulamalarda alerjiye, fare

lenf hücrelerinde mutajenite ve hamster fibroblast hücrelerinde ise kromozomal aberasyonlara yol açtığı gözlenmiştir.

Al-Batina *et al.* (2003)'ya göre yatıştırıcı ve dengeleyici özellikleri göz önüne alınarak kullanımı yaygın olan kimyon (*Cuminum cyminum*) bitkisinin pinen, felandren ve simen gibi metabolitleri *Salmonella typhimurium*'un TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşları üzerinde oksidatif etkilidir.

Guazilen ve azulen seskiterpenleri kozmetik ve ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır ve Wakabayashi *et al.* (2003) tarafından bu metabolitlerin insan hücrelerinde sitotoksik olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca hem azulen hem de guaiazulenin *Salmonella typhimurium* bakteri suşlarında (TA 102) spontan mutasyondan dört ila beş kat daha yüksek fotomutajenite sergilediği gösterilmiş ve ışık uygulamaları ile kombine olan azulen ve guazilenin DNA'da hasarlar meydana getirdiği bildirilmiştir (Wang *et al.* 2003).

Pavlidou *et al.* (2004), 1,8-sineol metabolitinin olası genotoksik ve insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla *D. melanogaster* ve *B. oleae*'yı kullanarak yaptığı somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) sonucunda 1,8-sineol terpeninin *B. oleae* üzerinde oldukça toksik olduğunu ancak *D. melanogaster*'e karşı toksisitesinin önemli olmadığını bildirmişlerdir.

Aynı araştırmacılar nane (*Mentha*)'de bulunan mentol, menton, pulegon, limonen terpenlerinin tavşanlarda intradermal çalışmalarda ciddi reaksiyonlar gösterdiğini, pulegonun hepatotoksik ve mentonun da somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile *B. oleae*'da oldukça toksik olduğunu rapor etmişlerdir (Pavlidou *et al.* 2004).

Gıda ve parfümeri sanayisinde önemli bir yeri olan mersin bitkisinin (*Myrtus communis*) ve içerdiği limonen, pinen, sitral ve ökaliptol terpenlerinin kabızlık giderici ve antiseptik olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ancak Hayder *et al.* (2004) tarafından yapılan çalışmada bu bitki bileşenlerinin *Escherichia coli* suşları üzerinde yapılan genotoksisite testlerinde mutajenik etkiler meydana getirdiği de belirlenmiştir.

Dianthus caryophyllus (yabani karanfil) bileşenleri olan ve gıdalara lezzet vermek amacıyla ya da insanlarda dental analjezik olarak kullanılan öjenol, beta-karyofilen, metil öjenol ve humulen gibi terpenlerin, insanlar tarafından 8-10 ml kullanımlarına bağlı olarak karaciğer yetmezliği gelişebilmektedir (Eisen *et al.* 2004).

Yine deri problemlerinin tedavisinde kullanılan ölmez çiçek (*Helichrysum italicum*) bitkisinin toksik aktivitesinin belirlenmesi için *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde yapılan uygulamalarda bu bitkinin sitotoksik etkiler meydana getirdiği bildirilmiştir (Bakkali *et al.* 2005).

Dehidroabietik asit ve abietik asitin olası ömür uzunluğu ve gelişim toksisitelerinin araştırıldığı bir başka çalışmada bu metabolitlerin artan konsantrasyona bağlı olarak (0,25-8 mg/L) *D. manga* (su piresi)'da hayatta kalma süresini kısalttığı ve ayrıca total vücut büyüklüğünde küçülmenin meydana geldiği gözlenmiştir (Kamaya *et al.* 2005).

Özellikle akciğer hastalıklarında tercih edildiği bilinen ve kafur ağacı (*Cinnamomum camphora*)'ndan elde edilen kafur, limonen ve timol gibi terpenlerin *Saccharomyces cerevisiae* D7 suşunda mutajen ve toksik etkili olduğu Bakkali *et al.* (2005) tarafından belirlenmiştir.

Aynı şekilde tıbbi ve farmakolojik olarak çeşitli uygulamalarda kullanılan pelin otu (*Artemisia absinthium*) bitkisine ait tujon, felandren, timol, pinen, karyofilen gibi metabolitlerin de *Saccharomyces cerevisiae* D7 suşunda mutajen ve toksik etkili olduğu ayrıca mitokondriyal DNA üzerinde de mutasyonlar meydana getirdiği yine Bakkali *et al.* (2005) tarafından bildirilmiştir.

Gıda ve kozmetik sektörlerinin yanı sıra alternatif tıp yöntemlerinde de kullanılan dağ biberi (*Litsea cubeba*)'nin içermiş olduğu neral, geranial, sitral ve limonen metabolitlerinin farelere oral, deri ve nefes yoluyla uygulanması sonucunda mikronükleus oluşumuna ve kromozom aberasyonlarına sebep oldukları tespit edilmiştir (Luo *et al.* 2005).

Boğmaca ve öksürük, sinir sistemi zafiyeti, romatizma ve barsak hastalıklarına karşı özellikle çay olarak kullanımının yanı sıra antibakteriyel ve antienflamatuar etkilerinden de sıklıkla faydalanılan kekik bitkisi bileşenlerinden timol ve karvakrolün olası genotoksik aktiviteleri insan lenfositlerinde tek hücre jel elektroforezi ile incelenmiş ve düşük konsantrasyonlarda DNA aberasyonlarına neden olmazken yüksek konsantrasyonlarda DNA'da önemli zararlara neden olduğu görülmüştür (Aydın *et al.* 2005).

Mentha spicata (kıvrıcık nane)'dan elde edilen menton ve *Pinus sylvestris* (sarıçam)'ten elde edilen pine metabolitlerinin genotoksik etkileri *Drosophila melanogaster*'de kullanılarak somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılmış ve genotoksik etkili oldukları yapılan bu test yöntemi sonucunda belirlenmiştir. Aynı zamanda bu iki metabolitin insan lenfosit hücrelerinde de toksik etkili olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Korkmaz 2005).

Hassan *et al.* (2006), çemen otu bitkisi (*Trigonella foenum graecum*) bileşenlerinden olan β -sitosterol ve stigmasterolün farklı dozlarının fare karaciğer ve ovaryumunda DNA ve RNA içeriklerini değiştirerek histopatolojik değişimlere yol açtığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar tarafından bu değişimlerin önemli düzeyde olmadığı düşünülse de elde edilen sonuçlara dayanarak çemen otu bileşenlerinin toksik etkili olabileceği vurgulanmıştır.

Karanfil (*Syzygium aromaticum*)’de bulunan öjenol terpeni, *in vitro* şartlarda (2500 μ l) sıçan karaciğer hücrelerine uygulandığı zaman kromozom bozukluklarını ve endoreplikasyonu uyarmıştır (Maralhas *et al.* 2006).

Limolin, pinen, mirsen, linalool ve terpinolen gibi diğer monoterpenlerin insan prostat ve böbrek hücreleri ile maymun böbreği hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı Silva and Fernandes (2010) tarafından gözlenmiştir.

Bir monoterpen olan linalool ve onun ester yapısından köken almış linalil asetat terpenlerinin *Lavandula angustifolia* (lavanta çiçeği), *Ocimum basilicum* (fesleğen) ve daha birçok *Lamiaceae* (ballıbabagiller) türlerinde bulunduğu bilinmektedir. Di Sotto *et al.* (2008) bu metabolitlerin mutajenik ve antimutajenik aktivitelerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları ile *Escherichia coli* WP2uvrA suşlarını kullanılmışlar ve her üçünün de tüm suşlar üzerinde mutajenik etki gösterdiğini belirlemiştir.

Linalool ve linalil asetat gibi *Lamiaceae* familyasında bulunan terpenlerin *Salmonella typhimurium* üzerine mutajen/antimutajen etkileri AMES testi ile araştırılmış linalool terpeninin *Salmonella typhimurium* suşları üzerinde hiçbir mutajenik ya da antimutajenik etki göstermezken, linalil asetat *Salmonella typhimurium* WP2uvrA suşu üzerinde mutajenik olduğu bildirilmiştir (Di Sotto *et al.* 2008).

Gıda ve kozmetik endüstrilerinde sıklıkla kullanılan *Cymbopogon citratus* (limon otu), *Ocimum gratissimum* (fesleğen) ve *Ocimum basilicum* (reyhan) türlerinden elde edilen neral, mirsen, estragol, linalol, öjenol ve timol terpenlerinin sıçanlar üzerindeki akut ve subakut etkileri araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda bu terpenlerin tavsiye edilmeyen dozlarda (50, 500, 1000, 1500, 2000, 3000 ve 3500 μ l) uygulamalarına bağlı olarak yüksek yapılı organizmaların mide ve karaciğer organlarında fonksiyonel hasarlara neden olabileceği belirlenmiştir (Fandohan *et al.* 2008).

Sitral, geraniol ve mirsen gibi birçok terpeni içeren limon otu bitkisinin apoptoz ve nekroz ile hücre ölümüne neden olabilecek sitoplazmik bileşen sızıntısına yol açan akışkanlıkları değiştirerek hücre zarı geçirgenliğini artırabileceği de bildirilmiştir (Bakkali *et al.* 2008).

Fiori *et al.* (2008) tarafından gerçekleştirilen ve seskiterpen olan azulen ve guazilen terpenlerine ilişkin yapılan fotodegradasyon çalışmaları sonucunda guazilenin foto-reaktivite olduğu, reaktif oksijen türlerinin (ROS), özellikle tekli oksijen veya daha toksik kararlı fotoürünlerin aracılık ettiği fototoksositeye neden olduğu belirlenmiştir.

Timol ve karvakrol monoterpenlerinin sıçan kemik iliği hücrelerinde yapısal ve toplam kromozom anormalliklerini önemli ölçüde uyardıkları ve aynı zamanda mitotik indeksi doza bağlı olarak azalttıkları da Azirak ve Rencüzoğulları (2008) tarafından tespit edilmiştir.

Yine Büyükleyle 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.

Salvia fruticosa (Yunan adaçayı) ve *Mentha pulegium* (nane)'da bulunan sineol, tujon, kamfor, pulegon ve menton gibi terpenlerin etkileri, zeytin meyve sineği olarak bilinen *Bactrocera oleae* ve *D. melanogaster* üzerinde çalışılmıştır. Somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testi uygulandığında kamfor, pulegon ve mentonun *B.oleae*'da mutajenik etkiyi uyardığı görülmüştür. Sineol terpeni ise her iki organizmada da zayıf toksik etkili bulunmuştur (Kounatidis *et al.* 2009).

Kounatidis (2009)'e göre, tıpkı kamfor, pulegon ve menton metabolitleri gibi zeytinyağında bulunan skualen de *D. melanogaster*'de mutant klon sayısında artışa neden olarak somatik mutasyonları uyarmaktadır.

Kozmetik ürünlerinde sıklıkla kullanılan skualenin *D. melanogaster*'de sebep olduğu toksik etkiler Huang *et al.* (2009)'ın araştırmaları esnasında farelerde de gözlenmiş ve yüksek konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda düşük akut toksisiteye sebep olduğu bildirilmiştir.

Monoterpenlerden olan öjenolün insan epitel kolorektal adenokarsinom hücresi ya da kolon kanseri hücresi olarak da bilinen Caco-2 hücrelerinde de toksik etkili olduğu Slamenova *et al.* (2009) tarafından bildirilmiştir. Clark (2009)'a göre de retinol diterpeni sıçan, tavşan gibi farklı organizmalarda embriyotoksik etkiler göstermektedir.

Zingiber zerumbet (yabani zencefil)'ten elde edilen ve bir seskiterpen olan zerumbon, ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılan bir metabolittir. Ancak canlılar üzerine olası genotoksik etkileri hakkındaki bilgi eksikliklerini gidermek amacıyla yapılan bir çalışmada, zerumbonun dört farklı konsantrasyonu ile (10, 20, 40 ve 80 μ M) insan periferik lenfosit hücrelerinde *in vitro* olarak çalışılmış ve zerumbonun mitotik indeksi konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibe ettiği ancak klastojenik etkisinin anlamlı olmadığı, mikronükleus ve hücre proliferasyon testlerinde ise genotoksik etkinin görüldüğü ve bu etkinin ise pozitif anlamlı olduğu belirtilmiştir (Al-Zubairi *et al.* 2010).

Yapılan bazı çalışmalar monoterpenlerden kafur, okaliptol ve tujon terpenlerinin apoptoza sebep olduğunu, terpinen metabolitinin maymun hücrelerinde DNA kırılmalarını indükleyebildiğini ve metil öjenol monoterpenine maruz kalan sıçanlarda da karaciğer, akciğer, mesane, kemik iliği ya da böbrek dokusunda DNA hasarının meydana geldiğini ifade etmektedir (Ding *et al.* 2011).

Yine monoterpenlerden linoloolün (50 ve 100 mg/kg) farelerde nesneleri tanıma, pasif kaçınma, kısa ve uzun süreli bellek kayıpları gibi durumlara sebebiyet verdiği ve bu dejenerasyonların sebebinin de DNA'da meydana gelen hasarlar ile ilişkili olabileceği Coelho *et al.* (2011) tarafından bildirilmiştir.

Birçok sağlık ürününde doğal bir bileşen olarak kullanılan guazilenin normal insan hücrelerinde sitotoksik ve farklı bakteri suşlarında da fotomutajenik olabileceği gösterilmiştir (Fiori *et al.* 2011).

Aynı şekilde guazilen ve azulenin *Salmonella typhimurium* bakteriyel mutajenite deneyinde (Ames testi) mutajenik olduğu ve UV ışığı muamelesi sonucu yapılan *in vitro* Comet testinde ise *Salmonella*'da DNA hasarı meydana geldiği bildirilmiştir (Struwe *et al.* 2011).

Terpenlerin diğer bir sınıfı olan ve özellikle antioksidan etkinliklerinden dolayı sıklıkla tercih edilen karotenoidlerin yüksek konsantrasyonlarda kullanımına bağlı olarak insan periferik hücre kültürlerinde, fare, sıçan, beagle köpekleri ve bir çeşit kemirgen olan gerbil (*Pachyuromys duprasi*)'de DNA hasarına neden oldukları gözlenmiştir ve bunun sebebi de karotenoidlerin yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan aktiviteye sahip olabilmeleridir (Azgueta and Collins 2012).

Limon otu bitkisi metabolitlerinin de yüksek konsantrasyonlarda kullanımına bağlı olarak (metil öjenol, karyofilen gibi) insan kolon ve sinir hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği (Sharma *et al.* 2009) ve 800 μ g/ml⁻¹ uygulamasında ise insan lenfositlerinde DNA hasarı oluşturduğu gözlenmiştir (Sinha *et al.* 2014).

Pteridium aquilinum (kartal eğreltisi)'dan elde edilen ptaquilosid seskiterpeninin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimini uyararak önemli düzeyde genotoksik olduğu belirlenmiştir (Gil da Costa *et al.* 2014). Yüksek mitotik özelliği sebebi ile kanser araştırmalarında kullanılan nöroblastom hücreleri ile sağlıklı hücreler kullanılarak yapılan karşılaştırmalı çalışmada, guazilenin yüksek dozda total oksidatif seviyeyi (TOS) artırdığı tespit edilmiş ve bunun sonucunda sitotoksik etkiler gözlenmiştir. Ayrıca periferik kan lenfositleri ile yapılan çalışmada da guazilenin farklı dozlarda kullanımı sonucu (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 400 mg/L) yine sitotoksositeye yol açtığı belirlenmiştir (Vinholes *et al.* 2014; Togar *et al.* 2015; Llana-Ruiz-Cabello *et al.* 2015).

T. vulgaris (kekik) yağında bulunan timolün endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını artırdığı ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak apoptoza neden olduğu bulunmuştur (Chang *et al.* 2014).

Aroma maddesi olarak gıdalarda, koku verici olarak da kozmetikte kullanılan *Z.officinale*'ye ait gingerol terpeninin köpek proksimal renal tübüllerinde sitotoksik etkileri Koci *et al.* (2015) belirlenmiştir.

Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'da böğürtlen, yaban mersini, kiraz, şeftali, ahududu, çilek gibi çeşitli yabancı meyveleri enfekte eden *D. suzukii* ile yapılan bir çalışmada, *Mentha piperita* (nane) ve *Perilla frutescens* (biftek otu)'de bulunan mentol ve perillanın asetilkolinesteraz enzim inhibitörü olarak yine *D.suzukii*'ye karşı fumigant aktivite sergileyebileceği bildirilmiştir (Asplen *et al.* 2015).

Retinol diterpeninin yüksek konsantrasyonlarda tüketilmesi sonucu karaciğerde enfeksiyon ve tümör oluşumu gibi metabolik bozukluklar ile hücre sitotoksitesine ve hatta hamileliklerde bebeklerde konjenital malformasyonlara neden olduğu gözlenmiştir (Rajoshok and Sumathi 2015).

Astaksantin tetraterpeninin genotoksitesini belirlemeye yönelik olarak yapılan bir çalışmada, farelere kronik olarak astaksantin uygulanması yapılmıştır. Edwards *et al.* (2016)'a göre, astaksantin terpeninin kanserojenik olmadığı düşünülmüş olmakla birlikte artan konsantrasyona bağlı olarak (40, 200, 1000 mg) dişi farelerde iyi huylu, hepatoselüler adenom oranında artış gözlenmiştir.

Dianthus caryophyllus (karanfil), *Thymus vulgaris* (kekik), *Cinnamomum verum* (tarçın) ve *Zingiber officinale* (zencefil) gibi bitkilere ait terpenlerin gıdalarda kullanımlarının güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada köpek kemik iliği mezenkimal hücreleri ve enterosit hücreleri (ince bağırsak mukozas epitelinde bulunan emici hücreler)

kullanılmıştır. Bu bitkilere ait timol, gingerol, öjenol, mirsen, metil öjenol gibi çeşitli terpenlerin her iki hücre çeşidinde de toksik etki sergilediği belirtilmiştir (Ortega *et al.* 2016).

Baldissera *et al.* (2016), bir çeşit monoterpen olan alfa-terpinenin fare beyin nörotransmitterleri üzerinde asetilkolinesteraz (AChE) ve sodyum-potasyum pompası (Na^+ , K^+ , ATPaz) yoluyla güçlü nörotoksisiteye sebep olduğunu ve davranış anormalliklerini indüklediğini bildirmiştir.

Na^+ , K^+ , ATPaz'ın hücre içi iyon ve membran potansiyel homeostazı ile nöronal uyarılabilirlikte önemli rollere sahip oldukları bilinmektedir. Ancak farelerde bu enzimin etki mekanizmasında limonin, pinen, linalool gibi bazı monoterpenlerin düzensizlikler oluşturarak enzim aktivitesi inhibisyonuna, bozulmuş sinaptik yanıt ve sonuç olarak hafıza kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Pacheco *et al.* 2018). Aynı zamanda bu terpenlerin beyin nörotransmitterlerinin aktivitesindeki düzensizliklere dayalı olarak hafıza bozukluğuna neden olabileceği ve ROS seviyesini artırabileceği de çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Maharajan *et al.* 2018; Muthulakshmi *et al.* 2018).

Elettaria cardamomum (kakule) ve *Origanum majorana* (mercanköşkü)'da bulunan terpinen metabolitinin 0.5, 0.75 ve 1.0 mg/ml dozlarının farelere uygulanması sonucunda terpinenin tüm dozlarda hücre canlılığını azalttığı, DNA hasarını indüklediği ve ayrıca Na metabolizmasında değişikliklere neden olarak sitotoksik ve beyin hücrelerinde de genotoksik etkili olduğu görülmüştür (Baldissera *et al.* 2018).

Deneysel model olarak yine farelerin kullanıldığı bir çalışmada monoterpenlerden olan timolün olası nörotoksik etkisi araştırılmıştır. Farelere gavaj yoluyla verilen farklı dozlardaki timolün 20 ve 40 mg/kg dozlarda hafıza kaybına yol açtığı, kan-beyin bariyerinde meydana gelen yıkımda kontrol gruplarına göre önemli düzeyde artışa neden olduğu görülmüştür. Timolün fare beyin asetilkolinesteraz (AChE) enzimini artırdığı ve özellikle 20 ve 40 mg/kg timol uygulanan farelerde sodyum-potasyum pompası (Na^+ , K^+ , ATPaz) aktivitesinin inhibe edildiği ve beyindeki ROS seviyesinde yükselmeye yol açtığı belirlenmiştir (Baldissera *et al.* 2018).

MATERYAL VE METOT

Materyal

Kullanılan organizma.

Bu tez çalışması kapsamında terpenlerin olası toksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla genetik toksikoloji çalışmalarında sıklıkla tercih edilen *Drosophila melanogaster* model organizması kullanılmıştır. Charles W. Woodworth'un önerisiyle başlayan ve fizyoloji, patogeneze, yaşam öyküsü gibi çeşitli çalışmalarda yaygın olarak kullanılan *D. melanogaster* ilk kez 1910 yılında Amerikalı Zooloji ve Genetik uzmanı olan Thomas Hunt Morgan tarafından genetik araştırmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Morgan bu organizma ile yaptığı deneylerde kromozomlara dayanan çağdaş kalıtım kuramını geliştirmiş ve 1933 yılında Nobel Fizyoloji-Tıp ödülünü almıştır. Diptera (çift kanatlılar) takımına ait olan *D. melanogaster*, tam başkalaşım geçiren (holometabol) yabancı tip (wild type=w.t.) bir sinek türüdür. Bu sinek türü çoğunlukla çürümüş fermente meyvelerin üzerinde gelişim gösterdiğinden halk arasında meyve sineği veya sirke sineği olarak da bilinmektedir.

Drosophila'nın sistematigi.

Alem/Kingdom: Hayvanlar alemi/Animalia. Organ oluşumu ve organ sistemi organizasyonu gösteren, çok hücreli ökaryotik organizmalardan oluşmaktadır.

Şube/Phylum: Eklem bacaklılar/Arthropoda. Omurgasızların en büyük şubesi olan eklem bacaklıların vücutları baş, göğüs ve karın olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır. Her bölge farklı organ organizasyonunda görev alan segmentler içermektedir. İyi gelişmiş sinir sistemleri ve kitinden yapılmış bir dış iskeletleri bulunmaktadır.

Sınıf/Class: Böcekler/Insecta. Eklem bacaklılar şubesine ait olan böcekler, tür bakımından en kalabalık hayvan grubunu oluşturmaktadır. Böceklerin baş kısmında bir çift anten bulunmaktadır. Göğüs bölgesi her biri bir çift bacak taşıyan üç segment, karın bölgesi ise türe özgü olarak farklı renklerde ve farklı sayılarda segmentler içermektedir.

Takım/Ordo: Çift kanatlılar/Diptera. Bu takıma ait organizmalar tam başkalaşım (holometabol) gösteren ve vücutları üç kısımdan oluşan iki kanatlılardır. Baş kısmı bir çift anten, bir çift petek göz ve beslenme şekline bağlı olarak emici, parçalayıcı, yalayıcı, sokucu-emici gibi farklı ağız tiplerinden birisini taşımaktadır. Göğüs kısmı ise bacakların ve kanatların oluşumundan sorumlu segmentlerden oluşmaktadır. Abdomen kısmı 11 adet segmentten oluşsa da genellikle Diptera takımına dahil organizmalarda 7-8 adet segment görülmektedir.

Alt takım/Subordo: Karasinekler/Brachycera. Birbirinden farklı üç anten segmenti içeren ancak son anten segmentinin bir kıl (arista) gibi uzantıya sahip olduğu sinekler bu alt takıma dahildir. Antenleri ve vücutları kısa olup larvaları kurtçuk şeklindedir. Larval gelişimi takiben oluşan pupalar üçüncü larva evresinden kalma bir deri ile sarılır.

Aile/Family: Drosophilidae. Larvaları çürümüş meyvelerin üzerinde gelişim gösterdiği için meyve sinekleri olarak bilinirler.

Cins/Genus: *Drosophila*. Yaklaşık 750 türü bulunan ve boyut olarak ev sineğinin 1/3'ü büyüklüğe sahip olan sinekler, genellikle kahverengi vücut ve kırmızı göz rengine sahiptirler. Embriyonal dönemde başlayan ve ergin döneme kadar devam eden nörolojik gelişimleri nedeniyle nöro-genetik ve genetik araştırmalar da kullanılan organizmalardır.

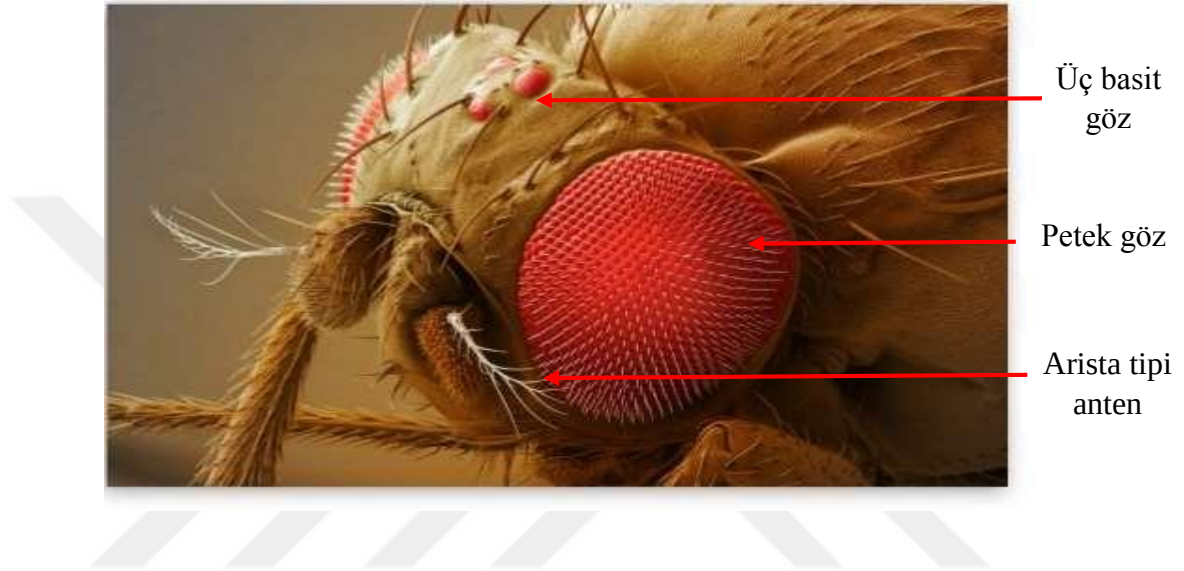
Tür/Species: *D. melanogaster*.

D. melanogaster Oregon-R soyu, yabancıl bir soy olup yuvarlak-kırmızı göz, normal kanat ve kahverengi vücut rengine sahiptir (Şekil 14). Dişiler yaklaşık 2,5 mm boya sahip iken erkeklerin boyları dişilere göre biraz daha kısadır. Baş, göğüs (toraks) ve karın (abdomen) olmak üzere üç bölümden oluşan vücut yapılarının baş ve toraks kısmı makroseta (büyük sert kıllar) ve mikroseta (küçük yumuşak kıllar)'lar ile örtülüdür. Bu kıllar duyu organı olarak görev yaparken sayı ve şekilleri kalıtsal olarak değişmektedir.



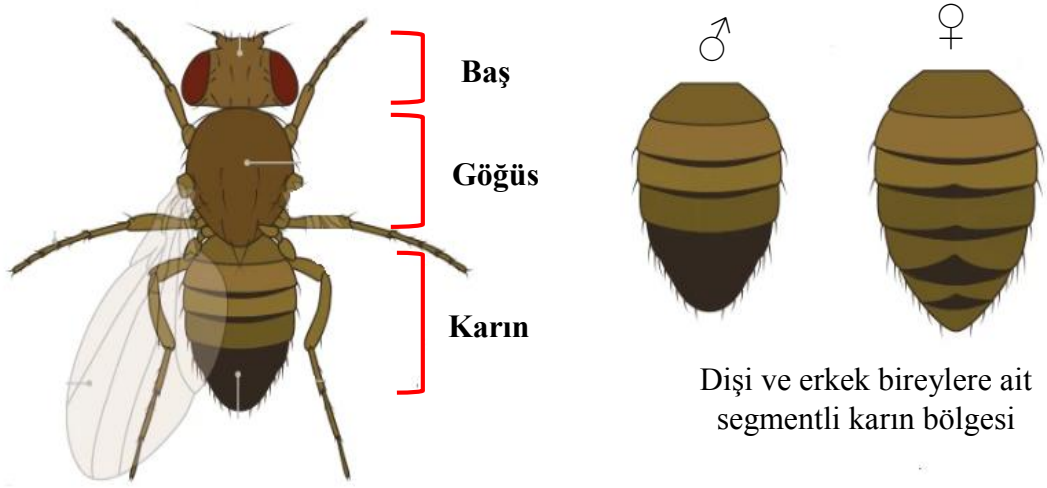
Şekil 14. *D. melanogaster* Oregon-R yabancıl soyuna ait ♀ ve ♂.

Baş bölgesinde yanlarda bir çift petek göz ve tepede üç basit göz (ocel) ile ağız ve bir çift arista tipi anten bulunmaktadır (Şekil 15). Göğüs bölgesi ise önden arkaya doğru sırasıyla protoraks, mesotoraks ve metatoraks olmak üzere üç segmentten meydana gelmektedir. Bu segmentlerin her birinden bir çift bacak çıkmaktadır. Ayrıca ikinci göğüs segmentinde bir çift kanat ve üçüncü göğüs segmentinde de bir çift halter organı bulunmaktadır. Halter organı fonksiyonel olarak körelmiş ikinci çift kanat yapısı olmakla beraber uçuş esnasında denge organı olarak işlev görmektedir.

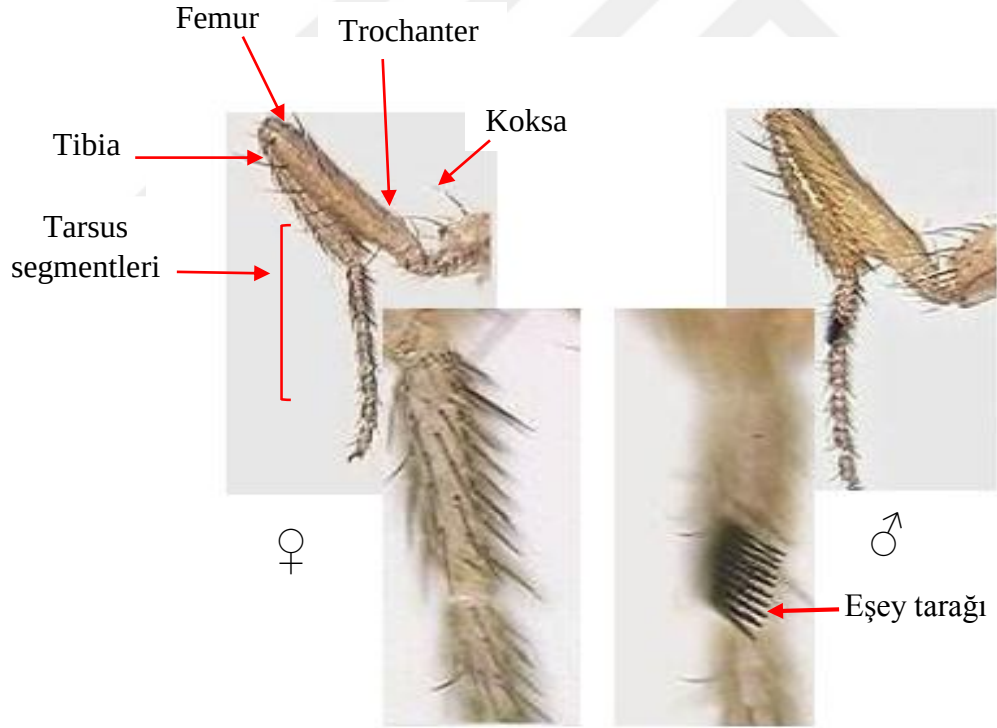


Şekil 15. *D. melanogaster*'in baş bölgesi.

Karın bölgesi ise dişi ve erkek bireylerde farklılık göstermektedir. Dişi bireylerde bu bölge uzun, açık ve koyu renkte çizgilerden meydana gelen 7 segmentten oluşurken yumurta oluşumuyla birlikte yuvarlaklaşmaya başlamakta ve daha da büyümektedir. Erkek bireyde ise karın kısmı kısa, açık ve koyu renkli beş segmentten oluşmaktadır. En son segment siyah renktedir (Şekil 16). Erkek ve dişi bireylerin karın kısmındaki gerek renk ve gerekse büyüklük farkından dolayı makroskobik olarak cinsiyet tayini yapılabilmektedir. Ayrıca dişilerde bulunmayan sadece erkek bireylerde bulunan eşey tarağı (metatarsal tarak) ise birinci çift bacağın birinci tarsus segmentinde sık kıllardan meydana gelmektedir. Eşey tarağı erkek bireylerde çiftleşme esnasında dişinin sabitlenmesini sağlamakta ve cinsiyet ayrımında önemli bir kriter olarak kullanılmaktadır (Şekil 17).



Şekil 16. *D. melanogaster*'in vücut yapısı ile dişi ve erkek bireyler arasındaki karın bölgesinin görünümü.



Şekil 17. *D. melanogaster*'in bacak yapısı ve erkek bireylerde bulunan eşey tarağı.

D.melanogaster'in $2n=8$ kromozomu bulunmaktadır (Şekil 18). I. çift kromozomu eşey kromozomu olup (X kromozomu) telosentriktir. II., III. ve IV. çift kromozomları ise otozom olup II. ve III. çiftler metasentrik, IV. çift yine bir telosentrik kromozomdur. Çok küçük olan IV. çift kromozom genellikle somatik hücrelerden hazırlanan karyotiplerde nokta şeklinde gözükmemektedir (Uysal *et al.* 2006).



Şekil 18. *D. melanogaster*'in dişi ve erkek bireylerine ait karyotipler.

***D.melanogaster*'in laboratuvarında kullanım nedenleri.**

1910 yılında T. H. Morgan tarafından ilk defa kullanılan *Drosophila*, 100 yıldan fazla süredir genetik çalışmalarda kullanılmakta ve halen günümüzde mekanizması en iyi anlaşılan model organizma olması nedeniyle biyoloji de çalışılan temel organizmalardan birisi olarak anlatılmaktadır (Graf and Singer 1992; Prokop 2016). 2000 yılında genom haritası paylaşılan *D. melanogaster* sitogenetik, popülasyon genetiği, moleküler genetik gibi genetiğin çeşitli alt dallarında gerçekleştirilen çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Çakır ve Sarıkaya 2004). Ayrıca 1927 yılında Müller'in toksikoloji çalışmalarında *D. melanogaster*'i kullanmasıyla başlayan süreç günümüzde de geliştirilen genotoksikoloji testlerinde bu organizmanın kullanımı ile devam etmektedir.

Bu organizmanın sıklıkla kullanılmasının sebepleri şunlardır;

1. Çok çeşitli doğal ya da yapay varyasyonların ve mutasyonların fenotipte gözlenebildiği bir organizmadır. Binoküler mikroskop altında göz renginde, göz şeklinde, vücut rengi, kanat veya kıl tipinde meydana gelebilecek varyasyonların gözlenebilmesi oldukça kolaydır (Graf and Singer 1992).

2. Bu türün yabanıl ve mutant bireyleri kısa hayat devrine sahiptirler. Yaklaşık 9-10 gün gibi bir sürede metamorfozu (başkalaşım) tamamlayıp eşeysel olgunluğa ulaşarak yeniden üreme periyoduna girerler.

3.Yapılan çaprazlamalar sonucunda çok sayıda yavru birey elde edilebilmektedir. Bu bireylerin ergin dişi ve erkekleri bazı morfolojik özelliklerine göre kolayca ayırt edilebilmektedir (Şekil 14).

4. Laboratuvarda yetiştirilme koşulları kolaydır ve besiyeri maliyeti oldukça ucuzdur.

5. Mitotik ve larval döneme özgü politen kromozomlara ait kromozom haritaları çıkarılmıştır ve bu kromozomların preparasyonları kolayca yapılabilir. Ayrıca *D. melanogaster*'in politen kromozomları gen aktivitesi tayininde de kullanılmaktadır.

6. *Drosophila* cinsine ait genom sekansı belirlenmiş ve insanlarda hastalıklara neden olan %60'dan fazla genin bu tür ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir.

7. Kanser, nöroloji ve renal hastalıklar, metabolizma bozuklukları ile yapısal anormallikleri belirleyen genlerin çoğunluğunun *D. melanogaster*'de homologlarının bulunduğu ve insan hücre döngüleri ve düzenleyici yolların birbirine benzer olduğu bilinmektedir (Bernards and Hariharan 2001).

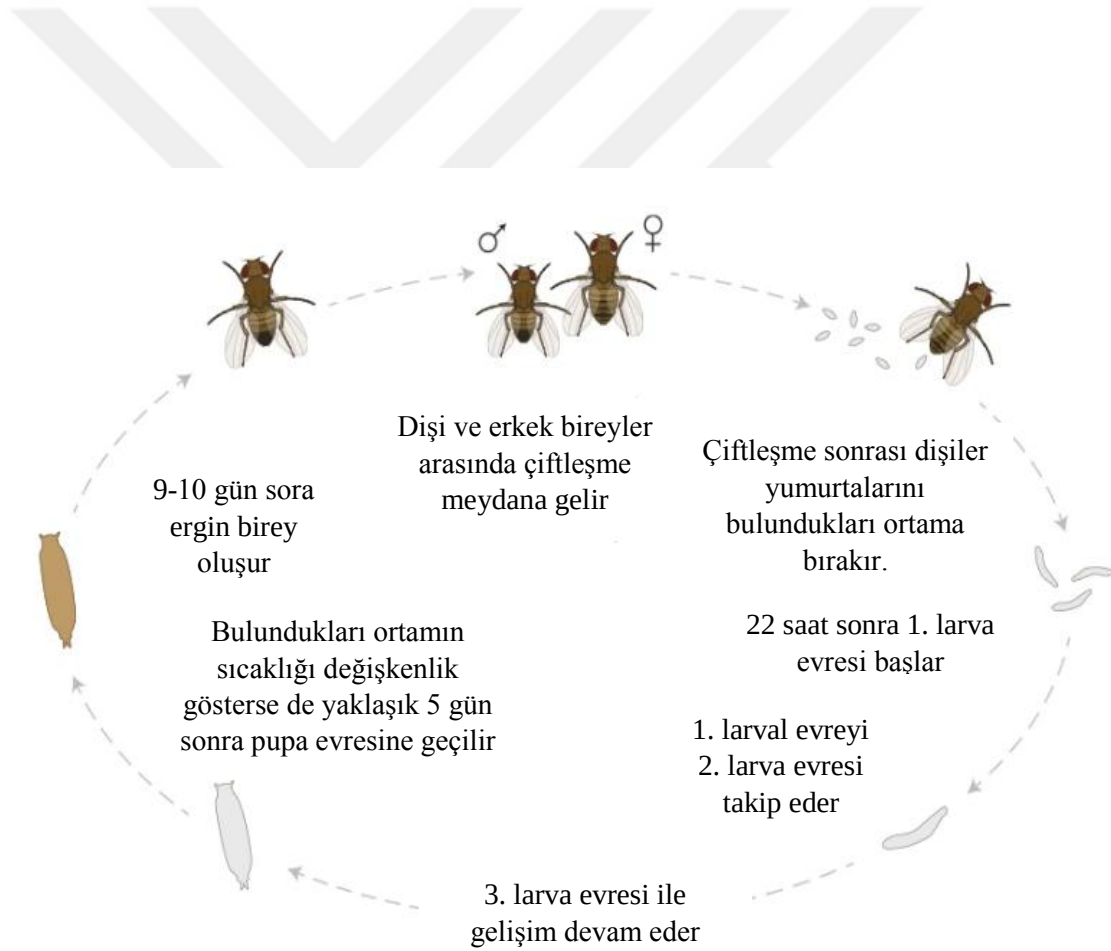
Bu özelliklerin tümü *Drosophila*'nın model organizma olarak genetik denemelerde tercih edilmesinin sebepleridir (Bernards and Hariharan 2001; Uysal *et al.* 2006).

***D. melanogaster*'in yaşam döngüsü.**

D. melanogaster yumurtadan-ergine yaşam döngüsünü tam başkalaşım geçirerek tamamlar. Dişiler tarafından bırakılan döllenmiş yumurtalar önce gelişimin ilk periyodu olan ve birinci, ikinci, üçüncü larva dönemlerini kapsayan embriyonik periyot evresini geçirirler. Embriyonal gelişimden sonra postembriyonik periyot başlar ve ergin birey oluşumuna kadar devam eder. Bu gelişim evrelerinin yaklaşık süreleri Tablo 4'de gösterilmiştir. İlk larval dönem döllenmeden yaklaşık 22-24 saat sonra başlar ve iki deri değişiminden sonra larval dönem sona erip yaklaşık 5. günde prepupa evresine geçilir. Prepupayı pupa evresi takip eder ve ergin birey haline geçiş için gerekli süre $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de yaklaşık 9-10 gündür (Şekil 19). Ancak başkalaşım süresi ve ömür uzunluğu üzerinde farklı parametrelerin etkili olduğu da çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Bu parametreler arasında ısı değişikliği (Sorensen and Loeschcke 2002; Sinclair and Roberts 2005; Uysal *et al.* 2006; Ayar *et al.* 2009) beslenme (Uysal *et al.* 2009; Ayar *et al.* 2009), popülasyon yoğunluğu, çiftleşme, radyasyon, nem (Clark and Rockstein 1964; Ünlü and Bozcuk 1979) gibi faktörler sayılabilir.

Tablo 4. *D. melanogaster*'in Gelişim Evreleri ve Süreleri

Saat	Yaklaşık Gün	Evreler
(0)	0	Yumurta
(0-22)	0-1	Embriyo
(22-70)	1-3	Larva gelişimi
(118-122)	5	Pupa evresine geçiş ve prepupanın deri değiştirmesi
(130-167)	5,5-7	Anterior ucun çekilmesi ve göz pigmentlerinin oluşumu
(215)	9	Pupadan ergin bireyin çıkışı



Şekil 19. *D. melanogaster*'in hayat döngüsü.

İn vivo ömür uzunluğu testinde kullanılan D. melanogaster'in Oregon-R yabanıl soyu.

Terpenlerin  m r uzunluğu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uzun yıllardan beri kendileştirilmiş genetik olarak homozigot, hiçbir mutant karakter taşımayan ve bir laboratuvar stoğu olan *D. melanogaster*'in Oregon-R yabanıl soyu kullanılmıştır.

İn vivo somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan D. melanogaster'in mutant soyları.

Tez çalışmasının ikinci bölümü olan ve terpenlerin genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan SMART yönteminde *D. melanogaster*'in normal metabolik aktiviteye sahip *flare* (*flr³*) (şekil 20) ve *multiple wing hair* (*mwh*) (şekil 21) mutant soyları kullanılmıştır. Bu soylar Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uzun yıllardan beri genetik yönden homojen olarak yaşatılmaktadır. Somatik mutasyon ve rekombinasyonları belirlemek için bu stokların üçüncü kromozomları üzerinde bulunan iki belirleyici gen kullanılmıştır. Stokların genotipik yapısı şu şekildedir;

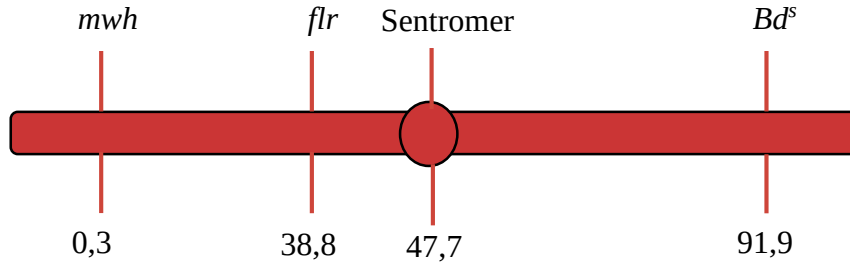
1. *flare* (*flr3*)/*ln* (*3LR*) *TM3*, *ri pp sep l(3)89Aa bx34e es BdS*.

Bu stok kısaca *flr3/TM3*, *BdS* şeklinde de gösterilmektedir.

2. *multiple wing hair* (*mwh/mwh*)

Bu mutant soylardan *flare* (*flr³*) mutant soyu, *flr³* belirleyici (marker) genine bağlı olarak normal sineklerin (yabanıl tip) kanatlarındaki normal, düz ve uzun kıllar (trikom) yerine körelmiş, kısalımış nokta şeklinde, koyu renkli balon veya kalın düzgün olmayan kıl oluşmasına neden olmaktadır (Graf *et al.* 1984). Bu gen III. kromozom kolunun sentromere yakın (3-38,8) olan bölümünde bulunmaktadır (şekil 20) ve bulunduğu canlıda *flr³* geni homozigot durumda iken embriyonik evrede letalite göstermesi sebebiyle ergin bireyler oluşmamaktadır. *flr³* geninin embriyonik letal etkisinden kurtulmak için dengeleyici bir kromozom olan *TM3* kromozomu ile heterozigot durum getirilen bu bireyin kanat imajinal disklerinden mutant kanat hücrelerinin gelişimi sağlanmaktadır (Graf *et al.* 1998). Normal kanatların kenarları düzgün bir şekilde iken, *Bd^S* genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün olmayıp testere dişi şeklindeki fenotipe sahiptir (şekil 21).

Diğer bir mutant soy olan *multiple wing hair* (*mwh*) ise kanat kıllarının aynı hücreden üç veya daha fazla sayıda çıkması şeklinde kendini gösteren *mwh* marker genini taşımaktadır (şekil 22). Bu gen III. kromozomun telomere yakın bölümünde (şekil 20) bulunur (3-0,3) ve resesiftir (Graf *et al.* 1998).



Şekil 20. *mwh* ve *flr* belirleyici genlerinin III. kromozom üzerindeki lokasyonları.



Şekil 21. *Flare* mutant türüne ait erkek birey (ok işareti testere dişi şeklindeki kanat yapısını göstermektedir).



Şekil 22. *Multiple wing hair* mutant türüne ait dişi birey.

Kullanılan kimyasal maddeler.

Çalışmamızda olası genotoksik etkilerini araştırdığımız timol (2-izopropil-5-metilfenol, Cas No: 89-83-8), guazilen (1,4-dimetil-7-isopropylazulene, Cas No: 489-84-9), abietik asit (7,13-abietadien-18-oik asit, Cas No: 514-10-3), skualen (2,6,10,15,19,23 heksametil-2,6,10,14,18,22-tetrakosaheksaen, Cas No: 111-02-4) ve astaksantin (3,3'-dihidroksi-beta, beta-karoten-4,4'-dion, Cas No: 472-61-4) terpenleri Sigma-Aldrich şirketinden temin edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan diğer kimyasal maddeler ve alımın yapıldığı firmalar Tablo 5 ve Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5. *Ömür Uzunluğu Test Yönteminde Kullanılan Kimyasal Maddeler*

Test Tekniği	Kimyasal Madde	Firma Adı
Ömür Uzunluğu Testi	Agar-agar	Bacto™ Agar
	Dietil eter	Merck
	Propionik asit	Merck
	Dimetil sülfoksit	Merck

Tablo 6. *SMART'da Kullanılan Kimyasal Maddeler*

Test Tekniği	Kimyasal Madde	Firma Adı
SMART	<i>Drosophila</i> besiyeri	Carolina Bio. Supp.
	Agar-agar	Merck
	Dietil eter	Merck
	Propionik asit	Merck
	Gliserol	Merck
	Kloral hidrat	Merck
	Arap zımkı	Sigma
	Etil metansülfonat	Sigma
	Sodyum hidroksit	Merck
	Entellan	Merck

Kullanılan alet ve cihazlar.

Sürdürülen deneysel çalışmalar esnasında Tablo 7'de markaları ile birlikte belirtilmiş olan çeşitli alet, cihaz ve laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır.

Tablo 7. *Genetik Laboratuvarında Kullanılan Cihaz ve Malzemeler*

Cihaz/Malzemeler	Markası
Hassas terazi	KERN ABJ 220-4M
Otomatik pipet	Eppendorf
Saf su cihazı	GFL 2001-4
No-frost buzdolabı	Vestel IDEA 465 A NF
Isıtmalı-soğutmalı sıcaklık kabini	Binder Etüv RE 53
Kuru hava sterilizatörü	BINDER ED 115 Sterilizatör
Tweezers	Sigma-Aldrich
Besiyeri ve preparat hazırlamak için kullanılan laboratuvar malzemeleri	Cam şişe, baget, beher, erlenmayer, cam kroze, petri kabı, kurutma kağıdı, tıkaç, lam, lamel

Yöntem

Besiyeri ortamının hazırlanması.

Laboratuvar stok kültürleri Standart *Drosophila* Besiyeri'nde (SDB) tutulmaktadır. SDB hazırlamak için kullanılan malzemeler miktarları ile Tablo 8'de verilmiştir. Besiyeri hazırlanırken öncelikle 440 ml saf su kaynatılır. Ayrı bir beherde bulunan 125 ml saf suya mısır unu ve bira mayası eklenerek homojen hale getirilir. Kaynamaya başlayan 440 ml saf suya sırasıyla agar ve şeker ilave edilip cam baget yardımıyla karıştırılır. Kaynayan agar ve şeker karışımına ayrı bir beherde hazırlanan mısır unu ve bira mayası karışımı da eklenerek yaklaşık 15 dk kısık ateşte kaynatılarak kıvam alması sağlanır. Besiyeri biraz soğumaya bırakılır ve içine küf inhibitörü olarak 3-3,5 ml propiyonik asit ilave edilir. Hazırlanan SDB, henüz sıcakken steril 250 ml'lik kültür şişelerine dökülür. Son olarak kültür şişeleri üstlerine temiz kurutma kâğıtları kapatılarak bir gün oda sıcaklığında soğumaları için bekletilir. Besiyerleri soğuyup katılaştığında kültür şişelerinin ağızları steril süngerlerle kapatılıp kullanılıncaya kadar buzdolabında saklanır.

Tablo 8. *Standart Drosophila Besiyeri İçeriği*

Madde	Madde Miktarı
Agar-agar	9 gr
Toz şeker	60 gr
Bira mayası	19 gr
Mısır unu	50 gr
Propionik asit	3,5 ml
Saf su	565 ml

Bu çalışma kapsamında SDB dışında Sigma-Aldrich firmasından temin edilen *Drosophila* Instant Medium (DIM) olarak bilinen hazır besiyerleri de uygulama ve kontrol gruplarına ait bireylerin yetiştirilmesi için kullanılmıştır.

Eterizasyon (bayıltma) yöntemi.

Drosophila cinsine ait ergin bireyler negatif geotropik (yerçekiminin tersine), pozitif fototropik (ışığa doğru) ve kemotropik (kimyasal maddelere/kokuya) yönelim gösterdiklerinden çeşitli manipülasyonların yapılabilmesi için dietil eter kullanılarak bayıltma işlemine tabi tutulurlar. Sinekler cam krozeyle alınıp içinde bir miktar eter bulunan erlenmayer içine yerleştirilir. Krozenin tabanında bulunan torf gözeneklidir ve bu sayede eter krozenin içine buharlaşır. Krozenin gövdesinde bulunan sinekler bu şekilde kısa bir süre içinde bayıltılmış/eterize edilmiş olur. Eterizasyon işlemi, stok kültürlerin yenilenmesinde ve uygulama gruplarının oluşturulmasında kullanılır. Ancak sinekler uzun süre etere maruz bırakılmamalıdır.

Ömür uzunluğu testi için ön kültürlerin oluşturulması ve ergin bireylerin toplanması.

Ömür uzunluğu testinde *D. melanogaster*'in Oregon-R yabanıl soyuna ait dişi ve erkek bireyler kullanılmıştır. Bu bireyler arasında yapılacak olan çaprazlamalar için önce SDB hazırlanmıştır. Hazırlanmış SDB içeren kültür şişelerine yabanıl soya ait dişi ve erkek bireyler konularak çaprazlamalar başlatılmıştır. Hayat devrini tamamlayıp ergin birey hale gelen aynı yaşlı (1-3 günlük, 72±4 saatlik) yabanıl bireyler 3 gün süre ile 4'er saatlik periyotlar halinde erkekler ve özellikle dişiler virgin (bakire) olacak şekilde ayrı ayrı toplanmıştır. Her grup için 100'er tane toplanan dişi ve erkek sinekler taze SDB içeren şişelere ayrı ayrı konularak ısıtmalı-soğutmalı etüvlerde muhafaza edilmiştir.

Ömür uzunluğunda kullanılacak terpenlerin stok solüsyonlarının hazırlanışı.

Ömür uzunluğu deneylerinde kullanılmak üzere tüm terpenler öncelikle %1'lik DMSO'da çözülmüş ve 500 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Terpenlerin stok çözeltilerinin taze hazırlanmalarına ve uzun süreli bekletilmemelerine de özen gösterilmiştir. Ömür uzunluğu testinde kullanılmak üzere hazırlanan stok çözeltilerinin uygulama konsantrasyonları saf su ile seyreltilerek SDB'ye ilave edilmiştir.

Ergin bireylere terpenlerin uygulanması.

Terpenlerin ömür uzunluğu üzerine etkileri *D. melanogaster* Oregon-R yabanıl soyunun dişi ve erkek popülasyonlarında ayrı ayrı çalışılmıştır. Deneylerin tümünde kullanılacak dişi ve erkek sineklerin aynı yaşlı bireyler olması amaçlanmış bundan dolayı da ilk olarak taze besin ortamı içeren kültür şişelerinde 10 ♀ ve 10 ♂ şeklinde çaprazlamalar yapılmıştır.

Yapılan aprazlamalar ile oluşturulmuş n stoklardan 9. günden itibaren ergin hale gelen bireyler, 6 saat sonra çiftleşme yeteneği kazandıklarından dişi ve erkekler ayrı ayrı olmak üzere 4'er saatlik periyotlar halinde 3 gün boyunca sürekli toplanmıştır. Bu şekilde 1-3 günlük ve çiftleşmemiş bireyler toplanarak hem uygulama gruplarında hem de kontrol gruplarında kullanılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılacak olan TİM, GUA, ABA, SKU ve ASTA terpenlerinin uygulama konsantrasyonlarını belirlemek için birçok n deneme yapılmıştır. Bu n denemelerde 25 ppm'den daha düşük konsantrasyonlarda herhangi bir etki gözlenmezken, 200 ppm'in üzerinde akut ölümler meydana gelmiştir. Bu nedenle her terpen için 25, 50, 100 ve 200 ppm olmak üzere dört farklı konsantrasyon ile çalışılmıştır.

Daha sonra ömür uzunluğu testi için iki ayrı deney seti oluşturulmuştur. Bu deney setlerinden ilki yalnızca SDB ve %1 DMSO+SDB içeren kontrol grubu, ikinci deney seti ise çalışmada kullanılan beş terpenin dört farklı konsantrasyonunu (SDB+25, 50, 100, 200 ppm TİM/GUA/ABA/SKU/ASTA) içeren uygulama gruplarıdır.

Kontrol ve uygulama gruplarına ait poplasyon yoğunluğu 100 ♀♀ ve 100 ♂♂ birey olarak belirlenmiştir. Ancak bireylerin toplu halde eterizasyonu, aktarımı ve ölen bireylerin ortamdan uzaklaştırılmasında yaşanabilecek güçlüklerden dolayı her uygulama gruplarına ait bireyler, başlangıç konsantrasyonları da göz önüne alınarak 4 gruba ayrılmış ve 25 bireyden oluşan küçük gruplar oluşturulmuştur.

Eř zamanlı olarak başlatılan tüm kontrol ve uygulama grupları ısıtmalı-soğutmalı etüvlerde ($25\pm1^{\circ}\text{C}$), %60 bağıl nem ve karanlık ortamda tutulmuştur. Böylece tüm çevresel faktörlerin stabil kalması, tek değişkenin farklı konsantrasyonlarda uygulanan beş farklı terpen olması sağlanmıştır. Ergin bireyler kronik uygulama için üç günde bir farklı konsantrasyonda terpenleri içeren taze besi yerlerine aktarılmış ve aktarım sırasında ölen bireyler kaydedilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlem en son birey ölünceye kadar sürdürülmüş ve denemeler üç kez tekrarlanmıştır.

Ömür uzunluğu testinden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri.

Hem kontrol hem de uygulama gruplarından elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 15.0 programı ile yapılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait maksimum ve ortalama ömür uzunluğu değerlerini karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi olan Tukey ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmış ve istatistiksel önemlilik düzeyi $P<0,05$ olarak kabul edilmiştir. Dişi ve erkek

popölasyonlarının her grubuna ait hayatta kalış eğrileri de Microsoft Windows Office Excel programı kullanılarak çizilmiştir.

SMART için ön kültürlerin oluşturulması ve ergin bireylerin toplanması.

SMART testinde fenotipte gözlenebilen uygun işaret genlerini taşıyan *Drosophila*'nın iki mutant türü kullanılmaktadır. Bu işaret genlerinden *flare* (*flr³*) geni, kanatlardaki normal düz ve uzun kıllar yerine körelmiş, nokta şeklinde kıl oluşmasına neden olmaktadır. *flr³* homozigot halde iken letallite gösterdiği için dominant işaret geni taşıyan dengeleyici bir kromozomla (*TM3Bd^S*) birlikte bu bireyler (*flr3/TM3Bd^S*) yaşatılmaktadır. Normal kanatların kenarları düzgün bir şekilde iken, *Bd^S* genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün olmayıp testere dişi şeklindeki fenotipe sahiptir. Diğer bir belirleyici gen olan *mwh* (*multiple wing hair*, çoklu kanat kılları) geni ise kanat kıllarının aynı hücreden üç veya daha fazla sayıda çıkması şeklinde kendini göstermektedir.

SMART yönteminde kullanılacak olan *D. melanogaster*'in bu iki mutant türüne ait erkek ve dişi bireylerin sayısını artırmak için ilk olarak taze SDB içeren ön kültür şişeleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kültür şişelerine çaprazlamaların yapılması için *flr³* ve *mwh* türlerinin erkek ve dişileri eterize edilerek ayrı ayrı konulmuştur. Çiftleşmeleri takiben hayat devrini tamamlayıp ergin birey hale gelen aynı yaşlı (1-3 günlük, 72±4 saatlik) *flr³* ve *mwh* sinekleri, 4'er saatlik periyotlar halinde özellikle dişiler virgin (bakire) olarak toplanıp taze SDB içeren şişelerde dişi ve erkekler ayrı ayrı olmak üzere ısıtmalı-soğutmali etüvlerde muhafaza edilmiştir.

Trans-heterozigot larvaların elde edilmesi.

Bunun için daha önceden virgin olarak toplanıp muhafaza edilen bireyler kullanılarak çaprazlamalar yapılmıştır. Çaprazlamalar yine önceden hazırlanmış SDB içeren kültür şişelerinde ve deney planlamasına göre her şişede ortalama 40 *flr³* dişi ve 40 *mwh* erkek olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Çaprazlamaların genotipik gösterimi aşağıdaki gibidir;

$$P: flr^3/In(3LR) TM3, BdS \text{ } \text{♀} \text{♀} \times mwh/mwh \text{ } \text{♂} \text{♂}$$

Yapılan çaprazlamalarda, *flr³* stoklarına ait dişi bireyler, yumurta verimlerinin *nmwh* dişilerine göre daha yüksek olmasından dolayı tercih edilmiştir. Ancak resiprokal çaprazlamalar ile de trans-heterozigot larvalar elde edilmiştir. Aynı şişeye konulan dişi ve erkek bireyler oogenezin oluşması için en az 24 saat aynı ortamda bekletilmiştir. Bir gün sonunda çalışmada kullanılacak larvaların aynı evrede olmaları açısından çaprazlamada kullanılan ergin bireyler

taze besiyerleri içine 4'er saatlik periyotlarla aktarılmıştır. Bu işlem daha fazla sayıda larva elde etmek için tekrarlanmıştır.

SMART'da kullanılacak terpenlerin stok solüsyonlarının hazırlanışı.

SMART'da kullanılmak üzere tüm terpenler öncelikle %1'lik DMSO'da çözülmüş ve 500 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Terpenlerin stok çözeltilerinin taze hazırlanmalarına ve uzun süreli bekletilmemelerine de özen gösterilmiştir. SMART yönteminde kullanılmak üzere hazırlanan stok çözeltilerinin uygulama konsantrasyonları *Drosophila* Instant Medium (DIM)'una saf su ile seyreltilerek ilave edilmiştir.

Trans-heterozigot larvalara terpenlerin uygulanması.

Tüm deneylerde kullanılacak olan TİM, GUA, ABA, SKU ve ASTA terpenleri ile ilk olarak uygulama konsantrasyonlarını belirlemek için birçok ön deneme yapılmıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda her terpen için 50, 100, 200 ve 400 ppm olmak üzere dört farklı konsantrasyon belirlenmiştir. Bu konsantrasyonların en düşük konsantrasyonu olan 50 ppm'in altındaki konsantrasyonlarda herhangi bir genotoksiste gözlenmemiş iken en yüksek konsantrasyon olan 400 ppm'in üstündeki konsantrasyonlarda ise larvaların yaşama yüzdeleri oldukça düşmüştür. Bu nedenle belirlenen konsantrasyonların daha düşük ve daha yüksek konsantrasyonlar ile çalışılmamıştır. TİM, GUA, ABA, SKU ve ASTA terpenlerinin belirlenmiş dört farklı konsantrasyonunun (50, 100, 200 ve 400 ppm) DIM'a eklenmesiyle uygulama grupları oluşturulmuştur. Kontrol grupları ise terpenlerin çözücüsü olan %1'lik DMSO ve saf suyla hazırlanan negatif kontrol grupları ve genotoksitesi iyi bilenen 1 ppm etil metansülfonat (EMS) pozitif kontrol grubudur. Daha sonra uygulama ve kontrol gruplarına ait besiyerlerini içeren kültür şişelerine, 100'er trans-heterozigot larva konulmuştur. Uygulama ve kontrol gruplarına ait tüm kültür şişelerindeki larvalar başkalaşımalarını tamamlayıp ergin birey haline gelinceye kadar ısıtmalı-soğutmali etüvlerde muhafaza edilmiştir.

Başkalaşımı tamamlayan ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması.

Kontrol ve uygulama gruplarına ait larvalardan elde edilen ergin bireyler günlük olarak eterize edilip toplanmıştır. Bu bireyler onlara ait kanat preparatlarının hazırlanması için %70'lik etil alkol içeren ependorf tüpleri içerisinde +4°C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra kanatların morfolojilerine göre normal kanat ve serrat kanat için ayrı ayrı preparatlar yapılmıştır. Kanat preparatlarının yapımı için Faure solüsyonu hazırlanmıştır (Schaik and Graf 1991). Bu solüsyonun içeriği Tablo 9'da verilmiştir. Kanat preparatları hazırlanırken etil alkolde saklanmış olan her bir sinek çukur lam ya da saat camı üzerine damlatılan faure solüsyonuna

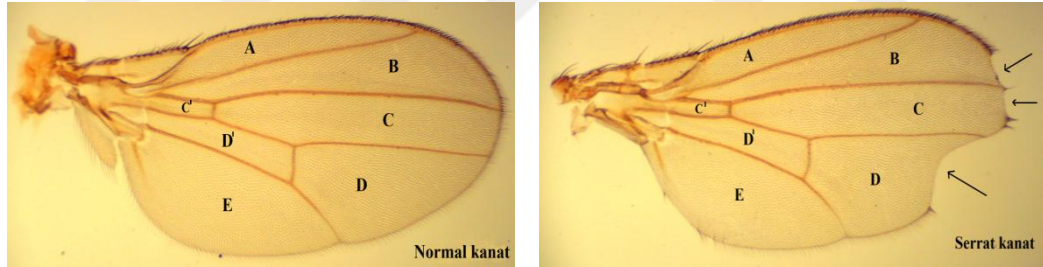
alınarak binoküler mikroskop altında ince uçlu pensler ile onlara ait kanatlar vücuda bağlandığı yerden özenle ayrılmıştır. Her çift kanat yan yana olacak şekilde lam üzerinde belirli aralıklarla dizilmiştir. Lam üzerinde ortalama 80 adet kanat yerleştirildikten sonra preparatlar toz almayacak şekilde bir gün süre ile kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlara bir iki damla entellan damlatılarak üzerlerine lamel (24x60 mm) kapatılıp, tekrar kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmeye hazır hale gelmiştir.

Tablo 9. *Faure Solüsyonunun İçeriği*

Madde	Madde Miktarı
Gam arabik	30 gr
Gliserol	20 ml
Kloral hidrat	50 gr
Distile su	50 ml

Kanat preparatlarının mikroskobik analizi.

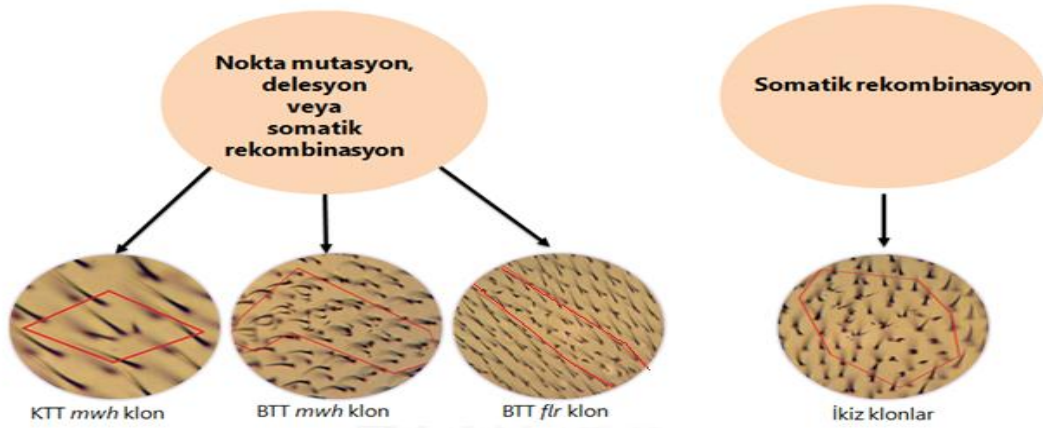
Hazırlanmış olan kanat preparatları ışık mikroskobu altında incelenmiştir (10x10). Mutant klonlara ait incelemeler yapılırken kanatlar üzerindeki A, B, C', C, D', D ve E sektörleri dikkate alınmıştır (Şekil 23).



Şekil 23. Normal ve serrat kanat fenotiplerine ait sektörler.

Kanatların hem dorsal hem de ventral yüzeydeki hücre tabakaları ayrı ayrı incelenmiştir. Böylece kanatların mutant klon taşıyıp taşımadıkları daha net bir şekilde belirlenmiştir. Mutant hücre klonları farklı benek gruplarına ayrılarak kaydedilmiştir. Tekli benekler yalnızca *mwh* veya *flr³* fenotipinde iken, ikili benekler benekler *mwh* ve *flr³* fenotiplerini beraber taşımaktadırlar. Tekli benekler 1-2 hücreli ise küçük tek tip benek (1-2 *mwh* hücre), 3 veya daha fazla hücre gruplarından oluşuyorsa büyük tek tip benek (≥ 3 *mwh* veya ≥ 4 *flr³* hücre) olarak isimlendirilmektedir. Tekli benekler, nokta mutasyonu, delesyon ve iki işaret geni arasındaki mitotik rekombinasyonla oluşurken, ikili benekler 3. kromozomun sentromeri ve *flr³* geni arasındaki somatik rekombinasyon ile meydana gelmektedir (Şekil 24). Yapılan bu sınıflandırmaya uygun mutant klonların sayısı uygulama gruplarına ait her terpen ve her

konsantrasyon için ayrı ayrı olmak üzere kayıt altına alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 24. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi sonuçlarının mikroskopik gösterimi (10x40).

Klon indüksiyon frekansının hesaplanması.

Kronik uygulama çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile her hücre bölünmesindeki klon indüksiyon frekansı da belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekansı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Szabad *et al.* 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^5$$

Bu denklemde sadece *mwh* klonları göz önüne alındığında “f” *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “n” ise gözlenmiş olan toplam *mwh* klon sayısını göstermektedir. “N” ve “C” ise sırasıyla analiz edilmiş olan kanat sayısını ile bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını ifade etmektedir. Aynı zamanda bir kanadın her iki yüzünde incelenebilecek hücre sayısının 24 400 olduğu kabul edilmiştir (Würgler and Vogel 1986).

Yapılan çaprazlamalardan elde edilen trans-heterozigot larvalardan gelişen ergin bireyler, kanat yapıları bakımından normal ve serrat kanat olmak üzere iki farklı fenotipte gözlenmektedir. Serrat kanatlılarda bulunan dengeleyici kromozom, bu kromozoma yerleştirilmiş dominant mutant bir gen olan *Serrate* (*Ser*)’ın varlığı ile tespit edilebilmektedir. Normal kanatlılarda mutasyon ve rekombinasyonlar ile meydana gelen mutant klonlar, serrat kanatlılarda ise var olan dengeleyici kromozomun (*TM3*) rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece mutasyonlar sonucu oluşan mutant klonlar gözlenmektedir. Böylece normal ve serrat kanatlı bireylerden elde edilen verilerle çalışmada kullanılan ajanın mutajenik ve/veya rekombinojenik etkileri ayrı ayrı tespit edilebilmektedir (Vogel 1992; Frei and Würgler 1996).

SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi.

SMART yönteminden elde edilen sonuçların istatistiksel analizi Microsta bilgisayar programı ile yapılmıştır. Microsta ile hesaplanan orijinal ve alternatif hipotezlerin sonuçları Tablo 10'a göre pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) ve negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Selby and Olsen 1981; Frei and Würgler 1988).

Tablo 10. Orijinal (H_0) ve Alternatif (H_a) Hipotezlerin Değerlendirilmesi

Hipotezler		Ha (Alternatif)	
		Kabul ($1 - \beta$)	Red (β)
H_0 (Null)	Kabul	Önemsiz Fark (i)	Negatif (-)
	$(1 - \alpha)$	$P = (1 - \alpha)(1 - \beta) = 1 - \alpha - \beta + \alpha\beta$	$P = (1 - \alpha)\beta = \beta - \alpha\beta$
	Red	Pozitif (+)	Zayıf Pozitif (z)
	(α)	$P = \alpha(1 - \beta) = \alpha - \alpha\beta$	$P = \alpha\beta$

Bu çizelgeye göre orijinal (null) hipotez (H_0)'de uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı kabul edilmiş, alternatif hipotez (H_a)'de ise uygulama grubunda meydana gelen indüklenmiş mutasyon oranının kontrol grubundan m defa daha fazla olduğu varsayılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez kapsamında, çeşitli endüstriyel alanlar ve alternatif tıp yöntemlerinde sıklıkla kullanılan timol (TİM), guazilen (GUA), abietik asit (ABA), skualen (SKU) ve astaksantin (ASTA) terpenlerinin olası toksik ve genotoksik etkileri, *Drosophila melanogaster* model organizmasının yabanıl ve mutant soyları kullanılarak *in vivo* ömür uzunluğu ve *in vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri (SMART) ile araştırılmıştır. Bu amaçla her iki test yöntemi için kontrol ve uygulama gruplarını içeren iki farklı deney seti oluşturulmuştur. *İn vivo* ömür uzunluğu testinde uygulamalar distile su ve DMSO ile hazırlanan negatif kontrol grupları ve terpenlerin dört farklı konsantrasyonu (SDM+25, 50, 100 ve 200 ppm) hazırlanan uygulama grupları ile yapılmıştır. SMART’da ise distile su ve DMSO negatif kontrol grupları dışında genotoksitesi iyi bilinen EMS pozitif kontrol grubuyla ve terpenlerin farklı konsantrasyonlarını (DIM+50, 100, 200 ve 400 ppm) içeren uygulama grupları ile çalışılmıştır.

***İn vivo* Ömür Uzunluğu Testinden Elde Edilen Bulgular**

Kontrol gruplarına ait ömür uzunluğunun belirlenmesi.

Çalışma kapsamında *D. melanogaster*’in ♀ ve ♂ popülasyonları ayrı ayrı olmak üzere distile su ve %1 DMSO içeren SDB ile kronik olarak beslenmiştir. Yapılan uygulamalar neticesinde distile su kontrol grubunda maksimum ömür uzunlukları ♀ popülasyonunda 77, ♂ popülasyonunda 76 gün olarak bulunmuştur. Distile su kontrol grubuna ait ortalama ömür uzunlukları ise ♀♀’de $49,39 \pm 1,96$ gün iken ♂♂’de $51,37 \pm 2,16$ gün olarak belirlenmiştir (Tablo 11). Diğer kontrol grubu olan DMSO’da ise maksimum ömür uzunlukları ♀ ve ♂ popülasyonlarının her ikisinde de 73 gündür. DMSO kontrol grubuna ait ortalama ömür uzunlukları ise ♀♀’de $49,07 \pm 1,92$, ♂♂’de $51,01 \pm 2,12$ gün olarak belirlenmiştir (Tablo 11). Uygulamalar sonucunda ♀ ve ♂ popülasyonlarının kontrol gruplarına ait maksimum ve ortalama ömür uzunlukları istatistiki olarak kendi aralarında karşılaştırılmış, distile su ve DMSO kontrol gruplarına ait maksimum ve ortalama ömür uzunlukları arasındaki farkın $P > 0,05$ düzeyinde anlamlı olmadığı görülmüştür (Tablo 11).

Uygulama gruplarından elde edilen veriler, terpenlerin çözücüsü olan DMSO kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak önem kontrolleri yapılmıştır.

Tablo 11. *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Distile Su ve DMSO Kontrol Gruplarına ait Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması

Kontrol Grupları								
Deney Grupları	Birey sayısı	♀♀	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*	Birey sayısı	♂♂	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*
		Maks. ömür				Maks. ömür		
Kontrol (1)	100	77	49,39 ± 1,96	>0,05	100	76	51,37 ± 2,16	>0,05
DMSO (2)	100	73	49,07 ± 1,92		100	73	51,01 ± 2,12	

Maks.: Maksimum, SH: Standart Hata, *: 0,05 düzeyinde fark önemli değildir.

Timol monoterpenin ömür uzunluğu toksisitesi.

Ömür uzunluğu üzerine toksisitesi araştırılan TİM monoterpeninin ön denemeler sonucu belirlenmiş olan dört farklı konsantrasyonu ile uygulama grupları (SDB+25, 50, 100 ve 200 ppm TİM) oluşturulmuştur. Kronik uygulamalar *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarında ayrı ayrı olmak üzere yapılmıştır.

TİM'in tüm uygulama gruplarına ait maksimum ömür uzunluğu verileri, DMSO kontrol gruplarına ait veriler ile karşılaştırılarak istatistiki analizler yapılmış ve sonuçlar $P<0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Şöyle ki; dişi popülasyonunda sırasıyla 77 ve 73 gün olan distile su ve DMSO kontrol gruplarına ait maksimum ömür uzunlukları TİM terpeninin 25, 50, 100 ve 200 ppm uygulama gruplarında sırasıyla 60, 54, 51 ve 42 güne; erkek popülasyonunda da 76 ve 73 gün olan maksimum ömür uzunlukları aynı uygulama gruplarında sırasıyla 54, 51, 51 ve 42 güne gerilemiştir (Tablo 12). Hem ♀ hem de ♂ popülasyonunda maksimum ömür uzunluğu bakımından artan konsantrasyona bağlı olarak gözlenen gerileme istatistiksel analizler sonucunda anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($P<0,05$).

Elde edilen veriler ile bu çalışmanın bir diğer parametresi olan ortalama ömür uzunlukları da hesaplanmıştır. 49,39 ± 1,96 ve 49,07 ± 1,92 gün olarak belirlenen kontrol gruplarının ortalama ömür uzunlukları, ♀♀'de 25, 50, 100 ve 200 ppm için sırasıyla 44,49±1,40; 37,38±1,45; 33,04±1,15 ve 23,09±0,74 güne gerilemiştir.

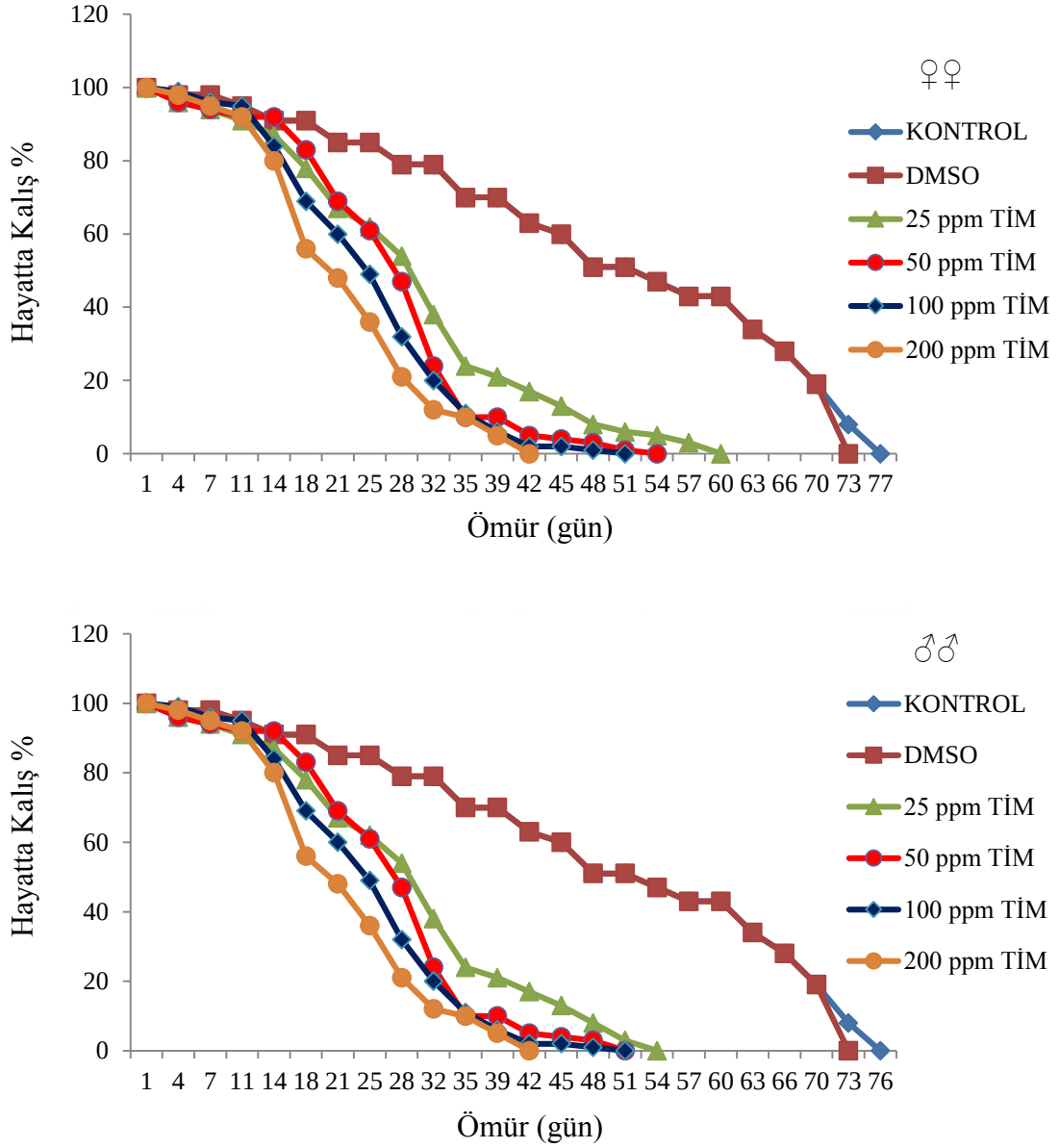
♂♂'de de ortalama ömür uzunluklarının kontrol gruplarına göre 51,37±2,16 ve 51,01±2,12 günden sırasıyla 43,20±1,10; 32,50±1,16; 29,08±0,92 ve 24,89±1,10 güne kadar gerilediği belirlenmiştir (Tablo 12). Kontrol ve uygulama grupları arasında hem ♀ hem ♂ popülasyonlarındaki ortalama ömür uzunlukları bakımından gözlenen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

Artan TİM konsantrasyonuna bağlı olarak negatif korelasyon değeri de hesaplanmış ve bu değer ♀ popülasyonunda $R = -0,511$, ♂ popülasyonunda ise $R = -0,555$ olarak bulunmuştur (Tablo 12). Aynı zamanda ♀ ve ♂ popülasyonu için çizilen hayatta kalış eğrileri Şekil 25’de verilmiştir.

Tablo 12. Kronik Olarak TİM Uygulanmış *D. melanogaster*’in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması

TİMOL								
♀♀					♂♂			
Deney grupları	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*
Kontrol 1 (1)	100	77	49,39±1,96		100	76	51,37±2,16	
DMSO (2)	100	73	49,07±1,92		100	73	51,01±2,12	
25 ppm (3)	100	60	44,49±1,40	1-4,5,6*	100	54	43,20±1,10	1-3,4,5,6*
50 ppm (4)	100	54	37,38±1,45	2-4,5,6*	100	51	32,50±1,16	2-3,4,5,6*
100 ppm (5)	100	51	33,04±1,15	3-4,5,6*	100	51	29,08±0,92	3-4,5,6*
200 ppm (6)	100	42	23,09±0,74	4-6*	100	42	24,89±1,10	4-6*
Regresyon düzeyi			$R = -0,511$			$R = -0,555$		

Maks.: Maksimum, SH: Standart Hata, *: 0,05 düzeyinde fark önemlidir.



Şekil 25. TİM uygulanmış *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.

Guazilen seskiterpeninin ömür uzunluğu toksisitesi.

Çalışmanın bu bölümünde farklı konsantrasyonlarda GUA'nın *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarında ömür uzunluğu üzerine olan toksisitesi belirlenmiştir. GUA'nın ön denemeler ile belirlenmiş dört farklı konsantrasyonu (SDB+25, 50, 100, 200 ppm GUA) ile uygulama grupları oluşturulmuş ve uygulamalar ♀ ve ♂ popülasyonlarında ayrı ayrı yapılmıştır. Distile su ve DMSO kontrol gruplarında maksimum ömür uzunluğunun sırasıyla ♀ popülasyonunda 77, 73 gün; ♂ popülasyonunda ise 76, 73 gün olduğu görülmüştür. Bu değerler, *D. melanogaster*'in ♀ popülasyonunda GUA uygulama gruplarından en düşük konsantrasyon olan 25 ppm'de 63, 50 ppm'de 57, 100 ppm'de 28 ve en yüksek uygulama grubu olan 200 ppm'de ise 21 güne gerilemiştir (Tablo 13). Maksimum ömür uzunlukları ♂

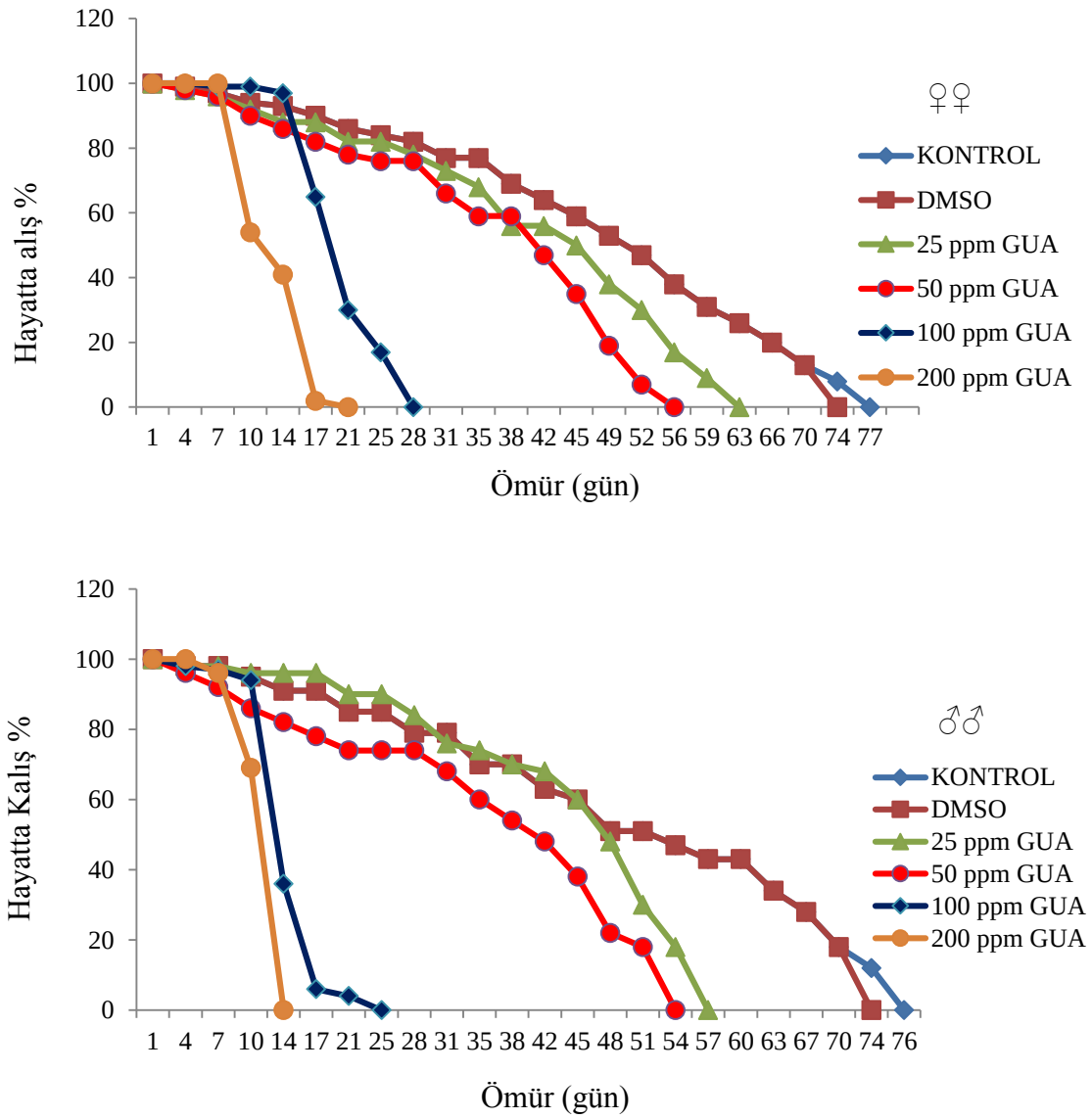
popülasyonunda ise 25, 50, 100 ve 200 ppm için sırasıyla 57, 54, 25 ve 14 gün olarak bulunmuştur. Artan konsantrasyona bağlı olarak her iki popülasyonda da maksimum ömür uzunluklarında gerileme olduğu belirlenmiştir (Tablo 13). Meydana gelen bu gerilemeler DMSO kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). ♀ ve ♂ popülasyonu için çizilen hayatta kalış eğrileri Şekil 26’da verilmiştir. ♀ ve ♂ popülasyonları için belirlenen ortalama ömür uzunlukları ise GUA uygulama gruplarının en düşük ve en yüksek uygulama gruplarında ♀ popülasyonunda sırasıyla 25 pmm’de $44,91\pm1,45$ günden 200 ppm’de $12,11\pm0,26$ güne; ♂ popülasyonunda da $44,70\pm1,22$ günden $11,44\pm0,21$ güne gerilemiştir (Tablo 13). Hem ♀ hem de ♂ popülasyonunda kontrol ve uygulama grupları arasında ortalama ömür uzunlukları bakımından gözlenen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

Ayrıca artan GUA konsantrasyonuna bağlı olarak negatif korelasyon değeri de hesaplanmış ve bu değer ♀ popülasyonunda $R = -0,699$, ♂ popülasyonunda ise $R = -0,722$ olarak bulunmuştur.

Tablo 13. *Kronik Olarak GUA Uygulanmış D. melanogaster’in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması*

GUAZİLEN								
♀♀					♂♂			
Deney grupları	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu $\pm$ SH	Önem kontrolü*	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu $\pm$ SH	Önem kontrolü*
Kontrol (1)	100	77	$49,15\pm1,99$		100	76	$48,48\pm2,24$	
DMSO (2)	100	74	$48,83\pm1,95$		100	74	$48,30\pm2,22$	
25 ppm (3)	100	63	$44,91\pm1,45$	1-4,5,6* 2-4,5,6*	100	57	$44,70\pm1,22$	1-4,5,6* 2-4,5,6*
50 ppm (4)	100	57	$41,01\pm1,32$	3-5,6* 4-5,6*	100	54	$37,38\pm1,45$	3-4,5,6* 4-5,6*
100 ppm (5)	100	28	$21,47\pm0,40$	5-6*	100	25	$15,42\pm0,34$	
200 ppm (6)	100	21	$12,11\pm0,26$		100	14	$11,44\pm0,21$	
Regresyon düzeyi			$R=-0,699$			$R=-0,722$		

Maks.: Maksimum, SH: Standart Hata, *: 0,05 düzeyinde fark önemlidir.



Şekil 26. GUA uygulanmış *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.

Abietik asit diterpeninin ömür uzunluğu toksisitesi.

ABA diterpeninin ön denemelerle belirlenmiş farklı konsantrasyonlarının *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonları üzerine olası toksik etkileri ayrı ayrı kronik uygulamalarla araştırılmıştır. ABA terpeninin dört farklı konsantrasyonunu (SDB+25, 50, 100 ve 200 ppm ABA) içeren uygulama gruplarının maksimum ömür uzunlukları ve ortalama ömür uzunluklarına ait veriler DMSO kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 14). Şöyle ki; maksimum ömür uzunlukları ABA uygulama gruplarında 25, 50, 100 ve 200 ppm için ♀♀'de sırasıyla 66, 60, 56 ve 49 gün, ♂♂'de ise 56, 53, 49 ve 46 gün olarak bulunmuştur. DMSO kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda uygulama gruplarına ait maksimum ömür uzunluklarındaki gerileme $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Tablo 14).

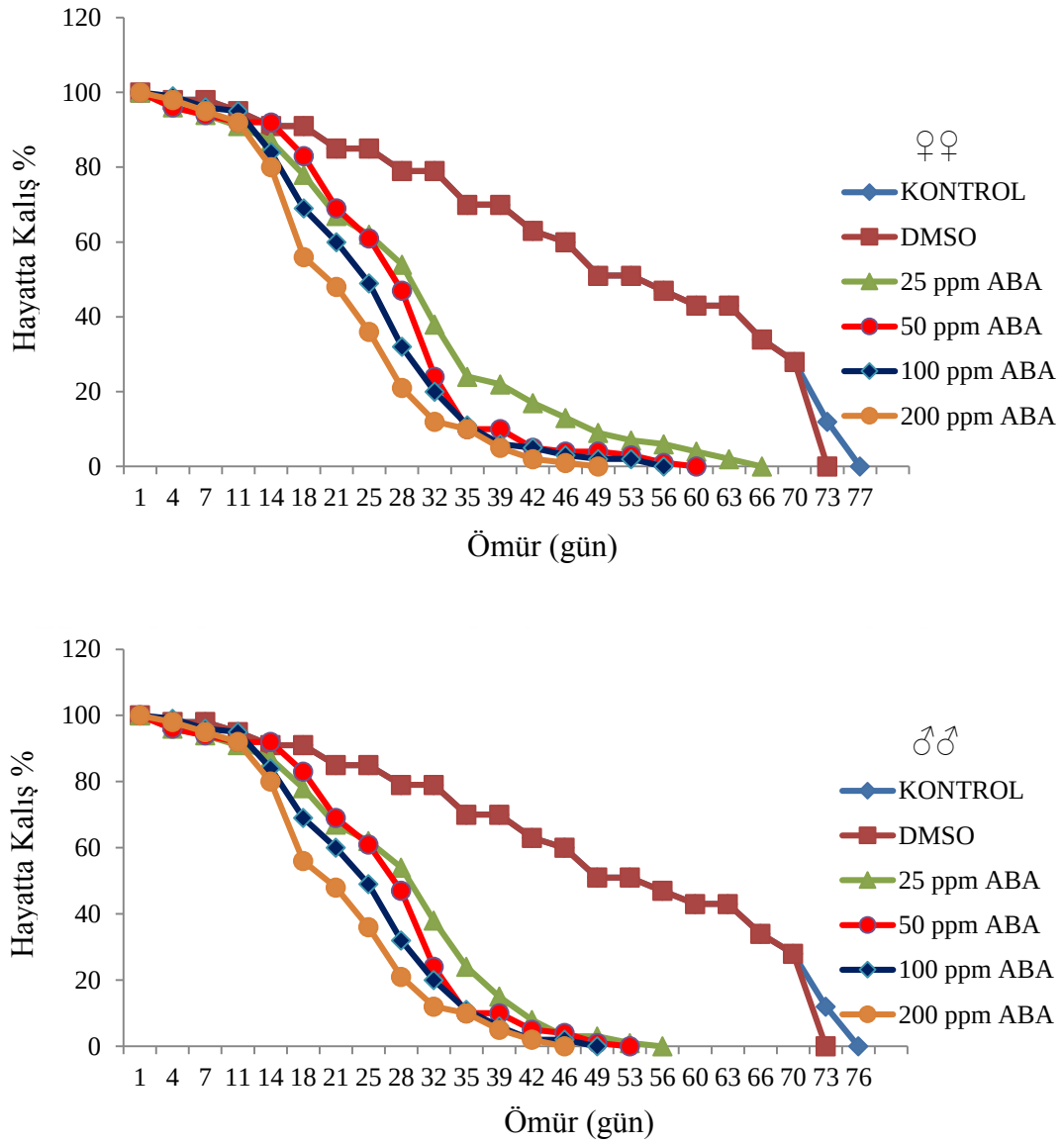
Diğer bir parametre olan ve distile su ile DMSO kontrol gruplarında ♀♀’de sırasıyla 49,39±1,96 ve 49,07±1,92 gün; ♂♂’de 51,37±2,16 ve 51,01±2,12 gün olarak belirlenen ortalama ömür uzunlukları, uygulama gruplarının dişi popülasyonunda sırasıyla 33,45±1,34; 29,24±0,97; 24,63±1,34 ve 26,96±0,94 güne, erkek popülasyonunda ise sırasıyla 29,00±1,76; 27,82±0,99; 25,60±0,94 ve 23,21±0,92 güne kadar gerilemiştir.

Kontrol ve uygulama grupları arasında hem ♀ hem ♂ popülasyonlarında ortalama ömür uzunlukları bakımından gözlenen bu gerileme, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). Aynı zamanda artan ABA konsantrasyonuna bağlı olarak negatif korelasyon değeri de hesaplanmış ve bu değer ♀ popülasyonunda R= -0,521, ♂ popülasyonunda ise R= -0,563 olarak bulunmuştur (Tablo 14). ABA uygulanmış *D.melanogaster*’in ♀ ve ♂ popülasyonları için çizilen hayatta kalış eğrileri Şekil 27’de verilmiştir.

Tablo 14. Kronik Olarak ABA Uygulanmış *D. melanogaster*’in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması

ABİETİK ASİT								
♀♀					♂♂			
Deney grupları	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*
Kontrol (1)	100	77	49,39±1,96		100	76	51,37±2,16	
DMSO (2)	100	73	49,07±1,92		100	73	51,01±2,12	
25 ppm (3)	100	66	33,45±1,34	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6*	100	56	29,00±1,76	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6*
50 ppm (4)	100	60	29,24±0,97	3-5,6*	100	53	27,82±0,99	
100 ppm (5)	100	56	24,63±1,34		100	49	25,60±0,94	
200 ppm (6)	100	49	26,96±0,94		100	46	23,21±0,92	
Regresyon düzeyi			R=-0,521			R=-0,563		

Maks.: Maksimum, SH: Standart Hata, *: 0,05 düzeyinde fark önemlidir.



Şekil 27. ABA uygulanmış *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.

Skualen triterpeninin ömür uzunluğu toksisitesi.

Bir triterpen olan SKU'nun ömür uzunluğu üzerine olan toksisitesinin belirlenmesi amacıyla *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonları kullanılmıştır. SKU'nun ön denemeler ile belirlenmiş dört farklı konsantrasyonunu (SDB+25, 50, 100 ve 200 ppm SKU) içeren uygulama grupları her iki popülasyona da kronik olarak ayrı ayrı uygulanmıştır. Yapılan uygulamalardan elde edilen veriler, DMSO kontrol grubu verileri ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Şöyle ki; ♀ popülasyonuna uygulanmış SKU'nun en düşük uygulama grubu olan 25 ppm'de 42 gün olarak belirlenen maksimum ömür uzunluğu en yüksek uygulama grubu olan 200 ppm'de ise 21 gün olarak bulunmuştur (Tablo 15). 77 ve 73 gün olan kontrol gruplarına ait

değerler SKU'nun artan konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum ömür uzunluğu değerlerinde önemli düzeyde gerilemeye neden olmuştur ($P<0,05$). ♂ popülasyonuna uygulanan SKU'nun en düşük uygulama grubu olan 25 ppm'de 28 güne gerileyen maksimum ömür uzunluğu en yüksek uygulama grubu olan 200 ppm'de ise 18 güne gerilemiştir. ♂ popülasyonuna ait kontrol gruplarında 76 ve 73 gün olan maksimum ömür uzunluğu artan SKU konsantrasyonuna bağlı olarak önemli düzeyde gerilemiştir. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve tıpkı dişi popülasyonunda olduğu gibi maksimum ömür uzunluğunda gözlenen gerilemeler $P<0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Tablo 15).

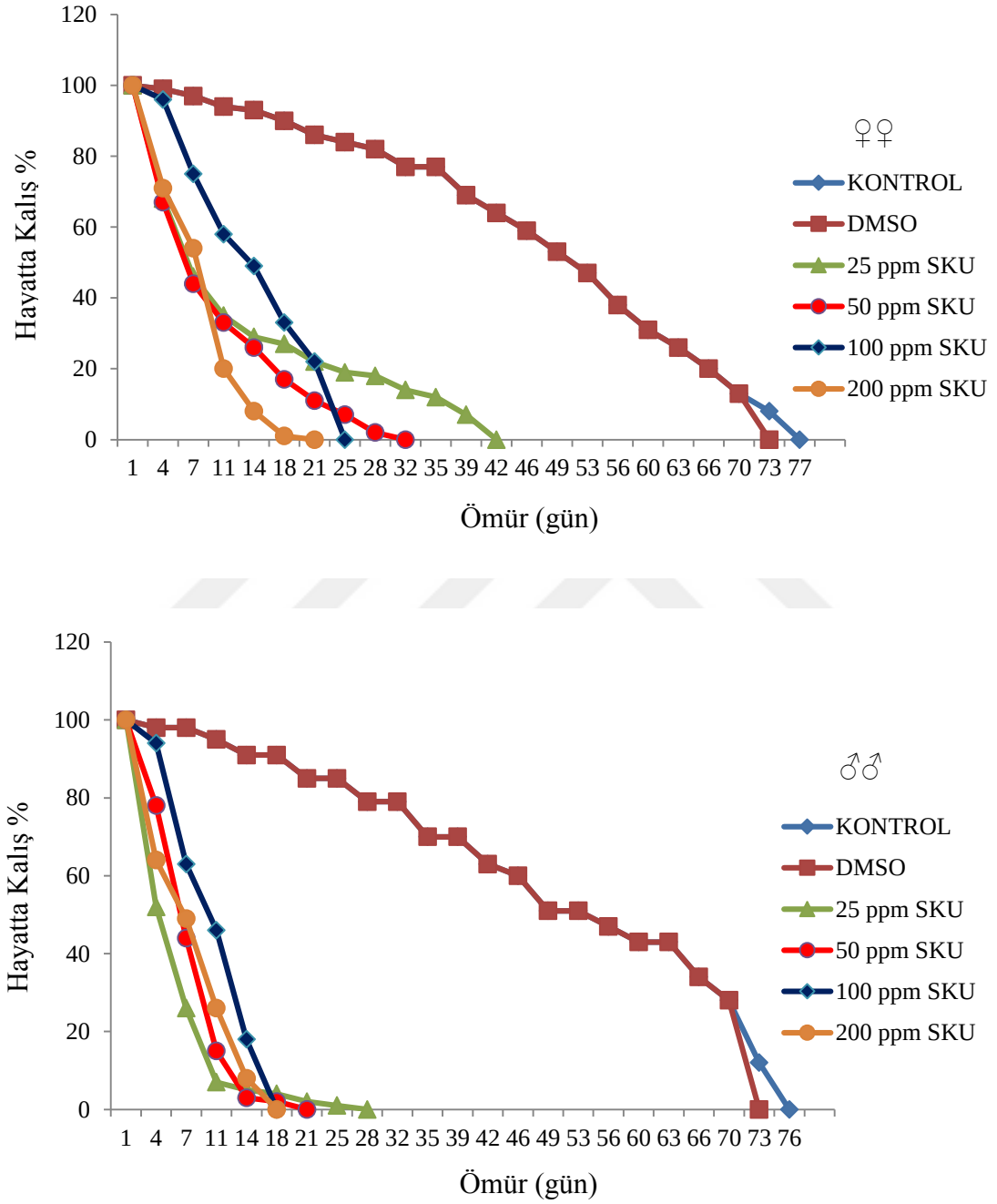
Tablo 15. Kronik Olarak SKU Uygulanmış *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması

SKUALEN								
♀♀					♂♂			
Deney grupları	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*
Kontrol (1)	100	77	49,39±1,96		100	76	51,37±2,16	
DMSO (2)	100	73	49,07±1,92		100	73	51,01±2,12	
25 ppm (3)	100	42	14,18±1,27	1-3,4,5,6*	100	28	12,41±0,67	1-3,4,5,6*
50 ppm (4)	100	32	12,26±0,89	2-3,4,5,6* 5-6*	100	21	11,81±0,60	2-3,4,5,6*
100 ppm (5)	100	25	11,26±0,67		100	18	10,20±0,53	
200 ppm (6)	100	21	9,24±0,44		100	18	8,59±0,47	
Regresyon düzeyi			R=-0,681				R=-0,679	

Maks.: Maksimum, SH: Standart Hata, *: 0,05 düzeyinde fark önemlidir.

Elde edilen veriler ile hesaplanan ortalama ömür uzunluğu değerleri de hesaplanmış ve SKU uygulamalarının en düşük konsantrasyonu olan 25 ppm uygulama grubunda ♀♀'de 14,18±1,27 gün, ♂♂'de ise 12,41±0,67 gün olan bu değerler en yüksek uygulama grubu olan 200 ppm'in ♀ popülasyonunda 9,24±0,44 güne; ♂ popülasyonunda ise 8,59±0,47 güne gerilemiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak meydana gelen bu gerileme $P<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar anlamlı bulunmuştur (Tablo 15). Dişi ve erkek popülasyonlarına ait negatif korelasyon değerleri de hesaplanmış ve sırasıyla R= -0,681;

R= -0,679 olarak bulunmuştur. Aynı zamanda SKU uygulanmış *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri de Şekil 28'de gösterilmiştir.



Şekil 28. SKU uygulanmış *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.

Astaksantin tetraterpenin ömür uzunluğu toksisitesi.

Ömür uzunluğu toksisitesinin belirlendiği son terpen olan ASTA tetraterpenine ait maksimum ve ortalama ömür uzunluğu verileri Tablo 16’da sunulmuştur. Maksimum ömür uzunlukları ♀ popülasyonuna ait en düşük (25 ppm) ve en yüksek (200 ppm) uygulama gruplarında sırasıyla 57 günden ve 45 güne, ♂ popülasyonun da ise yine 57 günden ve 39 güne gerilemiştir (Tablo 16). Artan konsantrasyona bağlı olarak meydana gelen bu gerilemeler ♀♀’de 77; 73, ♂♂’de 76; 73 gün olan kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldığında her iki popülasyonda da ASTA’nın artan konsantrasyona bağlı olarak maksimum ömür uzunlukları üzerinde gerilemelere neden olduğu ve yapılan istatistiksel analizler ile de bu gerilemelerin önemli düzeyde olduğu görülmüştür ($P<0,05$).

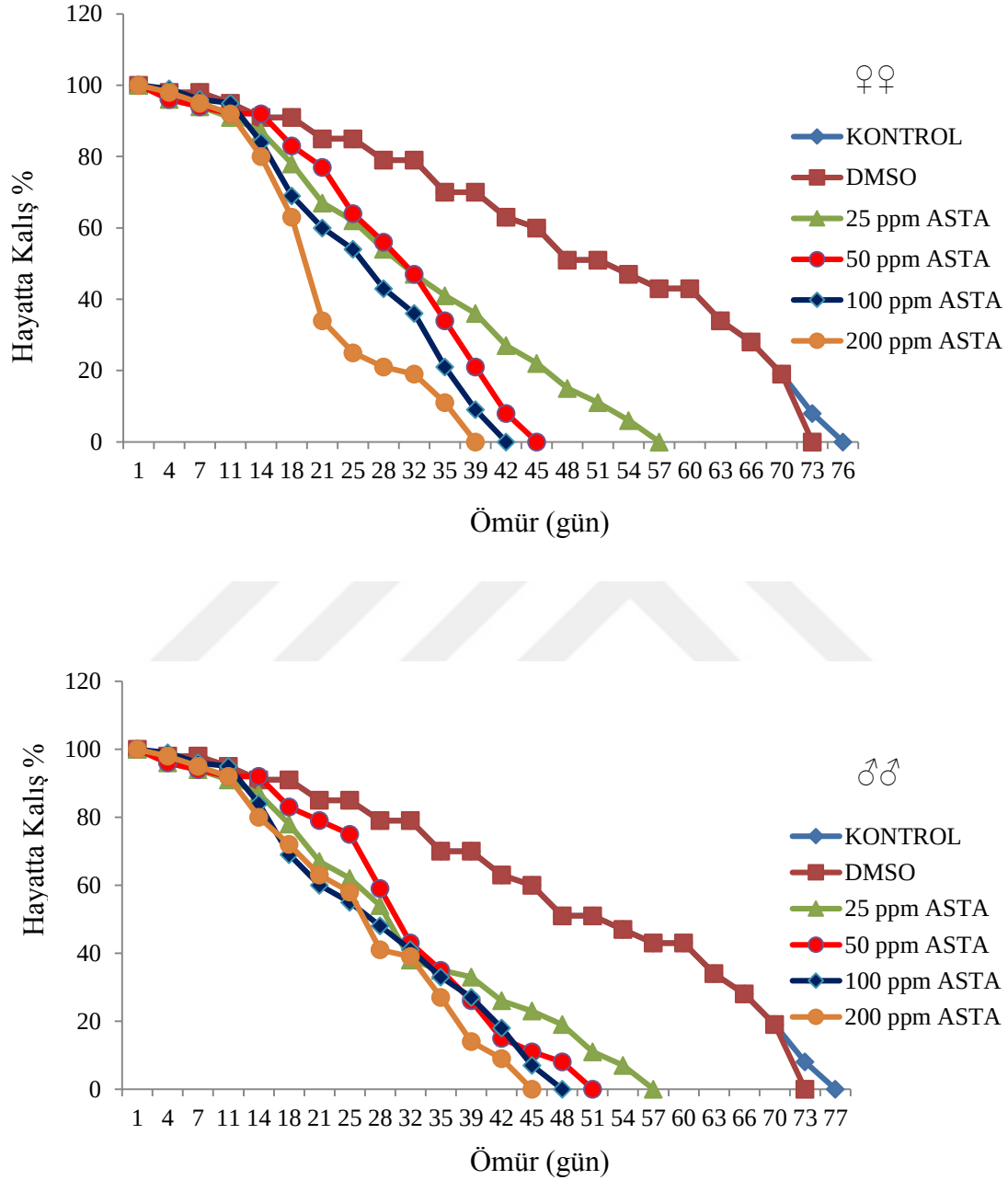
Tablo 16. Kronik Olarak ASTA Uygulanmış *D. melanogaster*’in ♀ ve ♂ Popülasyonlarında Maksimum ve Ortalama Ömür Uzunluğunun Karşılaştırılması

ASTAKSANTİN								
♀♀					♂♂			
Deney grupları	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*	Birey sayısı	Maks. ömür	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü*
Kontrol (1)	100	77	49,39±1,96		100	76	51,37±2,16	
DMSO (2)	100	73	49,07±1,92		100	73	51,01±2,12	
25 ppm (3)	100	57	32,06±1,50	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6*	100	57	32,45±1,48	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6*
50 ppm (4)	100	51	31,93±1,16		100	45	30,58±1,04	3-6* 4-6*
100 ppm (5)	100	48	28,67±1,27		100	42	28,95±0,98	
200 ppm (6)	100	45	27,06±1,18		100	39	23,52±0,92	
Regresyon düzeyi			R=-0,472		R=-0,538			

Maks.: Maksimum, SH: Standart Hata, *: 0,05 düzeyinde fark önemlidir.

ASTA uygulama gruplarına ait ortalama ömür uzunluğu değerleri de hesaplanmış ve 25, 50, 100 ve 200 ppm için bu değerler ♀♀’de sırasıyla 32,06±1,50; 31,93±1,16; 28,67±1,27 ve 27,06±1,18 gün; ♂♂’de ise yine sırasıyla 32,45±1,48; 30,58±1,04; 28,95±0,98 ve 23,52±0,92 gün olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, ASTA’da tıpkı diğer dört terpen gibi *D.melanogaster*’in ♀ ve ♂ popülasyonlarında ortalama ömür uzunluğunda gerilemeye neden

olmuştur. Ortalama ömür uzunluğunda gözlenen gerilemeye ait negatif korelasyon değerleri de ♀♀’de $R = -0,472$, ♂♂’de $R = -0,538$ olarak bulunmuştur (Tablo 16) ve bu gerilemeler $P < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır. ASTA uygulanmış ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri de Şekil 29’da verilmiştir.

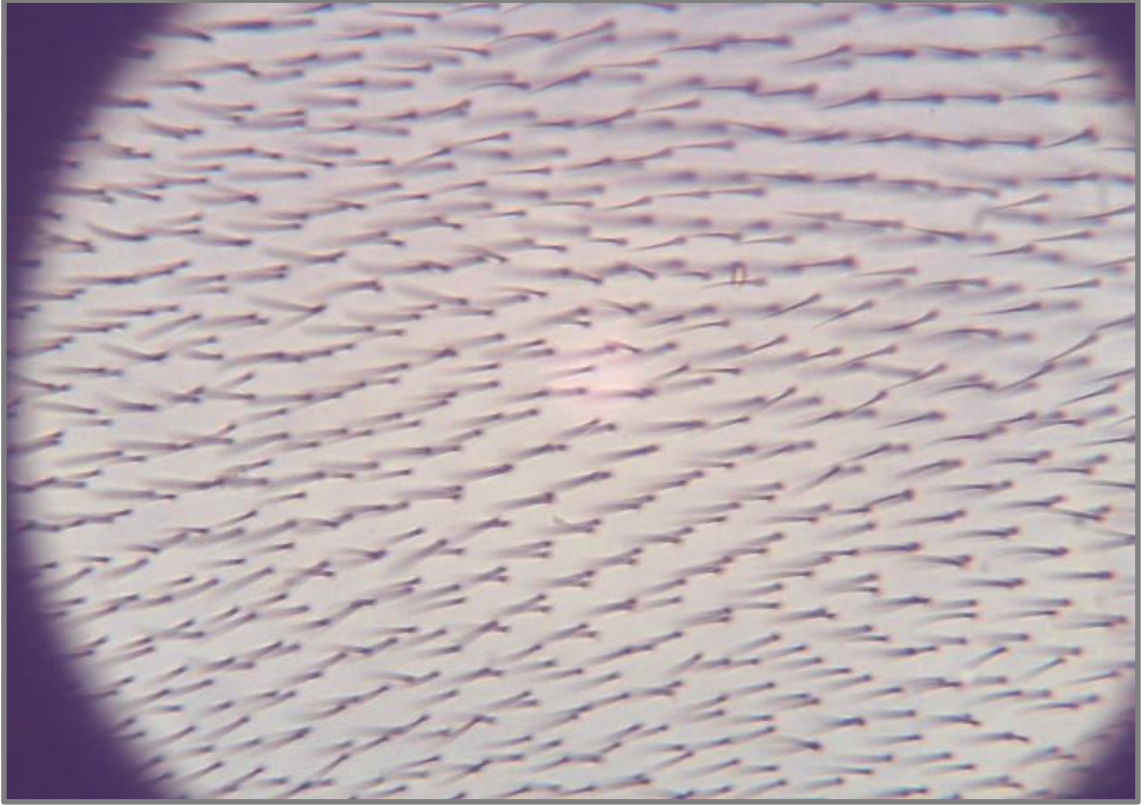


Şekil 29. ASTA uygulanmış *D.melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarına ait hayatta kalış eğrileri.

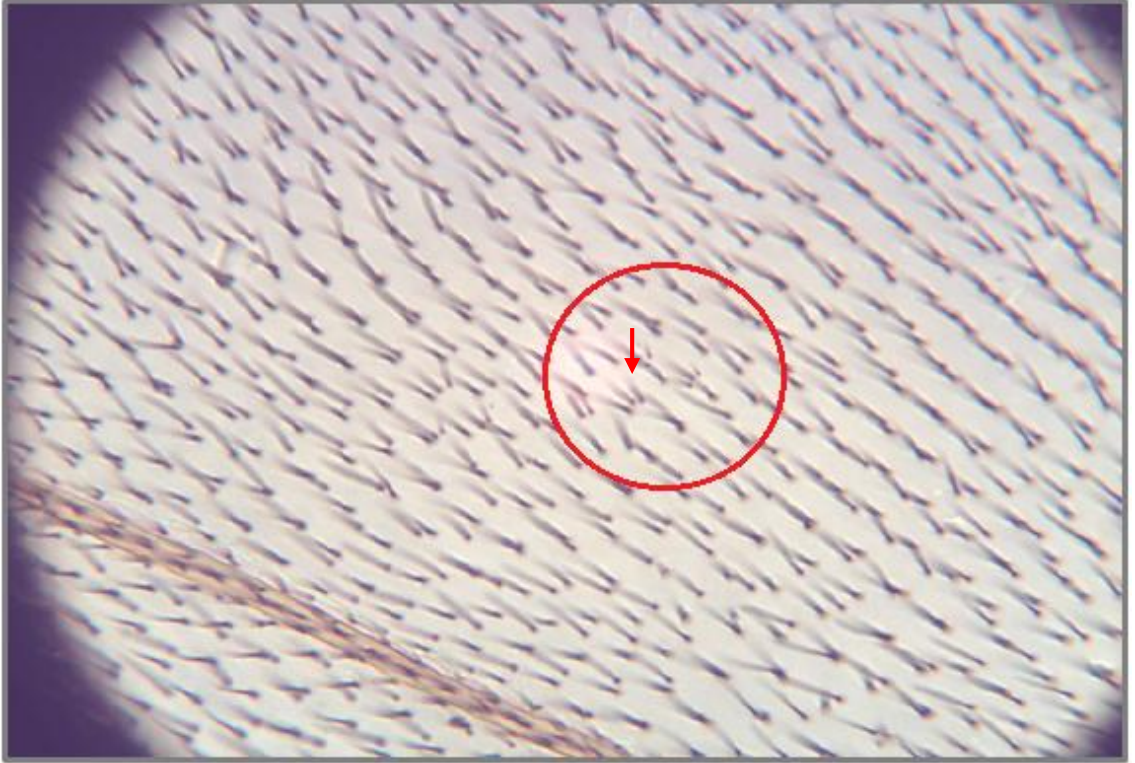
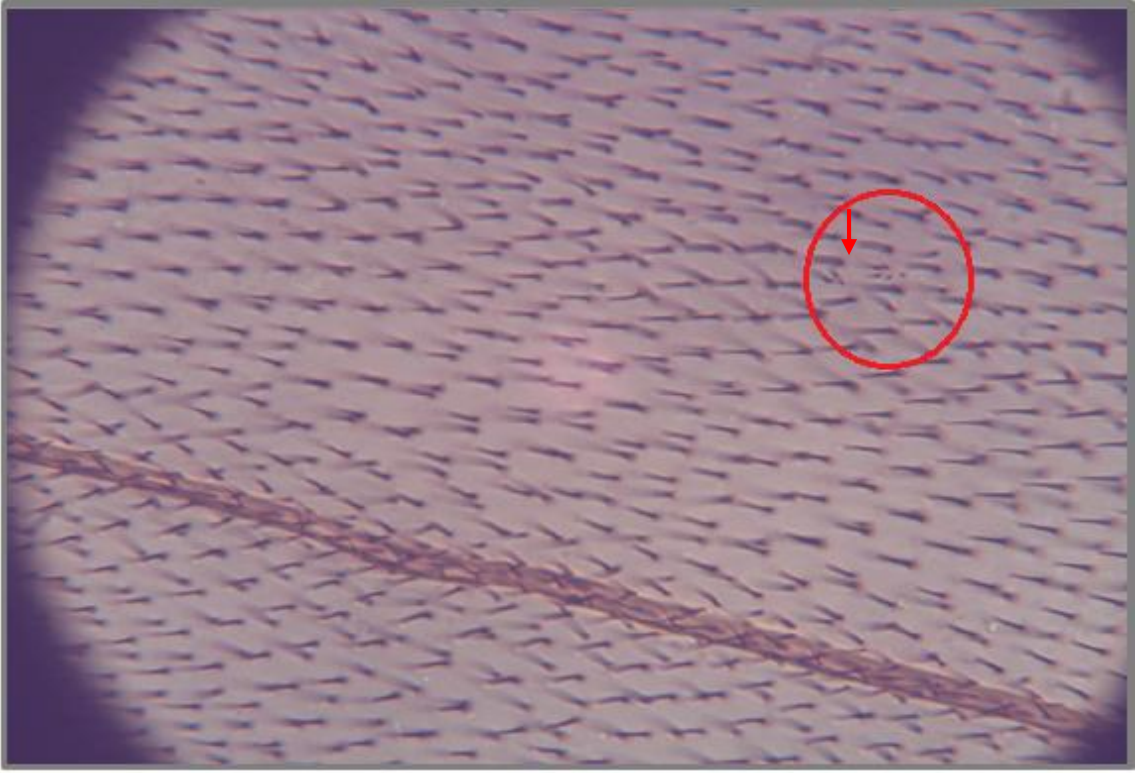
***İn vivo* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular**

Negatif ve pozitif kontrol gruplarından elde edilen SMART bulguları.

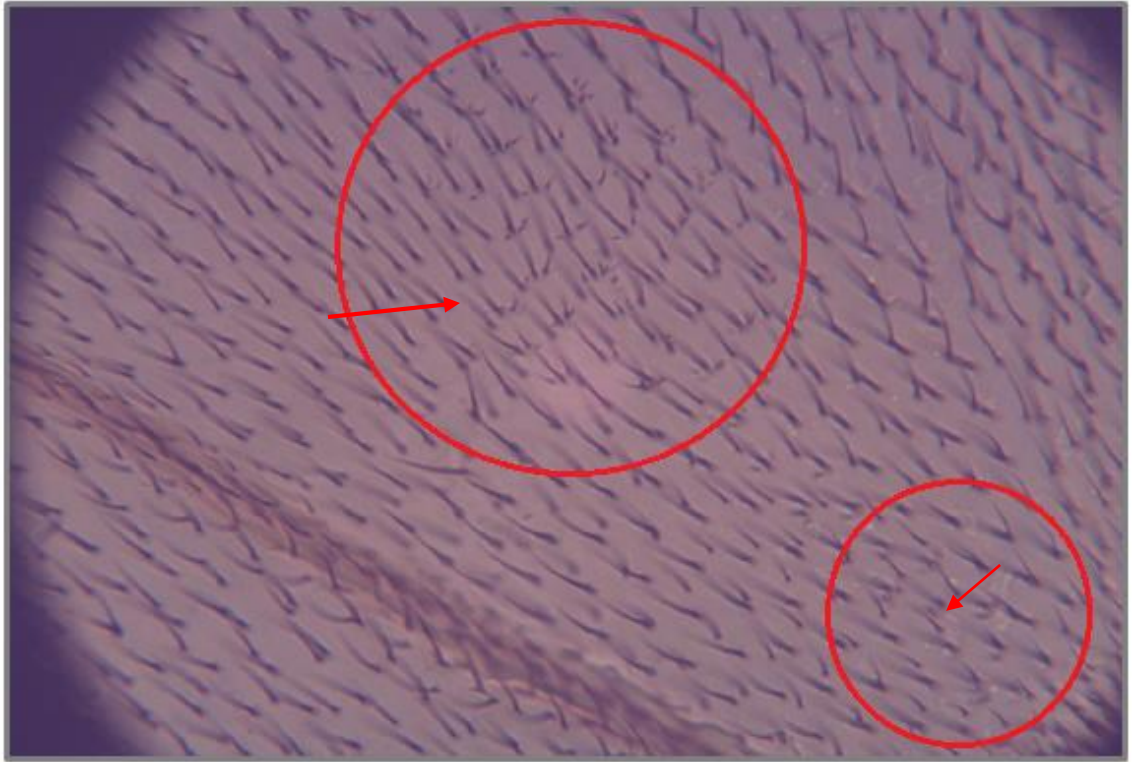
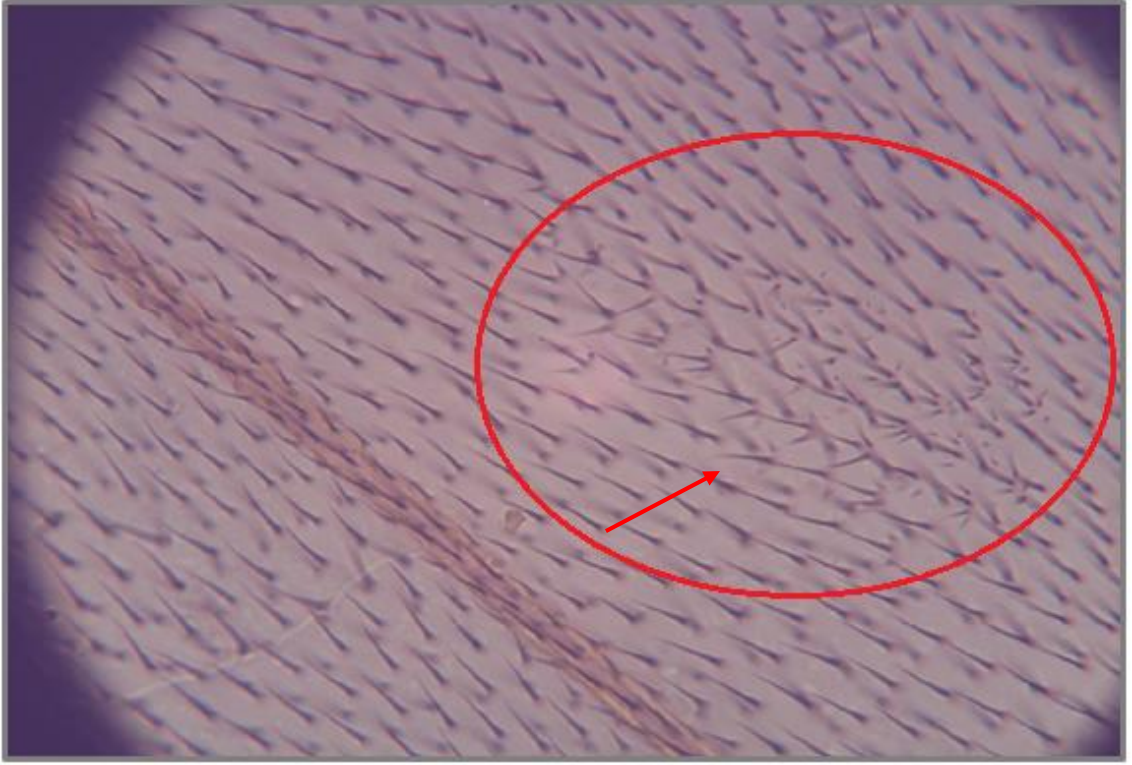
Çalışma kapsamında distile su ve DMSO negatif kontrol grupları ile mutajenik ve rekombinojenik etkisi bilinen EMS pozitif kontrol grubuna ait preparatlar 80 adet kanat içerecek şekilde hazırlanmış ve elde edilen mutant klon sayısına göre istatistik analizler yapılmıştır. Şekil 30'da yabancı bireylere ait her kanat hücresinden bir kılın (trikom) çıktığı normal kanat kılları görülmektedir. Yapılan mikroskopik incelemelerde mutant klonlar küçük tek tip (KTT) (Şekil 31), büyük tek tip (BTT) (Şekil 32), ikiz (Şekil 33), toplam (Σ) *mwh* ve Σ klon olarak ayrılmıştır. İstatistiki değerlendirmeler için, distile su ve DMSO negatif kontrol grupları ile EMS pozitif kontrol grupları kendi aralarında ve DMSO kontrol grubu da tüm terpen uygulama grupları ile karşılaştırılmıştır.



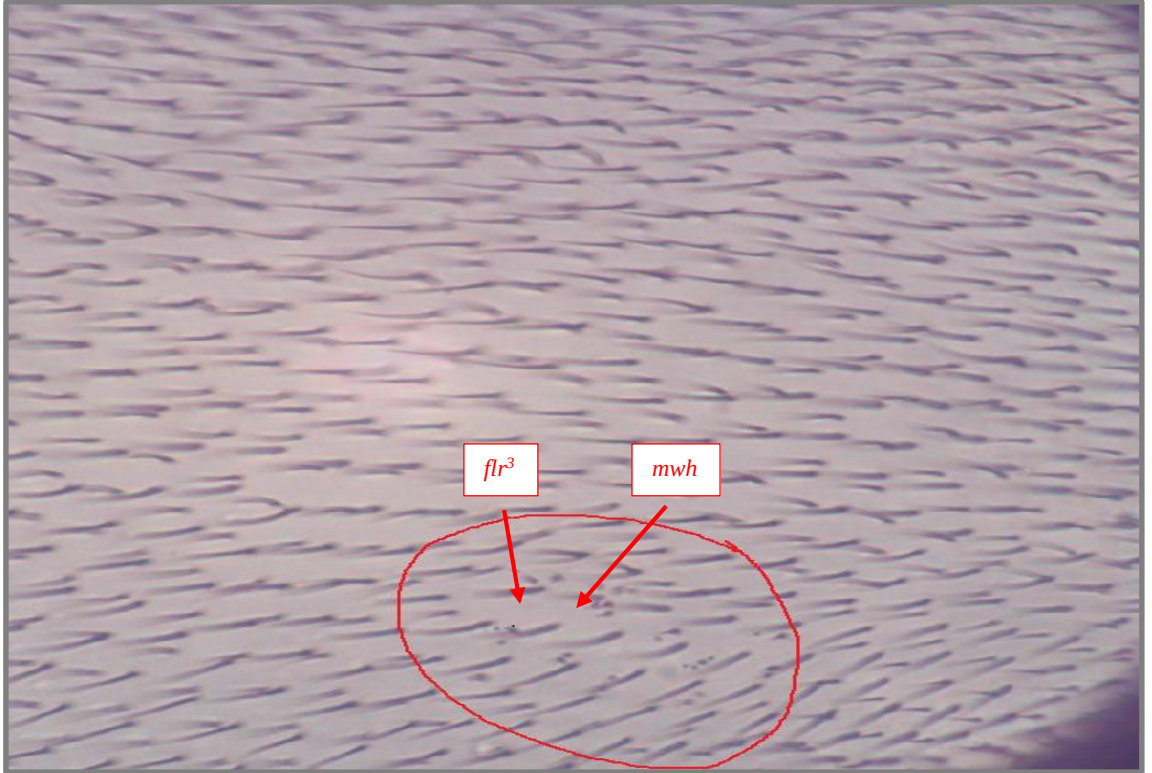
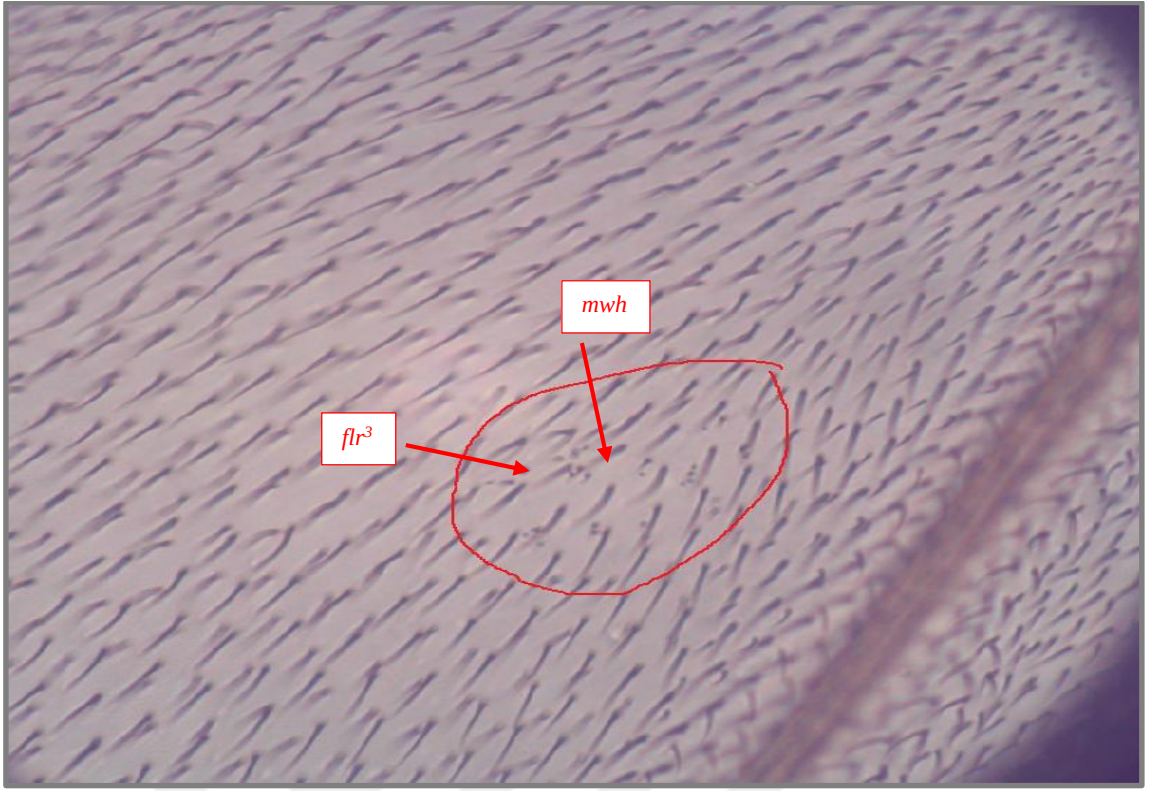
Şekil 30. Yabancı tip bireylere ait kanat kılı yapılarının mikroskopik görünüşü (10X40).



Şekil 31. Küçük tek tip *mwh* mutant klonlarının mikroskopik görünüşü (10X40).



Şekil 32. Büyük tek tip *mwh* mutant klonlarının mikroskopik görünüşü (10X40).



Şekil 33. İkiz mutant klonların mikroskopik görünüşü (10x40).

Normal kanat fenotipinin distile su kontrol grubu ile hazırlanan preparatlarda 8 KTT klon gözlenmiş ve Σ klon frekansı 0,10 olarak belirlenmiştir. Diğer negatif kontrol grubu olan DMSO kontrol grubunda 9 KTT ve 2 BTT mutant klon gözlenmiş, Σ klon frekansı ise 0,13 olarak hesaplanmıştır. Negatif kontrol grupları arasındaki mutant klon farkı istatistiki olarak değerlendirildiğinde $P>0,05$ düzeyinde önemsiz etkili (i) bulunmuştur. Ancak normal kanat fenotip göre hazırlanmış olan EMS pozitif kontrol grubunda ise 24 KTT, 8 BTT ve 6 ikiz mutant klon incelenmiş, Σ klon frekansı ise 0,47 olarak belirlenmiştir. Negatif ve pozitif kontrol grupları arasındaki fark da istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar $P<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Tüm kontrol gruplarının ayrıca klon indüksiyon frekansları (KİF) da hesaplanmış ve distile su için 0,41, DMSO kontrol grubu için 0,57 olan bu değerler EMS için 1,97 olarak belirlenmiştir.

Serrat kanat fenotipinin distile su kontrol grubunda 7 KTT, DMSO grubunda 8 KTT ve 1 BTT mutant klon gözlenmiştir. Bu değerlere göre Σ klon frekansları distile su için 0,08 ve DMSO için 0,11 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol grubu olan EMS'de ise 19 KTT ve 10 BTT klon gözlenmiş, Σ klon frekansı da 0,36 olarak hesaplanmıştır. Serrat kanat fenotipinin negatif ve pozitif kontrol grupları arasındaki fark istatistiki olarak pozitif (+) önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Serrat kanat fenotipi için de KİF değerleri hesaplanmış ve distile su, DMSO ve EMS kontrol grupları için bu değerler sırasıyla 0,36, 0,46 ve 1,51 olarak belirlenmiştir (Tablo 17).

Tablo 17. *Negatif ve Pozitif Kontrol Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistik Analiz Sonuçları*

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon			BTT klon			İkiz klon			Σ <i>mwh</i> klon			Σ klon			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		<i>(m = 2)</i>			<i>(m = 5)</i>			<i>(m = 5)</i>			<i>(m = 2)</i>			<i>(m = 2)</i>			
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
<i>(mwh/flr³)</i> Normal kanat																	
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
<i>(mwh/TM3)</i> Serrat kanat																	
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	Dengeleyici <i>TM3</i>			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
EMS (1 ppm)	80	19	(0,24)	+	10	(0,12)	+				29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,51

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

Timol monoterpenine ait SMART bulguları.

Genotoksitesi araştırılan TİM monoterpeni için ön denemeler sonucu belirlenmiş olan dört farklı uygulama grubu (DIM+50, 100, 200 ve 400 ppm TİM) oluşturulmuştur.

TİM'in tüm uygulama gruplarına ait veriler, DMSO negatif kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve sonuçlar negatif (-), önemsiz etkili (i), pozitif etkili (+) olarak değerlendirilmiştir (Tablo 18). Şöyle ki; normal kanat fenotipinde TİM'in en düşük uygulama grubu olan 50 ppm'de 9 KTT mutant klon gözlenirken 100 ppm'de 11 KTT mutant klon gözlenmiş ve Σ klon frekansları sırasıyla 0,11 ve 0,13 olarak belirlenmiştir. Diğer uygulama grubu olan 200 ppm'de 18 KTT ve 2 BTT klon gözlenmiş, Σ klon frekansı ise 0,25 olarak bulunmuştur. En yüksek uygulama grubu olan 400 ppm'de ise 21 KTT, 3 BTT ve 1 de ikiz klon gözlenmiş ve Σ klon frekansı da 0,31 olarak hesaplanmıştır.

50 ve 100 ppm uygulama gruplarından elde edilen veriler, DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman sonuçlar $P>0,05$ düzeyinde tüm klon tipleri için negatif (-) ya da önemsiz etkili (i) iken, 200 ppm uygulama grubunda KTT, BTT ve ikiz klon tipleri hariç Σmwh klon ve Σ klon tiplerinde sonuçlar $P<0,05$ düzeyinde pozitif (+) önemli bulunmuştur. En yüksek uygulama grubu olan 400 ppm'de ise BTT ve ikiz klon tipleri hariç KTT, Σmwh klon ve Σ klon tiplerinde sonuçlar pozitif (+) önemli olarak değerlendirilmiştir ($P<0,05$). Aynı zamanda kontrol grupları için hesaplanan KİF değerleri tüm uygulama grupları içinde hesaplanmış olup, bu değerler sırası ile 0,46; 0,57; 1,04 ve 1,28 olarak bulunmuştur (Tablo 18).

TİM'in tüm uygulama gruplarından elde edilen serrat kanat fenotipinde de konsantrasyon artışına paralel olarak mutant klonların sayısında artış gözlenmiştir. Şöyle ki; 50 ve 100 ppm'de sırasıyla 3 ve 8 olan KTT mutant klon sayısı 200 ve 400 ppm'de 9 ve 13 olarak gözlenirken 400 ppm'de 1 de BTT klon görülmüştür. Elde edilen bu verilere göre, uygulama gruplarına ait Σ klon frekansları da hesaplanmış ve bu değerler sırasıyla 0,03; 0,10; 0,11 ve 0,17 olarak bulunmuştur (Tablo 18).

Konsantrasyon artışına paralel olarak gözlenen klon sayısı ve Σ klon frekansına ait artışlar tüm uygulama gruplarında ve tüm klon tiplerinde negatif (-) ya da önemsiz etkili (i) olarak değerlendirilmiştir ($P>0,05$). Serrat kanat fenotipine ait KİF değerleri de tüm uygulama grupları için sırasıyla 0,15; 0,41; 0,46 ve 0,72 olarak belirlenmiştir (Tablo 18).

Tablo 18. *Timol Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistik Analiz Sonuçları*

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon (<i>m</i> = 2)			BTT klon (<i>m</i> = 5)			İkiz klon (<i>m</i> = 5)			Σ <i>mwh</i> klon (<i>m</i> = 2)			Σ klon (<i>m</i> = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
(<i>mwh/flr</i>³) Normal kanat																	
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	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
100 ppm	80	11	(0,13)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	11	(0,13)	i	11	(0,13)	i	0,57
200 ppm	80	18	(0,22)	i	2	(0,02)	i	0	(0,00)	-	20	(0,25)	+	20	(0,25)	+	1,04
400 ppm	80	21	(0,26)	+	3	(0,03)	i	1	(0,01)	i	24	(0,30)	+	25	(0,31)	+	1,28
(<i>mwh/TM3</i>) Serrat kanat																	
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	(0,24)	+	10	(0,12)	+	Dengeleyici <i>TM3</i> kromozomu varlığında <i>flr</i> ³ mutasyonu gözlenmez.			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,51
50 ppm	80	3	(0,03)	-	0	(0,00)	-				3	(0,03)	-	3	(0,03)	-	0,15
100 ppm	80	8	(0,10)	i	0	(0,00)	-				8	(0,10)	i	8	(0,10)	i	0,41
200 ppm	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-				9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
400 ppm	80	13	(0,16)	i	1	(0,01)	i				14	(0,17)	i	14	(0,17)	i	0,72

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

Guazilen seskiterpenine ait SMART bulguları.

Çalışma kapsamında seskiterpenlere dahil olan ve üç izopren biriminden oluşan GUA'nın dört farklı konsantrasyonu (DIM+50, 100, 20 ve 400 ppm GUA) ile uygulama grupları oluşturulmuştur. Daha sonra uygulama gruplarına ait ergin bireylerin kanat preparatları hazırlanmış ve incelenmiştir. İncelemeler sonucunda elde edilen veriler ve istatistiki analiz sonuçları da Tablo 19'da gösterilmiştir. Uygulama gruplarına ait tüm veriler, DMSO kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve analiz sonuçları negatif (-), önemsiz etkili (i), pozitif etkili (+) olarak değerlendirilmiştir. Şöyle ki; normal kanat fenotipinde en düşük uygulama grubu olan 50 ppm'de 16 KTT mutant klon ile 1 BTT klon gözlenmiş ve toplamda 17 olan Σ klon frekansı 0,21 olarak hesaplanmıştır. Diğer uygulama grubu olan 100 ppm'de 19 KTT, 4 BTT ve 3 ikiz olmak üzere toplamda 26 mutant klon gözlenmiştir. Σ klon frekansı da 0,32 olarak belirlenmiştir. GUA'nın 200 ppm'lik uygulama grubunda 23 KTT, 6 BTT ve 2 ikiz klon olmak üzere toplamda 31 mutant klon gözlenirken, 400 ppm uygulama grubunda ise 27 KTT, 8 BTT ve 1 de ikiz klon olarak toplamda 36 mutant klon incelenmiştir (Tablo 19). Mutant klonların en yoğun olduğu bu son iki uygulama grubunun Σ klon frekansları da sırasıyla 0,38 ve 0,45 olarak hesaplanmıştır. DMSO kontrol grubu ile karşılaştırılarak yapılan analizler neticesinde 50 ppm uygulama grubuna ait sonuçlar tüm klon tiplerinde negatif (-) ya da önemsiz etkili (i) olarak belirlenmiştir. 100 ppm GUA uygulama grubunda Σ klon frekansı pozitif etkili (+) iken diğer klon tiplerinde sonuçlar önemsiz etkili (i) bulunmuştur (Tablo 19). 200 ve 400 ppm uygulama gruplarına ait sonuçlar, BTT ve ikiz klon tiplerinde önemsiz etkili (i) iken KTT, Σ *mwh* klon ve Σ klon tiplerinde ise pozitif etkili (+) bulunmuştur ($P<0,05$). GUA uygulamalarına ait hesaplanan KİF değerleri de sırasıyla 0,88; 1,36; 1,61 ve 1,87 olup artan konsantrasyona bağlı olarak artış gözlenmiştir (Tablo 19).

GUA uygulamalarından elde edilen serrat kanat verilerinin analizleri de normal kanatta olduğu gibi DMSO kontrol grubuna göre yapılmış olup değerlendirmeleri şöyledir; en düşük uygulama grupları olan 50 ve 100 ppm uygulama gruplarında sırasıyla 4 ve 8 KTT; 200 ppm uygulama grubunda 11 KTT, 2 BTT; 400 ppm'de ise 14 KTT ve 1 BTT mutant klon görülmüştür. Uygulama gruplarına ait (50, 100, 200, 400 ppm) Σ klon frekansları ise sırasıyla 0,05; 0,1; 0,16 ve 0,18'dir. Bu değerlerde her ne kadar artan konsantrasyona bağlı olarak artış gözlenmiş olsa da DMSO kontrol grubuna göre sonuçlar negatif (-) ya da önemsiz etkili (i) bulunmuştur (Tablo 19). Serrat kanat fenotipine ait KİF değerleri de hesaplanmış ve en düşük uygulama grubunda (50 ppm) 0,20, en yüksek uygulama grubunda ise bu değer (400 ppm) 0,76 olarak belirlenmiştir (Tablo 19).

Tablo 19. *Guazilen Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistiki Analiz Sonuçları*

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon (<i>m</i> = 2)			BTT klon (<i>m</i> = 5)			İkiz klon (<i>m</i> = 5)			Σ <i>mwh</i> klon (<i>m</i> = 2)			Σ klon (<i>m</i> = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
(<i>mwh/flr</i>³) Normal kanat																	
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	16	(0,20)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	17	(0,21)	i	17	(0,21)	i	0,88
100 ppm	80	19	(0,23)	i	4	(0,05)	i	3	(0,03)	i	23	(0,28)	i	26	(0,32)	+	1,36
200 ppm	80	23	(0,28)	+	6	(0,07)	i	2	(0,02)	i	29	(0,36)	+	31	(0,38)	+	1,61
400 ppm	80	27	(0,33)	+	8	(0,1)	i	1	(0,01)	i	35	(0,43)	+	36	(0,45)	+	1,87
(<i>mwh/TM3</i>) Serrat kanat																	
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	(0,24)	+	10	(0,12)	+	Dengeleyici <i>TM3</i> kromozomu varlığında <i>flr</i> ³ mutasyonu gözlenmez.			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,51
50 ppm	80	4	(0,05)	-	0	(0,00)	-				4	(0,05)	-	4	(0,05)	-	0,20
100 ppm	80	8	(0,1)	i	0	(0,00)	-				8	(0,1)	i	8	(0,1)	i	0,40
200 ppm	80	11	(0,13)	i	2	(0,02)	i				13	(0,16)	i	13	(0,16)	i	0,66
400 ppm	80	14	(0,17)	i	1	(0,01)	i				15	(0,18)	i	15	(0,18)	i	0,76

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

Abietik asit diterpenine ait SMART bulguları.

Bir diterpen çeşidi olan ve genotoksitesitesi araştırılan ABA'nın en düşük uygulama grubu olan 50 ppm'de, normal kanat fenotipi için 13 KTT, 2 BTT, toplamda 15 mutant klon gözlenmiş ve Σ klon frekansı 0,18 olarak bulunmuştur. 100 ppm'de ise 17 KTT ve 5 BTT olmak üzere toplamda 22 mutant klon gözlenmiş ve Σ klon frekansı da 0,27 olarak belirlenmiştir (Tablo 20). 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 18 KTT, 4 BTT ve 3 ikiz klon olmak üzere 25 mutant klon görülmüştür. En yüksek uygulama grubu olan 400 ppm'de ise toplamda 27 mutant klon incelenmiş olup ve bu klonların 22'si KTT, 4'ü BTT ve 1 tanesi ikiz klondur. 200 ve 400 ppm uygulama gruplarının Σ klon frekansları ise sırasıyla 0,31 ve 0,33 olarak belirlenmiştir. 200 ppm uygulama gruplarına ait verilerin DMSO kontrol grubuna göre yapılan analizleri KTT, BTT, ikiz ve Σ *mwh* klon tiplerinde önemsiz (i) etkili bulunmuş iken, Σ klon tipine ait veriler pozitif (+) anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($P<0,05$). 400 ppm'lik uygulama grubunda ise BTT ve ikiz klon tipleri hariç diğer klon tiplerinde sonuçlar pozitif etkilidir (+). En düşük uygulama grubu olan 50 ppm'de KİF değeri 0,78 olup artan konsantrasyona bağlı olarak bu değer 400 ppm'de 1,40'a kadar yükselmiştir (Tablo 20).

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 5 KTT klon, en yüksek uygulama grubu olan 400 ppm'de ise 12 KTT ve 3 BTT klon görülmüştür. Konsantrasyon artışına bağlı olarak her ne kadar mutant klon sayısında bir artış olsa da tüm uygulama gruplarına ait tüm klon tiplerinde sonuçlar negatif (-) ya da önemsiz etkili (i) olarak bulunmuştur (Tablo 20). Serrat kanat fenotipine ait KİF değerleri ise sırasıyla 0,26; 0,57; 0,67 ve 0,78'dir.

Tablo 20. Abietik Asit Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistik Analiz Sonuçları

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon (<i>m</i> = 2)			BTT klon (<i>m</i> = 5)			İkiz klon (<i>m</i> = 5)			Σ <i>mwh</i> klon (<i>m</i> = 2)			Σ klon (<i>m</i> = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
(<i>mwh/flr</i>³) Normal kanat																	
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	13	(0,16)	i	2	(0,02)	i	0	(0,00)	-	15	(0,18)	i	15	(0,18)	i	0,78
100 ppm	80	17	(0,21)	i	5	(0,06)	i	0	(0,00)	-	22	(0,27)	i	22	(0,27)	i	1,14
200 ppm	80	18	(0,22)	i	4	(0,05)	i	3	(0,03)	i	22	(0,27)	i	25	(0,31)	+	1,30
400 ppm	80	22	(0,27)	+	4	(0,05)	i	1	(0,01)	i	26	(0,32)	+	27	(0,33)	+	1,40
(<i>mwh/TM3</i>) Serrat kanat																	
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	(0,24)	+	10	(0,12)	+	Dengeleyici <i>TM3</i> kromozomu varlığında <i>flr</i> ³ mutasyonu gözlenmez.			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,49
50 ppm	80	5	(0,06)	-	0	(0,00)	-				5	(0,06)	-	5	(0,06)	-	0,26
100 ppm	80	9	(0,11)	i	2	(0,02)	i				11	(0,13)	i	11	(0,13)	i	0,57
200 ppm	80	10	(0,12)	i	3	(0,03)	i				13	(0,16)	i	13	(0,16)	i	0,67
400 ppm	80	12	(0,15)	i	3	(0,03)	i				15	(0,18)	i	15	(0,18)	i	0,78

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

Skualen triterpenine ait SMART bulguları.

Triterpenlere ait olan ve altı izopren biriminden oluşan SKU'nun 50, 100, 200 ve 400 ppm'lik konsantrasyonları ile hazırlanan uygulama gruplarına ait gözlenen mutant klon verileri ve yapılan analiz sonuçları Tablo 21'de gösterilmiştir. 50 ppm SKU uygulama grubunda 8 KTT, 100 ppm'de 10 KTT ve 200 ppm'de 17 KTT ile 1 BTT mutant klon gözlenmiştir. Bu uygulama grupları için sırasıyla 0,10; 0,12 ve 0,22 olarak hesaplanan Σ klon frekansları, DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde negatif (-) ya da önemsiz etkili (i) bulunmuştur ($P>0,05$). En yüksek uygulama grubu olan 400 ppm'de ise 21 KTT, 3 BTT ve 1 de ikiz klon olmak üzere toplamda 25 mutant klon gözlenmiş ve Σ klon frekansı da 0,31 olarak hesaplanmıştır. 400 ppm uygulama grubunda BTT ve ikiz klon tipleri hariç diğer klon tiplerinde $P<0,05$ düzeyinde pozitif etkili (+) sonuçlar bulunmuştur (Tablo 21). Ayrıca KİF değerleri de 50, 100, 200 ve 400 ppm için sırasıyla 0,41; 0,52; 0,93 ve 1,30 olarak hesaplanmıştır.

SKU uygulama gruplarına ait serrat kanat fenotipinde ise mutant klon sayısında önemli bir artış gözlenmemiştir. Şöyle ki; en düşük uygulama grubu olan 50 ppm'de 4 KTT, en yüksek uygulama grubu 400 ppm'de ise 11 KTT mutant klon gözlenmiştir. Tüm uygulama gruplarına ait Σ klon frekansı hesaplanmış ve en düşük uygulama grubunda 0,05 olan bu değer (-) en yüksek uygulama grubunda 0,13 (i) olarak bulunmuştur. Serrat kanat fenotipine ait KİF değerleri de sırasıyla 0,20; 0,36; 0,41 ve 0,57 olarak hesaplanmıştır (Tablo 21).

Tablo 21. *Skualen Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve İstatistik Analiz Sonuçları*

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon (<i>m</i> = 2)			BTT klon (<i>m</i> = 5)			İkiz klon (<i>m</i> = 5)			Σ <i>mwh</i> klon (<i>m</i> = 2)			Σ klon (<i>m</i> = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
(<i>mwh/flr</i>³) Normal kanat																	
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
(<i>mwh/TM3</i>) Serrat kanat																	
Distile su	80	7	(0,08)		0	(0,00)		Dengeleyici <i>TM3</i> kromozomu varlığında <i>flr</i> ³ mutasyonu gözlenmez.			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	(0,24)	+	10	(0,12)	+				29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,51
50 ppm	80	4	(0,05)	-	0	(0,00)	-				4	(0,05)	-	4	(0,05)	-	0,20
100 ppm	80	7	(0,08)	i	0	(0,00)	-				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.

Astaksantin tetraterpenine ait SMART bulguları.

Son olarak olası genotoksik etkisi araştırılan ASTA tetraterpenine ait SMART sonuçları ve istatistiki analiz değerlendirmeleri Tablo 22’de sunulmuştur. Normal kanat fenotipinde ASTA’nın 50, 100 ve 200 ppm uygulamalarında sırasıyla 6, 7, 13 KTT klon; 100 ve 200 ppm’de 1’er tane de BTT klon gözlenmiştir (Tablo 22). Σ klon frekansları 0,07; 0,10; 0,17 olan bu üç uygulama grubunun kontrol grubu ile karşılaştırması yapıldığında elde edilen analiz sonuçları tüm klon tiplerinde negatif (-) ya da önemsiz etkili (i) bulunmuştur ($P>0,05$). ASTA’nın en yüksek uygulama grubu olan 400 ppm’de ise durum diğer üç uygulama grubuna göre biraz daha farklı olup bu uygulamada 19 KTT, 4 BTT olmak üzere toplamda 23 mutant klon gözlenmiş ve Σ klon frekans 0,28 olarak belirlenmiştir. Bu uygulama grubu için elde edilen veriler DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman istatistiki değerler BTT ve ikiz klon tiplerinde negatif (-) ve önemsiz etkili (i) bulunurken diğer klon tipleri pozitif etkili (+) bulunmuştur ($P<0,05$). DMSO kontrol grubunda 0,57 olan KİF değeri ASTA uygulama gruplarında artan konsantrasyona bağlı olarak 1,19’a kadar yükselmiştir (Tablo 22).

Serrat kanat fenotipinde yapılan incelemeler neticesinde en düşük konsantrasyon olan 50 ppm’de 3 KTT klon gözlenirken en yüksek konsantrasyon olan 400 ppm’de 10 KTT ve 2 BTT mutant klon gözlenmiştir. Uygulama gruplarına ait Σ klon frekans değerleri 0,03; 0,06; 0,10 ve 0,15 olup her ne kadarkonsantrasyon artışına bağlı olarak mutasyon frekansında bir artış gözlenmiş olsa da sonuçlar dört uygulama grubu için tüm klon tiplerinde negatif (-) ya da önemsiz etkili (i)’dir (Tablo 22). KİF değerlerinde de artan konsantrasyona bağlı olarak bir yükselme gözlenmiştir ve en yüksek uygulama grubu olan 400 ppm’de bu değer 0,62’ye kadar yükselmiştir (Tablo 22).

Tablo 22. *Astaksantin Uygulama Gruplarına ait SMART Bulguları ve Analiz Sonuçları*

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon			BTT klon			İkiz klon			Σ mwh klon			Σ klon			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		(m = 2)			(m = 5)			(m = 5)			(m = 2)			(m = 2)			
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
(mwh/flr ³) Normal kanat																	
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	6	(0,07)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	6	(0,07)	i	6	(0,07)	i	0,31
100 ppm	80	7	(0,08)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	8	(0,10)	i	8	(0,10)	i	0,41
200 ppm	80	13	(0,16)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	14	(0,17)	i	14	(0,17)	i	0,72
400 ppm	80	19	(0,24)	+	4	(0,05)	i	0	(0,00)	-	23	(0,28)	+	23	(0,28)	+	1,19
(mwh/TM3) Serrat kanat																	
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	(0,24)	+	10	(0,12)	+	Dengeleyici TM3 kromozomu varlığında flr ³ mutasyonu gözlenmez.			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,51
50 ppm	80	3	(0,03)	-	0	(0,00)	-				3	(0,03)	-	3	(0,03)	-	0,15
100 ppm	80	5	(0,06)	i	0	(0,00)	-				5	(0,06)	i	5	(0,06)	i	0,26
200 ppm	80	8	(0,10)	i	0	(0,00)	-				8	(0,10)	i	8	(0,10)	i	0,41
400 ppm	80	10	(0,12)	i	2	(0,02)	i				12	(0,15)	i	12	(0,15)	i	0,62

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

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sağlıklı ve doğal beslenmenin öneminin arttığı günümüzde besinlerin içeriği de insanların ilgisini çekmektedir. Besin içerikleri, modern yaşamın getirisi olan masabaşı işlerden dolayı hareketsizliğe karşı enerji verici, aşırı stres ve hızlı/ayaküstü yeme alışkanlıklarına karşı bu olumsuz etkileri nötralize edici olarak düşünülebilir. Yalnızca sağlıklı yaşam için değil aynı zamanda hastalıklara karşı da doğal ürünlerle tedavi olmak isteyenlerin bu yöndeki tercihleri giderek artmaktadır. Doğal ürünlerle yapılan tedavilerde kullanılan ve bitkilerden elde edilen yan ürünler (sekonder metabolitler) terpenler, alkaloidler, flavonoidlerdir. Bu yan ürünlerden birisi olan ve farklı bitkilerden doğal olarak elde edilip hem bilimsel hem de ekonomik yönden değerlendirilen 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 da kozmetik sektöründe kullanılmaktadır (Hammer *et al.* 1999; Mouhssen 2004). Ayrıca farmakolojik özellikleri incelenerek aromaterapi ve fitoterapi alanında da kullanılabilen terpenlerin diyabet, damar tıkanıklığı, alzheimer, kanser gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanımının yaygın olduğu ve antioksidan, antimutajen, antikanserojen ve antiaging gibi çeşitli bio-aktiviteleri nedeniyle bu hastalıkların tedavisinde tercih edildikleri çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Kırbağ ve Bağcı 2000; Arıca 2017).

Bu hastalıkların oluşumunda var olan asıl sebeplerden birisi hücresel strese dayalı yaşlanma olgusunun meydana gelmesi ve buna dayalı olarak vücut içerisindeki homeostazinin kontrol edilememesidir. Yaşlanma olgusu genel bir tabir ile canlının gelişimi esnasında metabolik reaksiyonlarının azalması ve bozulması ile meydana gelen fonksiyon kayıplarıyla ölüme gidiş süreci olarak tanımlanmaktadır. Her canlıda görülen ve organizmanın molekül, hücre, doku, organ ve sistemleri düzeyinde, zamanın ilerlemesi ile ortaya çıkan, geriye dönüşü olmayan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin tümüdür. Normal biyolojik yaşlanma süresi genetik yapı, yaşam tarzı, hastalıklar ve diğer çevresel şartlara göre değişkenlik göstermekte ve vücut yapısında meydana gelen metabolik dengesizliklerin kontrol edilememesi ile ortaya çıkmaktadır. Yaşlanma ve canlıların ömür uzunluğu farklı türlerde ve hatta aynı türün farklı eşeylerinde ve bireylerinde farklılık göstermektedir. Ömür uzunluğunda olan farklılıklar bu çalışmada model organizma olarak kullanılan *Drosophila*'da da söz konusu olup bu organizmanın dişi ve erkek popülasyonlarının hayatta kalabilme süreleri üzerinde genetik yapı kadar çevresel faktörlerin de önemli belirleyiciler olduğu bilinmektedir (Altun *et al.* 2011;

Uysal *et al.* 2015; Demir and Uysal 2017). Şöyle ki; *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarının yumurta ve pupadan çıkış süresinde (Qiu and Hardin 1996), metabolik hızında (Lanciani *et al.* 1991) ve ömür uzunluğunda (Sheeba *et al.* 2000) ışığın etkili olduğu belirlenmiştir. *Drosophila*'nın farklı soyları ile yapılan çalışmalarda, sürekli ışıklı ortamın ergin ömür uzunluğunu kısalttığı (Klarsfeld and Rouyer 1998), buna karşın sürekli karanlık ortamda yaşatılan *D. melanogaster* erkeklerinde %20, dişilerinde ise %43'e varan ömür uzunluğu artışının olduğu gözlenmiştir (Bağcı ve Bozcuk 1991). Tıpkı ışık gibi *D. melanogaster*'in diğer çevresel koşullarını oluşturan besin kısıtlanması (Tatar and Promislow 1997), nem (Clark and Rockstein 1964; Ünlü and Bozcuk 1979), sıcaklık (Uysal *et al.* 2006; Ayar *et al.* 2009), çiftleşme (Lansing 1952), besin ortamında metabolik atıkların birikmesi (Fred and Timothy 1997) gibi faktörler de ömür uzunluğunu belirleyen diğer faktörlerdendir.

Farklı bio-aktivitelere sahip olmaları nedeniyle metabolik dengenin korunmasında ve hücrelerde yaşlanma karşıtı olabilecekleri düşünülen terpenlerin aynı zamanda toksik, genotoksik ve mutajenik etkili olabileceği de birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Whysner and Williams 1996; Franzios *et al.* 1997; Gomes-Carneiro *et al.* 1998; Stammati *et al.* 1999; İpek *et al.* 2005).

Bu çalışmada çeşitli bio-aktiviteler sergileyen ve farklı gruplara ait olan TİM, GUA, ABA, SKU ve ASTA terpenlerinin *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarında ömür uzunluğu üzerindeki toksik etkileri araştırılmıştır. Popülasyonlar üzerinde tek değişkenin kronik alıma bağlı olarak verilecek olan terpenlerin olması amacıyla diğer tüm çevresel şartlar stabil tutulmuştur. Yapılan *in vivo* ömür uzunluğu testinin ilk deney setini oluşturan ve terpenlerin çözücülerini olan distile su ve dimetil sülfoksit (DMSO) kontrol grupları kendi aralarında karşılaştırılmış, ömür uzunluğu açısından toksik olmadıkları ve istatistiki açıdan iki kontrol grubu arasında fark gözlenmediği ($P>0,05$) istatistiksel olarak belirlenmiştir (Tablo 11). Aynı zamanda her iki test yönteminde kullanılan bu beş çeşit terpenden elde edilen veriler de tüm terpenlerin ortak çözücüsü olan DMSO kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. İkinci deney setini ise terpenlerin dört farklı konsantrasyonu ile hazırlanan uygulama grupları oluşturmaktadır. Distile su ve DMSO kontrol gruplarının belirlenen maksimum ömür uzunlukları sırasıyla ♀♀'de 77 ve 73 gün, ♂♂'de de 76 ve 73 gün olarak bulunmuştur (Tablo 11). Kronik olarak uygulanan her bir terpenin artan konsantrasyonuna bağlı olarak gözlenen durum ise kontrol gruplarına göre hem dişilerin hem de erkek bireylerin daha az hayatta kalabildikleridir. Şöyle ki; TİM, GUA, ABA, SKU ve ASTA terpenlerinin en yüksek uygulama grubu olan 200 ppm'de maksimum ömür uzunlukları ♀ popülasyonunda sırasıyla 42, 21, 49, 21, 45 güne; ♂ popülasyonunda da ise 42, 14, 46, 18 ve 39 güne gerilemiştir (Tablo 12,

Tablo 13, Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16). Maksimum ömür uzunluğunda meydana gelen bu gerilemeler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak $P<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Elde edilen bu değerler ile ortalama ömür uzunlukları da belirlenmiştir. Distile su ve DMSO kontrol gruplarının ♀ popülasyonunda $49,39\pm1,96$ ve $49,07\pm1,92$ olan bu değerler ♂ popülasyonunda $51,37\pm2,16$ ve $51,01\pm2,12$ gün olarak hesaplanmıştır. TİM, GUA, ABA, SKU ve ASTA terpenlerinin en yüksek uygulama grubu olan 200 ppm’de ise ortalama ömür uzunluğu değerleri ♀♀’de sırasıyla $23,09\pm0,74$; $12,11\pm0,26$; $26,96\pm0,94$; $9,24\pm0,44$ ve $27,06\pm1,18$ gün; ♂♂’de ise yine sırasıyla $24,89\pm1,10$; $11,44\pm0,21$; $23,21\pm0,92$; $23,21\pm0,92$ ve $23,52\pm0,92$ gün olarak belirlenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak meydana gelen ortalama ömür uzunluğundaki bu gerileme, DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman $P<0,05$ düzeyinde önemli olarak değerlendirilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında terpenlerin çeşitli canlı gruplarında da toksik etkili oldukları görülmüştür. Kozmetik, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan monoterpen çeşitlerinin biyokimyasal ve farmakolojik özelliklerini belirlemek için birçok çalışma yapılmış ve bunlardan özellikle İzmir (*Origanum onites*) ve karabaş (*Thymbra spicata*) kekiklerinden elde edilen timol ve karvakrol terpenlerinin şempanze, arap babunu ve insan lökosit hücrelerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sergiledikleri (Suzuki *et al.* 1987), ancak aynı terpenlerin *Drosophila melanogaster*’de asetilkolinesteraz enzim inhibitörü olarak toksisiteye sebep oldukları bildirilmiştir (Quinn 1987). Yine *Mentha piperita* (nane) ve *Perilla frutescens* (biftek otu)’de bulunan mentol ve perillanın asetilkolinesteraz enzim inhibitörü olarak *D.suzukii*’ye karşı fumigant aktivite sergilediği (Asplen *et al.* 2015) ve bu terpenlerin *D. melanogaster* ve insan lenfosit hücrelerinde de toksik etkili olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından (Franzios *et al.* 1997; Korkmaz 2005) bildirilmiştir.

Dianthus caryophyllus (karanfil), *Thymus vulgaris* (kekik), *Cinnamomum verum* (tarçın) ve *Zingiber officinale* (zencefil) gibi bitkilere ait terpenlerin gıdalarda kullanımlarının güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla yapılan araştırmada köpek kemik iliği mezenkimal hücreleri ve enterosit hücreleri (ince bağırsak mukozasının epitelinde bulunan emme hücreleri) kullanılmıştır. Bu bitkilere ait timol, gingerol, öjenol, mirsen, metil öjenol gibi çeşitli terpenlerin her iki hücre çeşidinde de toksik etki sergilediği (Ortega *et al.* 2016) ve öjenol, beta-karyofilen, metil öjenol ve humulen gibi terpenlerin, insanlar tarafından 8-10 ml kullanımlarına bağlı olarak karaciğer yetmezliği geliştirebildiği gösterilmiştir (Eisen *et al.* 2004).

Gıda ve kozmetik endüstrilerinde sıklıkla kullanılan *Cymbopogon citratus* (limon otu), *Ocimum gratissimum* (fesleğen) ve *Ocimum basilicum* (reyhan) türlerinden elde edilen neral, mirsen, estragol, linalol, öjenol ve timol terpenlerinin sıçanlar üzerindeki akut ve subakut

etkileri araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda bu terpenlerin tavsiye edilmeyen dozlarda (50, 500, 1000, 1500, 2000, 3000 ve 3500 µl) uygulamalarına bağlı olarak yüksek yapıli organizmaların mide ve karaciğer organlarında fonksiyonel hasarlara neden olabileceği belirlenmiştir (Fandohan *et al.* 2008).

Limon otu bitkisinden elde edilen metil öjenol, karyofilen gibi metabolitlerin de yüksek konsantrasyonlarda kullanımına bağlı olarak insan kolon ve sinir hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği (Sharma *et al.* 2009) ve 800 µg/ml⁻¹ uygulamasında ise insan lenfositlerinde DNA hasarı oluşturduğu gözlenmiştir (Sinha *et al.* 2014).

Öjenolün insan epitel kolorektal adenokarsinom hücresi ya da kolon kanseri hücresi olarak da bilinen Caco-2 hücrelerinde de toksik etkili olduğu da Slamenova *et al.* (2009) tarafından bildirilmiştir.

Özellikle akciğer hastalıklarında tercih edildiği bilinen ve kafur ağacı (*Cinnamomum camphora*)’ndan elde edilen kafur, limonen ve timol gibi terpenlerin *Saccharomyces cerevisiae* D7 suşunda mutajen ve toksik etkili olduğu Bakkali *et al.* (2005) tarafından belirlenmiştir. Aynı şekilde tıbbi ve farmakolojik olarak çeşitli uygulamalarda kullanılan pelin otu (*Artemisia absinthium*) bitkisine ait tujon, felandren, timol, pinen, karyofilen gibi metabolitlerin *Saccharomyces cerevisiae* D7 suşunda mutajen ve toksik etkili olduğu ayrıca mitokondriyal DNA üzerinde de mutasyonlar meydana getirdiği yine Bakkali *et al.* (2005) tarafından bildirilmiştir.

Hint defnesi olarak da bilinen *Melaleuca*’da bulunan limonen, α-terpinen, aromadendren, terpinen-4-ol ve p-simen gibi metabolitler ile Al-Batina *et al.* (2003)’ya göre yatıştırıcı ve dengeleyici özellikleri göz önüne alınarak kullanımı yaygın olan kimyon (*Cuminum cyminum*) bitkisinin pinen, felandren ve simen gibi metabolitleri *Salmonella typhimurium*’un TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşları üzerinde oksidatif etkili olduğu ve limolin, pinen, mirsen, linalool ve terpinolen gibi diğer monoterpenlerin de insan prostat ve böbrek hücreleri ile maymun böbreği hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı Silva and Fernandes (2010) tarafından belirtilmiştir. *Lavandula* (lavanta)’da da bulunan pinen, sineol ve borneol metabolitlerinin insanlarda deride alerjik reaksiyonlara sebep olduğu da gözlenmiştir (Sugiura *et al.* 2000). Sitral, geraniol ve mirsen gibi birçok terpeni içeren limon otu bitkisinin apoptoz ve nekroz ile hücre ölümüne neden olabilecek sitoplazmik bileşen sızıntısına yol açan akışkanlıkları değiştirerek hücre zarı geçirgenliğini artırabileceği (Bakkali *et al.* 2008), çimlenme döneminde sitral monoterpenine maruz bırakılan buğdaylarda da çimlenememe durumundan dolayı monoterpenlerin büyüme inhibitörü olabileceği bildirilmiştir (Dudai *et al.* 2000).

Renk ve koku verici olarak kozmetikte ve lezzet verici madde olarak da gıdalarda kullanıldığı bilinen terpinen monoterpeninin sıçanlar kullanılarak embriyo fototoksik etkisi araştırılmış ve çalışma sonunda 30, 60, 125 ve 250 mg/kg terpinenin yüksek dozlarda uygulanmasına bağlı olarak gecikmiş ossifikasyon belirtileri (zayıf kemikleşmiş ve kemikleşmemiş kemikler ve düzensiz süngerimsi kemikler) ve düşük düzeyde de olsa iskelet malformasyonu gösterdiği belirlenmiştir (Araujo *et al.* 1996).

Antifungal aktivite gösterdiği bilinen sinnamaldehit, karvakrol, timol ve karvon. terpenlerinin sitotoksitesi ve genotoksitesi yapılan *in vitro* mikrobiyal ve memeli testleri ile araştırılmış ve bu dört terpenin Hep-2 hücrelerinin doza bağlı bir şekilde yaşayabilirliğini ve çoğalmasını inhibe ettiği belirlenmiştir. Ames ve SOS kromotestlerinde ise toksik etkili olabileceği de gözlenmiştir (Stammati *et al.* 1999). *T. vulgaris* (kekik) yağında yoğunlukla bulunan timolün endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını artırdığı ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak apoptoza neden olduğu bulunmuştur (Chang *et al.* 2014).

Elettaria cardamomum (kakule) ve *Origanum majorana* (mercanköşkü)'da bulunan terpinen metabolitinin 0.5, 0.75 ve 1.0 mg/ml dozlarının farelere uygulanması sonucunda terpinenin tüm dozlarda hücre canlılığını azalttığı, DNA hasarını indüklediği ve ayrıca Na metabolizmasında değişikliklere neden olarak sitotoksik ve beyin hücrelerinde de genotoksik olduğu (Baldissera *et al.* 2018), alfa-terpinen ve linolool metabolitlerinin ise fare beyin nörotransmitterleri üzerinde asetilkolinesteraz (AChE) ve sodyum-potasyum pompası (Na^+ , K^+ , ATPaz) yoluyla güçlü nörotoksitete sebep oldukları, davranış anormalliklerini indüklediğini bildirmiştir (Coelho *et al.* 2011; Baldissera *et al.* 2016). Hücre içi iyon ve membran potansiyel homeostazı ile nöronal uyarılabilirlikte önemli rollere sahip oldukları bilinen Na^+ , K^+ , ATPaz metabolizmasında limonin, pinen, linalool gibi bazı monoterpenlerin düzensizlikler oluşturarak enzim aktivitesi inhibisyonuna, bozulmuş sinaptik yanıt ve sonuç olarak farelerde hafıza kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Pacheco *et al.* 2018). Aynı zamanda bu terpenlerin beyin nörotransmitterlerinin aktivitesindeki düzensizliklere dayalı olarak hafıza bozukluğuna neden olabileceği ve ROS seviyesini artırabileceği de çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Maharajan *et al.* 2018; Muthulakshmi *et al.* 2018). Deneysel model olarak yine farelerin kullanıldığı bir çalışmada monoterpenlerden olan timolün olası nörotoksik etkisi araştırılmıştır. Farelere gavaj yoluyla verilen farklı dozlardaki timolün 20 ve 40 mg/kg dozlarda hafıza kaybına yol açtığı, kan-beyin bariyerinde meydana gelen yıkımda kontrol gruplarına göre önemli düzeyde artış gösterdiği görülmüştür. 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^+ , K^+ , ATPaz) aktivitesinin inhibe edildiği ve beyindeki ROS seviyesinde yükselmeye yol açtığı belirlenmiştir (Baldissera *et al.* 2018).

Diterpenler grubuna ait çeşitli metabolitler ile de toksikolojik çalışmalar yapılmış ve konsantrasyon artışına bağlı olarak istenmeyen etkiler meydana gelebileceği görülmüştür. Örneğin; antioksidan ve antibakteriyel etkili olduğu bilinen dehidroabietik asitin balıklar üzerinde karaciğer fonksiyon bozukluğu, hemoliz ve sarılık meydana getirdiği bulunmuştur (Bushnell *et al.* 1985). Reçine metabolitlerinden olan dehidroabietik asit diterpeninin eklembacaklılardan olan *Daphnia magna* ve *Daphnia pulex* (su piresi)'de akut ve kronik toksisite geliştirdiği belirlenmiştir (Servizi *et al.* 1986). Aynı zamanda reçine metabolitlerinin *Salmo gairdneri* (gökkuşaağı balığı)'ye 2-0.4 mg/l uygulanması sonucunda karaciğer fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak sarılığın oluştuğu gözlenmiştir (Mattsoff and Oikari 1987). Aynı yazarlara göre, sarılığın ortaya çıkmasında reçine metabolitlerinin eritrositlerin hızlı parçalanmasına yol açması ile bilirubinün salgılanmasında görev alan bazı yollara müdahale etmesidir (Mattsoff and Nikinmaa 1988). Liss *et al.* (1997)'a göre, dehidroabietik asit diterpeni gibi çeşitli reçine metabolitleri omurgasızlar ve algler dahil olmak üzere çeşitli sucul organizmalarda da toksisiteye sebep olmaktadır.

Dehidroabietik asit ve izopimarik asit terpenlerinin toksisitelerinin belirlendiği diğer bir çalışmada gökkuşaağı balığı (*Melanotaenia trifasciata*) kullanılmış ve artan terpen konsantrasyonuna bağlı olarak dehidroabietik asitin hücre hasarı, kalsiyum homeostazi bozuklukları ile bazı fizyolojik bozukluklara neden oldukları ve *Salmo gairdneri* (gökkuşaağı alabalığı) ile *D. manga*'da toksik etkiye dayalı olarak hayatta kalabilme oranlarını azalttıkları belirtilmiştir (Rabergh *et al.* 1999; Peng and Roberts 2000). Dehidroabietik asit ve abietik asitin olası ömür uzunluğu ve gelişim toksisitelerinin araştırıldığı bir başka çalışmada bu metabolitlerin artan konsantrasyona bağlı olarak (0,25-8 mg/L) tıpkı bizim ömür uzunluğu çalışmalarında *D. melonagaster*'de gözlenen ömür uzunluğu kısaltmaları gibi *D. manga* (su piresi)'da da hayatta kalma süresinin kısaltıldığı ve ayrıca total vücut büyüklüğünde küçülmenin meydana geldiği gözlenmiştir (Kamaya *et al.* 2005).

Diğer bir diterpen çeşidi olan retinolün yüksek konsantrasyonlarda tüketilmesi sonucu karaciğerde enfeksiyon ve tümör oluşumu gibi metabolik bozukluklar ile hücre sitotoksitesine ve hatta hamileliklerde bebeklerde malformasyonlara neden olduğu (Rajoshok and Sumathi 2015), sıçan, tavşan gibi farklı organizmalarda embriyotoksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Clark 2009). Ayrıca retinolünde *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarının yaşam süresini kısalttığı Uysal ve Orunç (2018) tarafından belirtilmiştir.

Kozmetik ve ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılan guazilen ve azulen seskiterpenlerinin Wakabayashi *et al.* (2003) tarafından yapılan bir çalışma sonucunda bu metabolitlerin insan hücrelerinde sitotoksik olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca hem azulen hem de guaiazulenin *Salmonella typhimurium* bakteri suşlarında (TA102) spontan mutasyondan dört ila beş kat daha yüksek fotomutajenite sergilediği gösterilmiş ve ışık uygulamaları ile kombine olan azulen ve guazilenin DNA'da hasarlar meydana getirdiği bildirilmiştir (Wang *et al.* 2003).

Fiori *et al.* (2008) tarafından azulen ve guazilen ile fotodegradasyon çalışmaları sonucunda ise guazilenin foto-reaktivitesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS), özellikle tekli oksijen veya daha toksik kararlı fotoürünlerin aracılık ettiği fototoksositeye neden olduğu belirlenmiştir.

Yüksek mitotik özelliği sebebi ile kanser araştırmalarında kullanılan nöroblastom hücreleri ile sağlıklı hücreler kullanılarak yapılan karşılaştırmalı çalışmada, guazilenin yüksek dozda total oksidatif seviyeyi (TOS) artırdığı tespit edilmiş ve bunun sonucunda sitotoksik etkiler gözlenmiştir. Ayrıca periferik kan lenfositleri ile yapılan çalışmada da guazilenin farklı dozlarda kullanımı sonucu (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 400 mg/L) yine sitotoksositeye yol açtığı belirlenmiştir (Vinholes *et al.* 2014; Togar *et al.* 2015b; Llana-Ruiz-Cabello *et al.* 2015).

Hassan *et al.* (2006), çemen otu bitkisi (*Trigonella foenum graecum*) bileşenlerinden olan β -sitosterol ve stigmasterolün farklı dozlarının fare karaciğer ve ovaryumunda DNA ve RNA içerikleri ile histopatolojik değişimlere yol açtığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar tarafından bu değişimlerin önemli düzeyde olmadığı düşünülse de elde edilen sonuçlara dayanarak çemen otu bileşenlerinin toksik etkili olabileceği vurgulanmıştır. Stigmasterol terpenini ömür uzunluğu üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarına kronik stigmasterol uygulanmış ve dişi popülasyonunun kontrol grubunda ortalama ömür uzunluğu $48,15 \pm 1,95$ iken en düşük ve en yüksek uygulama gruplarında (50-400 ppm) $48,49 \pm 1,77$ ve $40,09 \pm 1,51$ güne gerilediği belirlenmiştir. Aynı şekilde erkek popülasyonunda da kontrol grubuna ait ortalama ömür uzunluğu $48,32 \pm 2,22$ gün iken en düşük ve en yüksek uygulama grubunda $44,92 \pm 1,65$ ve $34,36 \pm 1,26$ güne gerilediği görülmüştür (Orunç ve Uysal 2018).

Triterpenler grubuna ait olan metabolitlerden skualenin kozmetik ürünlerinde sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir ancak bu terpen ile yapılan dermatolojik çalışmalarda farelerde akut toksositeye ve alerjik reaksiyonlara neden olduğu ve *D. melanogaster*'de de toksik etkiler gösterdiği Huang *et al.* (2009) tarafından bildirilmiştir.

In vivo ömür uzunluğu test yöntemi kullanılarak TİM, GUA, ABA, SKU ve ASTA terpenlerinin toksik etkileri, daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir ve bu sonuçlar bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Çalışmanın ikinci kısmını oluşturan ve terpenlerin olası genotoksik etkinlikleri belirlemek amacıyla da *in vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) uygulanmıştır. SMART'dan elde edilen veriler de konsantrasyon artışına bağlı olarak her terpenin somatik mutasyonları uyardığını göstermiştir. Şöyle ki; DMSO kontrol grubunda 0,57 olan klon indüksiyon frekansı, her terpeninin en yüksek iki konsantrasyonu olan 200 ve 400 ppm uygulama gruplarında da artış göstermiştir. Örneğin normal kanat fenotipinde 200 ve 400 ppm'lik uygulama gruplarında KİF değerleri TİM terpeninde sırasıyla 1,04 ve 1,28'e, GUA terpeninde 1,61 ve 1,87'ye, ABA'da 1,30 ve 1,40'a, SKU ve ASTA'da ise 0,93 ve 1,30 ile 0,72 ve 1,19'a kadar yükselmiştir (Tablo 18, Tablo 19, Tablo 20, Tablo 21 ve Tablo 22). Normal kanat fenotipinde meydana gelen bu mutant klon sayısındaki artışlar konsantrasyon artışına bağlı olarak meydana gelmiş ve yapılan istatistiksel analizler sonucunda da bu pozitif önemli olarak değerlendirilmiştir. Serrat kanat fenotipinde de KİF değerlerinde artışlar gözlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Terpenlerin doz-süre etkileşimine bağlı olarak genotoksik etkili olabilecekleri bu çalışma ile belirlenmiş ve yapılan literatür taramaları ile de bu sonuçlar desteklenmiştir. Şöyle ki;

Dış hekimliğinde antiseptik ve ağrı kesici olarak kullanılan karanfil (*Eugenia caryophyllata*) ve özellikle Güneydoğu Çin'de kullanılan Çin tarçını (*Cinnamomum cassia*) bitkilerinde bulunan öjenol, öjenol asetat ve karyofilin metabolitlerinin *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde mutajen oldukları tespit edilmiştir (Sekizawa and Shibamoto 1982).

Sindirimi güçlendirici, gaz söktürücü, kramp çözücü hatta anne sütünü artırıcı gibi çeşitli alternatif tedavi yöntemlerinde kullanımı mevcut olan dere otu (*Anethum graveolens*) bitkisinin içerdiği d-limonen ve simen terpenlerinin dört farklı dozda yeni doğmuş farelere intraperitoneal yolla verilmesi sonucu bu terpenlerin farelerin karaciğer hücrelerinde DNA'ya bağlandığı ve tümör oluşumuna sebep olduğu gözlenmiştir (Phillips *et al.* 1984). Yine Phillips *et al.* (1984) tarafından yapılan bir çalışmada, apiol, pinen, felandren gibi metabolitleri içeren ve özellikle mutfakta kullanımı olan ve ayrıca çayı da yapılan maydanoz (*Petroselinum crispum*)'un 0.25, 0.5, 1.0 ve 3.0 µmol dozları yeni doğmuş farelere intraperitoneal yolla verilmiş ve sonuçta yeni doğmuş farelerin karaciğer hücrelerinde de tümör oluşumuna rastlanmıştır. Benzeri etkilere ceviz (*Juglans regia*), tarçın (*Cinnamomum verum*), siyah biber (*Piper nigrum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), karanfil (*Eugenia caryophyllata*) ve limon otunda

(*Cymbopogon citratus*) bulunan metilöjenol ve karyofilen terpenlerinin de sebep olduğu aynı araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Phillips *et al.* 1984; Howes *et al.* 1990).

Tıp, kozmetik ve gıda gibi çeşitli sektörlerde tercih edilen aynı zamanda çay ve baharat olarak da kullanımı mevcut olan mentol, menton gibi terpenlerin hem erkek hem de dişi farelere yüksek dozda uygulanması sonucu ve özellikle erkek farelerde karaciğer kanseri oluşumunun arttığı gözlenmiştir (Haseman *et al.* 1986).

Melaleuca (hint defnesi)'da bulunan limonen, α -terpinen, aromadendren, terpinen-4-ol ve p-simen gibi metabolitler ile *Lavandula* (lavanta)'da bulunan pinen, sineol ve borneol metabolitlerinin deride alerjik reaksiyonlara sebep olduğu (Knight and Hausen 1994) ve ayrıca limonen terpeninin erkek sıçanlara yüksek dozlarda uygulanması sonucunda sıçanlarda böbrek tümörleri meydana getirdiği tespit edilmiştir (Hard and Whysner 1994).

Tarçın (*Cinnamomum verum*), karanfil (*Eugenia caryophyllata*) ve limon otunda (*Cymbopogon citratus*)'da bulunan metil öjenolün kemirgenlerde yüksek dozlarda karsinojenik etki göstermesi nedeniyle insan sağlığı açısından da risk taşıdığı belirtilmektedir (Gardner *et al.* 1997). Karanfil (*Syzygium aromaticum*)'de bulunan öjenol terpeni *in vitro* şartlarda (2500 μ l) sıçan karaciğer hücrelerine uygulandığı zaman kromozom bozukluklarını ve endoreplikasyonu uyarmıştır (Maralhas *et al.* 2006).

Salvia fruticosa (Yunan adaçayı) ve *Mentha pulegium* (nane)'da bulunan sineol, tujon, kamfor, pulegon ve menton gibi terpenlerin etkileri, zeytin meyve sineği olarak bilinen *Bactrocera oleae* ve *D. melanogaster* üzerinde çalışılmıştır. Somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testi uygulandığında kamfor, pulegon ve mentonun *B.oleae*'da mutajenik etkiyi uyardığı görülmüştür. Sineol terpeninin ise her iki organizmada da zayıf toksik etkili bulunmuştur (Kounatidis *et al.* 2009).

Coridothymus capitatus (acıkekik) ve *Satureja thymbra* (karakekik) bitkilerinde bulunan ve GC-MS yöntemiyle belirlenen karvakrol, timol, terpinen ve simen metabolitleri ile yapılan somatik mutasyon ve rekombinasyon testi sonucunda özellikle karvakrol ve timolün *D. melanogaster* üzerinde genotoksik etkili olduğu ve somatik mutasyonları uyardığı ve bu monoterpenlerin insan lenfositlerinde doz artışına bağlı olarak kromozomal aberasyonları ve kardeş kromatit değişimlerini artırdığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Karpouhtsis *et al.* 1998; Lazutka *et al.* 2001).

Nane’de bulunan mentol, menton, pulegon, limonen terpenlerinin sıçanlara akut olarak ağız yolu ile verilmesi sonucu düşük derecede toksik oldukları tespit edilmiş, subkronik oral çalışmalarda ise beyinde kistik lezyonlara sebep oldukları bildirilmiştir (Nair 2001). Aynı araştırmacı tarafından menton terpeninin tavşanlarda intradermal uygulamalarda alerji, fare lenf hücrelerinde mutajenite ve hamster fibroblast hücrelerinde ise kromozomal aberasyonlara yol açtığı gözlenmiştir. Nananın dışında dere otundan elde edilen karvon, d-limonen ve simenin olası toksik etkileri yine insan lenfosit kültürleri üzerinde *in vitro* kromozomal aberasyon ve kardeş kromatit değişim testi ile belirlenmiş ve doz artışına bağlı olarak genotoksik etkili olduğu Lazutka *et al.* (2001) tarafından gözlenmiştir.

Pavlidou *et al.* (2004), 1,8-sineol metabolitinin olası genotoksik ve insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla *D. melanogaster* ve *B. oleae*’yı kullanarak yaptığı somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) sonucunda 1,8-sineol terpeninin *B. oleae* üzerinde oldukça toksik olduğunu ancak *D. melanogaster*’e karşı toksisitesinin önemli olmadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar nane (*Mentha*)’de bulunan mentol, menton, pulegon, limonen terpenlerinin tavşanlarda intradermal çalışmalarda ciddi reaksiyonlar gösterdiğini, pulegonun hepatotoksik ve mentonun da somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile *B. oleae*’da oldukça toksik olduğunu rapor etmişlerdir (Pavlidou *et al.* 2004).

Gıda ve parfümeri sanayisinde önemli bir yeri olan mersin (*Myrtus communis*) bitkisinin ve içerdiği limonen, pinen, sitral ve ökaliptol terpenlerinin kabızlık giderici ve antiseptik olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ancak Hayder *et al.* (2004) tarafından yapılan çalışmada bu bitki bileşenlerinin *Escherichia coli* suşları üzerinde yapılan genotoksisite testlerinde mutajenik etkiler meydana getirdiği belirlenmiştir.

Lavandula angustifolia (lavanta çiçeği), *Ocimum basilicum* (fesleğen) ve daha birçok *Lamiaceae* (ballıbabagiller) türlerinde bulunduğu bilinene linalool ve linalil asit gibi metabolitlerin *Salmonella typhimurium* TA 98, TA100 ve *Escherichia coli* WP2uvrA suşlarında mutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Di Sotto *et al.* 2008).

Boğmaca ve öksürük, sinir sistemi zafiyeti, romatizma ve barsak hastalıklarına karşı özellikle çay olarak kullanımının yanı sıra antibakteriyel ve antienflamatuar etkilerinden de sıklıkla faydalanan kekik bitkisi bileşenlerinden timol ve karvakrolün olası genotoksik aktiviteleri insan lenfositlerinde tek hücre jel elektroforezi ile incelenmiş ve düşük konsantrasyonlarda DNA aberasyonlarına neden olmaz iken yüksek konsantrasyonlarda DNA’da önemli zararlara neden olduğu görülmüştür (Aydın *et al.* 2005). Timol ve karvakrol monoterpenlerinin sıçan kemik iliği hücrelerinde ise yapısal ve toplam kromozom anormalliklerini önemli ölçüde uyardıkları ve aynı zamanda mitotik indeksi doza bağlı olarak

azalttıkları da Azirak and Rencüzoğulları (2008) tarafından tespit edilmiştir. Yine Büyükleyla and 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.

Gıda ve kozmetik sektörlerinin yanı sıra alternatif tıp yöntemlerinde de kullanılan dağ biberi (*Litsea cubeba*)'nin içermiş olduğu neral, geranial, sitral ve limonen metabolitlerinin farelere oral, deri ve solunum yoluyla uygulanması sonucunda mikronükleus oluşumuna ve kromozom aberasyonlarına sebep oldukları (Luo *et al.* 2005) kafur, okaliptol ve tujon terpenlerinin apoptoza, terpinen metabolitinin maymun hücrelerinde DNA kırılmalarına ve metil öjenolün de sıçanlarda karaciğer, akciğer, mesane, kemik iliği ya da böbrek dokusunda DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir (Ding *et al.* 2011).

Kişisel bakım ürünlerinde özellikle de losyon, krem gibi kozmetik ürünlerinde sıklıkla kullanıldıkları bilenen ve portakal limon, zencefil gibi bitki türlerinden elde edilen metabolitlerin meydana getirebileceği olası toksik etkilerin araştırıldığı bir çalışmada *Citrus aurantium dulcis* (portakal)'de bulunan limonen, mirsen ve linalool, *Cymbopogon citratus* (limon)'ta bulunan sitral, geraniol, sardunil, limonen, *Fusanus spicatus* (odun/santal)'ta bulunan bisabolol, *Zingiber officinalis* (zencefil)'te bulunan limonen, sitronel, zingiber, *Daucus carota sativa* (havuç)'da bulunan karyofilen pinen, linalool ve bergamotta bulunan limonen, linalool bergamottin metabolitlerinin yapılan *in vitro* fototoksikite testi sonucunda hepsinin fototoksik ve sitotoksik olabileceği bildirilmiş ve özellikle fotoreaksiyon tarafından üretilen tekli oksijen ve süperoksit anyonu içeriğinin arttığı bunun da hücrelerde, organellerde veya DNA'da tahribata neden olabilecekleri düşünülmüştür (Nathalie *et al.* 2006).

Pteridium aquilinum (kartal eğreltisi)'dan elde edilen ptaquilosid seskiterpeninin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimini uyarak önemli düzeyde genotoksik olduğu (Gil da Costa *et al.* 2014), insanlarda yemek borusu ve mide kanserine, oral uygulama ile sıçanlarda da idrar kesesi tümörlerinin oluşumuna neden olduğu ve sıçanlara intravenöz olarak uygulanması ile meme bezi tümörlerinin oluşmasına da yol açabilecek DNA alkilleyici bir ajan olabileceği bildirilmiştir (Hirono *et al.* 1987; Shahin *et al.* 1998).

Birçok sağlık ve kozmetik ürünlerinde doğal bir bileşen olarak kullanılan guazilen ve azulen seskiterpenlerinin normal insan hücrelerinde sitotoksik ve farklı bakteri suşlarında da fotomutajenik olabileceği gösterilmiştir (Wakabayashi *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003; Fiori *et al.* 2011). Aynı şekilde guazilen ve azulenin *Salmonella typhimurium* bakteriyel mutajenite

testinde (Ames testi) mutajenik olduğu ve UV ışığı muamelesi sonucu yapılan *in vitro* Comet testinde ise *Salmonella*'da DNA hasarı meydana geldiği bildirilmiştir (Struwe *et al.* 2011).

Yüksek mitotik özelliği sebebi ile kanser araştırmalarında kullanılan nöroblastom hücreleri ile sağlıklı hücreler kullanılarak yapılan karşılaştırmalı çalışmada, guazilenin yüksek dozda total oksidatif seviyeyi (TOS) artırdığı tespit edilmiş ve bunun sonucunda sitotoksik etkiler gözlenmiştir. Ayrıca periferik kan lenfositleri ile yapılan çalışmada da guazilenin farklı dozlarda kullanımı sonucu (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 400 mg/L) yine sitotoksositeye yol açtığı belirlenmiştir (Vinholes *et al.* 2014; Llana-Ruiz-Cabello *et al.* 2015; Togar *et al.* 2015a).

Akciğer ve kalp hastalıklarının tedavisinde tercih edilen ve ana bileşenlerinin dehidroabietik asit, abietik asit, izopimarik asit gibi diterpenler olduğu bilinen sarıçam (*Pinus sylvestris*) bitkisi ile yapılan çalışmalarda da bu terpenlerin genotoksik etkili olduğu belirlenmiştir. Bu terpenlerin doz artışına bağlı olarak kromozomal aberasyonları ve kardeş kromatit değişimlerini artırdığı ve *D. melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) sonucunda somatik mutasyonlara sebep olduğu da gözlenmiştir (Lazutka *et al.* 2001).

Euphorbia hirta (astım bitkisi) tropik ülkelerde yaygın olarak bulunan bir otur ve geleneksel astım, bronşit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan ve *Euphorbia hirta* (astım bitkisi)'dan elde edilen kuarsetin metabolitinin *Salmonella typhimurium* TA98'de kuvvetli mutajenik olduğu ve bu etkinin de özellikle karaciğerde tümör oluşumuna neden olarak kansere yol açabileceği Loh *et al.* (2009) tarafından ortaya konulmuştur.

Gossypium (yayla pamuğu) cinsinden elde edilen gosipol metabolitinin periferik lenfosit hücrelerinde kardeş kromatit değişimini uyarak genotoksositeye sebep olduğu (Best and McKenzie 1988), içerisinde fitosterol ve stigmasterol gibi terpenleri barındıran soya fasülyesi (*Soja hispida*)'nin *Salmonella* mutasyon testi ve farklı ileri mutasyon testlerinde mutajenik aktivite gösterdiği, ayrıca fare kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatit değişimini ve mikronükleus oluşumunu indükleyerek genotoksik etkili olduğu da saptanmıştır (Qu *et al.* 1992).

Terpenlerin diğer bir sınıfı olan ve özellikle antioksidan etkinliklerinden dolayı sıklıkla tercih edilen karotenoidlerin yüksek konsantrasyonlarda kullanımına bağlı olarak insan periferik hücre kültürlerinde, fare, sıçan, beagle köpekleri ve bir çeşit kemirgen olan gerbil (*Pachyuromys duprasi*)'de DNA hasarına neden oldukları gözlenmiş ve bunun sebebinin de karotenoidlerin yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan aktiviteye sahip olabilmeleridir (Azqueta and Collins 2012). Astaksantin tetraterpeninin genotoksitesini belirlemeye yönelik

olarak yapılan bir çalışmada, farelere kronik olarak (40, 200, 1000 mg) astaksantin uygulanması yapılmış ve dişi farelerde iyi huylu, hepatoselüler adenom oranında artış gözlenmiştir (Edwards *et al.* 2016). Daha önce yapılan bu çalışmaların tümünden elde edilen bulgular ve sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile son derece uyumludur.

Tüm araştırmacılar tarafından ortak bir görüş olarak sunulan mekanizma ise terpenlerin oksidatif strese yol açarak genotoksik ya da toksik etki sergileyebildikleri/sergileyebilecekleri şeklindedir (Chang *et al.* 2014). Şöyle ki; canlı dokularda sürekli ve kontrollü bir şekilde serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar üretilmektedir. Vücut içerisinde bulunan/oluşan serbest radikal miktarının normal düzeyde tutulabilmesi için antioksidan savunma sistemleri tarafından nötralize edilmeleri gerekir (Urso and Clarkson 2003). Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), indirgenmiş glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST), metionin sülfoksit redüktaz (MSR), tiyoredoksin peroksidaz (TRXP) gibi enzimler insanlarda dahil pek çok organizmada ve *Drosophila*'da da bulunan antioksidan enzimlerden başlıcaları olarak bilinmektedir (Moskovitz *et al.* 1997; Missirlis *et al.* 2003). Antioksidanlar oksidanları nötralize etmede yetersiz kalırsa oksidan/antioksidan arasındaki denge oksidanların lehine bozulmakta ve bu durum oksidatif stres olarak tanımlanan doku hasarına yol açmaktadır. Çeşitli araştırmacılara göre, oksidatif stres, hücre yapı taşları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimler üzerinde meydana gelen reaksiyonel hasarlardan kaynaklanmaktadır (Yu 1999; Clarkson and Thompson 2000).

Hücre membranı yağ asitleri üzerine etki ederek lipid peroksidasyonunu başlatan serbest radikaller, poli-doymamış yağ asitlerinin radikaller ile lipid peroksidasyonu sonucu başlayan ve birbirini takip eden zincirleme reaksiyonlar ile organizmada hasarlara neden olurlar (Davies and Goldberg 1987). Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilineni malondialdehit, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak, membranlarda reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri etkisiz hale getirmek suretiyle membran proteinlerinde ciddi hasarlar meydana getirebilmektedir (Goulart *et al.* 2005). En son aşama olarak da malondialdehidin, DNA'da mutasyona, hücresel düzeyde kansere ve bazı genetik hastalıklara yol açabileceği Marnett (2002) tarafından bildirilmektedir.

Lipitler gibi proteinlerde serbest radikallerden etkilenirler. Ancak proteinlerin serbest radikallerden etkilenme oranları, içerdikleri aminoasitlere de bağlıdır. Akkuş (1995)'a göre, bağ yapmamış ve sülfür içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlerden meydana gelen proteinler, serbest radikallerden daha kolay etkilenebilmektedir. Protein yapısındaki amino asit modifikasyonları yanlış kompleks oluşumuna, yanlış katlanmalara sebep olabilmektedir. Karasu (2008)'ya göre, hücre

ölümlerinin başlıca nedeni, nükleik asitlerin serbest radikaller ile reaksiyona girmesidir. Oksidatif stres kaynaklı hasarlar DNA’da mutasyonlara, baz modifikasyonlarına, dizilerin kopması ya da yer değiştirmelerine, RNA’da yanlış kodlama ve yanlış eklemelere neden olabilmektedir. Slijepcevic (2006)’e göre, DNA’da oluşan hasarların tespiti, hasara verilen hücresel cevabın ne olduğu, hangi tamir mekanizmasının işlevsel olduğu/olamadığı, hücre siklusu kontrol aşamalarının işletilip işletilemediği ve p53 etkinliğinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Oksidatif strese neden olan diğer kimyasal ajanlar gibi terpenlerin de konsantrasyon artışına bağlı olarak bu noktalarda değişikliklere, metabolik yollarda bozukluklara ve hasar birikimine neden olabileceği düşünülmektedir. Meydana gelen bu etkilerin neticesinde terpenler, genotoksik aktiviteye dayalı olarak doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite gibi bazı kalıtsal ve multifaktöriyel hastalıklara sebep olabilirler. Oksidatif stres aktivitesi ile hücre iletişim yollarının engellenmesi, hücre büyümesinin sınırlandırılması ile replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi de azaltılarak oluşan erken hücre ölümleri sitotoksik etkiyi de uyarmaktadır (Stara *et al.* 2013).

Şöyle ki; timol, karvakrol, guazilen, gosipol gibi çeşitli terpenlerin canlıların DNA’larında bulunan şeker fosfat omurgasındaki fosfodiester bağlarını koparması yoluyla yapısal kromozom anormalliklerine, ayrıca iğ ipliği inhibitörü gibi davranarak iğ ipliği mikrotübüllerinin oluşumunu engellemesi yoluyla sayısal kromozom anormalliğine (anöjeniye) sebep oldukları daha önce yapılan bir çalışmada Azirak (2007) tarafından bildirilmiştir. Timol monoterpeni gibi çeşitli bileşenlerin hücre enerji üretim merkezlerinin fonksiyonlarını baskı altında tutmaları ve dolayısıyla ATP sentezini azaltmaları sonucunda hücre bölünmesinin yavaşladığını ve sitotoksik etki ortaya çıkararak hücreleri yaşlanmaya yani ölüme sürüklediği çeşitli araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Jain and Andsorbhoy 1988). Bazı araştırmacılar da bu bileşenlerin kromozom aberasyonlarını uyarma yoluyla sitotoksik etkiye sahip olabileceğini ileri sürmüşler (Galloway *et al.* 1998; Hilliard *et al.* 1998) ve *in vitro* sitotoksik etkilerinin DNA çift iplik kırıklarının oluşmasına bağlı olarak ortaya çıktığını belirtmişlerdir (Kirkland and Müller 2000).

Tüm bu “metabolik değişikliklere bağlı olarak gelişebilen/gelişebilecek toksik/sitotoksik/genotoksik etkiler hücresel hasarlara yol açarak *D. melanogaster*’in ömür uzunluğunun kısalmasına ve kanat hücrelerindeki normal trikomların şekil değişikliğine yani fenotipik değişikliklere sebep olmuştur” diyebiliriz. Çünkü metabolik yollardaki hasarları ve genotoksik aktiviteyi indükleyen etkenler ömür uzunluğunu belirleyen iç faktörlerde tahribata ve DNA yapısında kalıcı değişikliklere neden olarak genetik mekanizmalarda farklılıklara yol açmaktadır. Bu da etkilenen bireylerin yaşam sürelerinin kısalmasına ve aynı şekilde

kromozomlarında yapısal aberasyonlara yol açarak fenotipte gözlenebilen değişikliklere neden olmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında kullanılan *D. melanogaster* Oregon-R yabanıl soyunun dişi ve erkek popülasyonlarında gözlenen maksimum ve ortalama ömür uzunluğundaki kısalmanın nedenini terpenlerin vücut içerisinde oksidan/antioksidan dengesini oksidanlar lehine bozmuş olabileceği şeklinde düşünmekteyiz. Şöyle ki, yaşlanma teorilerinde de ifade edildiği gibi serbest radikaller uygun konsantrasyonlarda radikal süpürücüler ile elemine edilirken onlar hücre içinde artan konsantrasyonlarına bağlı olarak toksisite gösterebilmektedirler. Çalışma kapsamında kullanılan TIM, GUA, ABA, SKU ve ASTA terpenleri de doz-süre etkileşimine bağlı olarak hücre içerisinde serbest radikal oluşumunu indükleyerek vücut içerisindeki tüm molekülleri muhtemelen etkilemişlerdir. Öyle ki; bu moleküllerden en çok etkilenenler arasında lipitler bulunmaktadır. Hücre membranlarında bulunan lipitler serbest radikallerle etkileşime girerek yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak bilinen peroksidasyon ürünleri meydana getirebilmekte bunun sonucu olarak da geri dönüşümsüz membran hasarları oluşabilmektedir (Alem 2007). Aynı zamanda serbest radikaller proteinleri ve DNA'yı hasarak uğratarak genetik ve metabolik bozukluklar ile çeşitli hastalıklara da neden olabilmektedirler (Harman 1981; Ames *et al.* 1993; Droge 2002). Artan reaktif oksijen türleri yaşlanma teorilerinden ölümcül hata teorisinde de ifade edildiği gibi RNA'dan sentezlenen enzim ve proteinlerde hatalara neden olabilmektedir (Öksüzokyar vd 2016). Protein sentezi sırasında kontrol edilemeyen ve düzeltilemeyen hatalar oluşturarak bu hataların hücre içinde birikmesine yol açabilmekte ve hücrel ölüm mekanizmasını hızlandırabilmektedir. Yine serbest radikaller proteinlerin yapısında olduğu gibi fonksiyonlarında da değişikliklere oluşturabilmektedir. Proteinlerin değişikliğe uğraması teorisinde de anlatıldığı üzere oluşabilecek hatalar protein yapısındaki enzimlerde gerçekleşmekte ve böylece enzimlerin fonksiyonlarında, reaksiyonlara ve diğer etkenlere verilen cevaplarda da değişiklik meydana getirebilecektir (Gracy 1985). Bu bilgilerden yola çıkarak hücrelerde artan reaktif oksijen türlerinin, proteinlerin hem yapısal hem de fonksiyonlarında meydana getirebileceği değişiklikler ile metabolik reaksiyonlarda aksaklıklar oluşturarak farklı sağlık problemlerine yol açabilecekleri ve yaşlanmaya neden olabilecekleri kabul edilmektedir. Yine hücrelerde çevresel şartlara bağlı olarak oluşan ya da yaşam boyu hücre fonksiyonlarında meydana gelen azalmaların ortaya çıkan metabolik yollardaki değişiklikler ile somatik hücrelerde görülen mutasyon sayısını arttırdığı somatik mutasyon ve DNA tamir teorisi kapsamında kabul gören bir görüştür. Bu teoride de hücrelerde artan oksidatif stresin hücrel hasarlara yol açtığı bunun sonucu olarak da somatik hücrelerde artan onkojenik mutasyonların birikmesi ile kanserleşme oranının arttığı ifade edilmektedir. Aynı zamanda meydana gelen bu hücrel hasarların DNA tamir mekanizmasına dayandırılan bölümü ise

DNA hasarı tespiti ile hasara verilen cevabı, tamiri ve apoptoz ile hücre siklusunun kontrolü aşamalarında meydana gelen hataların oluşturabileceği değişiklikleri kapsamaktadır (Slijepcevic 2006). Bu teoriye göre diğer çevresel faktörler gibi yapısal ve fonksiyonel olarak hücre içindeki moleküllerde değişikliklere neden olabilecek artan oksidatif stresin DNA’da oluşan hasarların tespitinde ve hasarlara karşı verilecek mekanizma cevabında, hücre siklusu kontrol aşamaları ile p53 etkinliğinin belirlenmesinde ve DNA özel bölgelerinin tamir yeteneğinde azalmalara sebep olabileceği bunun da yaşlanma olgusuyla doğrudan ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Orgel 1963). Meydana gelen/gelebilecek olan bu durumlar yaşlanma/ölüm kavramını açıklamada birbiri ile bağlantılı olan ve beraber değerlendirilmesi gereken olgulardır. Bu olguların her birini çalışmada uygulanan ömür uzunluğu testi sonucunda *D. melanogaster* bireylerinin yaşam sürelerinde görülen kısaltmaların birer nedeni olarak görmekteyiz.

Yine çalışmada kullanılan diğer bir test yöntemi olan SMART sonucunda incelenen ve analizleri yapılan mutant klonların da artan oksidatif stres ile oluşabileceğini düşünmekteyiz. Şöyle ki; somatik hücrelerde meydana gelen hasarların DNA yapısında da değişikliklere neden olabileceği bunun da mutant klonların oluşumunu indüklediği daha önce ifade edilmiştir. SMART testinde gözlenen tek tip klonların DNA’da delesyon, nokta mutasyonu, translokasyon, kromozom kaybı ya da ayrılmaması ile mitotik rekombinasyonlarla, ikiz klonların ise sadece mitotik rekombinasyon ile oluştuğu bilinmektedir. Terpenlere maruz kalan *Drosophila*’nın mutant soylarının kanat yapısındaki klonlarda (hücre grupları) oluşan farklılıkların oksidatif stres sonucu indüklenen somatik mutasyonların fenotipe yansımalarının göstergesidir.

Bu çalışmada, farklı izopren birimlerine sahip olan 5 ayrı terpen kullanılmıştır. Bu terpenlerden timol monotermen, guazilen seskiterpen, abietik asit diterpen, skualen triterpen ve astaksantin tetraterpendir. Besiyerlerine farklı dozlarda ilave edilen ve larvalar tarafından kronik olarak alınan 5 ayrı terpenin *in vivo* toksisitesi ve genotoksisitesi ömür uzunluğu ile somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tüm terpenler, doz-süre etkileşimine bağlı olarak ömür uzunluğunu kısaltmış ve somatik mutasyonu tetiklemiştir. Ayrıca tüm terpenlerde ortak nokta tüm uygulama gruplarında meydana gelen ömür uzunluğundaki kısaltmaların ve somatik mutasyon frekansındaki artışın uygulama dozu ile pozitif korelasyon göstermesidir. Ancak kullanılan terpenlerin hepsinde farklı sayıda bulunan izopren birimlerinin değişkenliğinin (mono, seski, di, tri, tetra) toksisite ve genotoksisite oluşumuyla doğrudan ilişkili olmadığını söyleyebiliriz. Şöyle ki; ömür uzunluğuna ve mutasyon frekansına ait değerler incelendiği zaman *in vivo* ömür uzunluğu testinde bir seskiterpen olan guazilenin, tüm terpenler içinde en toksik etkiye sahip olduğu,

sonra triterpenlerden skualenin ve monoterpenlerden timolün diğerlerine göre daha toksik olduğu görülmüştür. SMART'da ise genotoksik etkinliği en çok olan yine seskiterpen olan guazilen iken burada sıralamayı diterpenlerden abietik asit takip etmektedir. Kullanılan terpenlerin *in vivo* ömür uzunluğu toksisitesine ait dominansi sıralaması guazilen=skualen>timol≥astaksantin≥abietik asit iken *in vivo* SMART'a göre genotoksosite dominansi sıralaması ise guazilen>abietik asit>timol=skualen≥astaksantin şeklinde belirlenmiştir.



KAYNAKLAR

- Adams, N.G. and Richardson, D.M., 1953. Isolation and identification of biphenyls from West Edmond crude oil. *Analytical Chemistry*, 23 (7), 1073-1074.
- Ahmed, J.H. ve Ezer N., 2008. *Prunella* L. türlerinin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28, 93-113.
- Akkuş, T., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 2. Baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 34-54.
- Alanis-Garza, B.A., González-González, G.M., Salazar-Aranda, R., Waksman de Torres, N. and Rivas-Galindo, V.M., 2007. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *Journal Ethnopharmacology*, 114, 468-471.
- Al-Bataina, B.A., Maslat, A.O. and Al-Kofahi, M.M., 2003. Element analysis and biological studies on ten oriental spices using XRF and Ames test. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 17 (2), 85-90.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, MD. and Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463 (2), 111-172.
- Alem, N., 2007. Askorbik Asidin Hücre Yaşlanması Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Allemand, R., Cohet, Y. and David, J., 1973. Increase in the longevity of adult *Drosophila melanogaster* kept in permanent darkness. *Experimental Gerontology*, 8 (5), 279-283.
- Al-Saffar, Z.Y., Grainger, J.N.R. and Aldrich, J., 1996. Temperature and humidity affecting development, survival and weight loss of the pupal stage of *Drosophila melanogaster*, and the influence of alternating temperature on the larvae. *Journal of Thermal Biology*, 21 (5-6), 389-396.
- Altun, D., Uysal, H., Ayar, A. and Aşkın, H., 2011. Removal of the toxic effects of chlormadinon acetate on the development of *Drosophila melanogaster* via the use of nordihydroguaiaretic acid. *Toxicology and Industrial Health*, 27, 29-33.
- Al-Zubairi, A.S., Abdul, A.B. and Syam, M.M., 2010. Evaluation of the genotoxicity of zerumbone in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, 24, 707-712.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90 (17), 7915-7922.
- Amorati, R. and Valgimigli, L., 2012. Modulation of the antioxidant activity of phenols by non-covalent interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10 (21), 4147-4158.
- Araujo, I.B., Souza, C.A.M., De-Carvalho, R.R., Kuriyama, S.N., Rodrigues, R.P., Vollmer, R.S., Alves, E.N. and Paumgarten, F.J.R., 1996. Study of the embryofetotoxicity of α -terpinene in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 34 (5), 477-482.

- Arı, N., Işık, A.C. ve Karasu, Ç., 2008. Yaşlanma ve ileri glikozillenme son ürünleri. Türkiye Klinikleri Kozmetik Dermatoloji- Özel Konular, 1 (2), 9-15.
- Arıca, Ş.Ç., 2017. Yaşlanma ve alglerin anti-gerontolojik etkileri. Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 34 (4), 469-474.
- Arioğul, S., Cankurtaran, M., Halil, M.G. ve Yavuz, B.B., 2006. Geriatri ve Gerontoloji. MN Medikal & Nobel.
- Arif, R., Küpeli E. and Ergün, F., 2004. The biological activity of *Centaurea* L. species. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 17, 149-164.
- Ashburner, M. and Novitski, E., 1976. The Genetics and Biology of *Drosophila*. Volume 1c. Academic Press.
- Ashburner, M., 1989. *Drosophila*: A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Aslan, M. ve Hocaoglu, Ç., 2017. Yaşlanma ve yaşlanma dönemiyle ilişkili psikiyatrik sorunlar. Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7 (1), 53-62.
- Aslan, N., 2005. Kekik Tarımı ve Kullanım Alanları. Lisans Bitirme Tezi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Asplen, M.K., Anfora, G., Biondi, A., Choi, D.S., Véték, G., Vogt, H., Walton, V.M., Yu, Y., Zappalà, L. and Desneux, N., 2015. Invasion biology of spotted wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. Journal of Pest Science, 88, 469-494.
- Ayar, A., Uysal, H. and Altun, D., 2009. The effects of cold shock on the longevity in Oregon R wild *vestigial* mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera:Drosophilidae). Ekoloji, 19 (74), 38-44.
- Ayar, A., Uysal, H. and Altun, Ç.D., 2010. The effects of cold shock on the longevity in Oregon R wild and *vestigial* mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Ekoloji, 19, 38-44.
- Aydın, S., Başaran, A.A. and Başaran, N., 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 581 (1-2), 43-53.
- Azaz, A.D., Satıl, G., Tümen, M., Kürkçüoğlu, M., Demirci, F. ve Başer K.H.C., 2002. Bazı *Satureja* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- Azirak, S. and Rencuzogullari, E., 2008. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. Environmental Toxicology, 23 (6), 728-735.
- Azirak, S., 2007. Thymol ve Carvacrol'un *In Vivo* Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Azqueta, A. and Collins, A.R., 2012. Carotenoids and DNA damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 733 (1-2), 4-13.
- Bağcı, E. ve Koçak A., 2008. *Salvia palaestina* Bentham ve *S. tomentosa* Miller türlerinin uçucu yağ kompozisyonu, kemotaksonomik bir yaklaşım. Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 20, 35-41.
- Bağcı, G. ve Bozcuk, A.N., 1991. Ergin *Drosophila*'nın ömür uzunluğuna sıcaklık ve ışığın etkisi. Journal of Biology, 15, 1-8.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A. and 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.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446– 475.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., De Matos, A.F.I.M., Doleski, P.H., Baldisserotto, B., Da Silva, A.S. and 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.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Grando, T.H., Sagrillo, M.R., De Brum, G.F., Nascimento, K., Peres, D.S., Maciel, M.F., Silveira, S.O. and Da Luz, S.C.A., 2016. Memory deficit, toxic effects and activity of Na⁺, K⁺, ATPase and NTPDase in brain of Wistar rats submitted to orally treatment with alpha-terpinene. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 46, 1-8.
- Barrou, Z., Charru, P. and Lidy, C., 1997. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and aging. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 24 (3), 233-241.
- Başer, K.H.C., Kırimer, N., Koşar, M. ve Tunalier, Z., 2005. *Farmakognozi III. Uygulamaları El Kitabı*, 13-15.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş. ve Alvur, M., 2004. DNA hasarı analizinde μ -fadu ve comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 97-103.
- Berger, R.G., 2007. *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer, Berlin.
- Bernards, A. and Hariharan, I.K., 2001. Of flies and men-studying human disease in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11 (3), 247-278.
- Berneth, H., 2000. Azine Dyes. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Best, R.G. and Mc Kenzie, W.H., 1988. Variable sister-chromatid exchange response in human lymphocytes exposed *in vitro* to gossypol acetic acid. *Mutation Research*, 206, 227-233.
- Bhardwaj, R., Singh, A., Sharma, O.P., Dawra, R.K., Kurade, N.P. and Mahato, S.B., 2001. Hepatotoxicity and cholestasis in rats induced by the sesquiterpene, 9-oxo-10,11-dehydroageraphorone, isolated from *Eupatorium adenophorum*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15, 279-286.
- Billing, J. and Sherman, P.W., 1998. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly Review of Biology*, 73 (1), 3-49.
- Boullata, J.I. and Nace, A.M., 2000. Safety issues with herbal medicine. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 20 (3), 257- 269.
- Bozcuk, A.N., 1970. *Molecular Turnover and Ageing in Drosophila subobscura*. University of Sussex, England.
- Breitmaier, E., 2006. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. John Wiley&Sons.
- Briksin, D.P., 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, 124 (2), 507-514.
- Brito-Arias, M., 2007. *Synthesis and Characterization of Glycosides*. Springer, 352.

- Burkey, J.L., Sauer, J.M., Mc Queen, C.A. and Sipes, I.G., 2000. Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners-A mechanism of activation for methyleugenol. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 453 (1), 25-33.
- Bush, T.M., Rayburn, K.S., Holloway, S.W., Sanchez-Yamamoto, D.S., Allen, B.L., Lam, T., So, B.K., Tran, D.H., Greyher, E.R. and Kantor, S., 2007. Adverse interactions between herbal and dietary substances and prescription medications: A clinical survey. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 13 (2), 30-35.
- Bushnell, P.G., Nikinmaa, M. and Oikari, A., 1985. Metabolic effects of dehydroabietic acid on rainbow trout erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 81 (2), 391-394.
- Büyükleyla, M. and Rencüzoğulları, E., 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (3), 943-947.
- Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33 (2), 179-189.
- Carr, M., Greene, L.M., Knox, A.J.S., Lloyd, D.G., Zisterer, D.M. and Meegan, M.J., 2010. Lead identification of conformationally restricted β -lactam type combretastatin analogues: Synthesis, antiproliferative activity and tubulin targeting effects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (12), 5752-5766.
- Cazarolli, L.H., Zanatta, L., Alberton, E.H., Figueiredo, B., Reis, M.S., Folador, P., Damazio, R.G., Pizzolatti, M.G., Silva, B. and Mena, F.R., 2008. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8 (13), 1429-1440.
- Ceylan, A., 1987. Tıbbi bitkiler II. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 481, 1- 22.
- Chang, H.T., Chou, C.T., Liang, W.Z., Lu, T., Kuo, D.H., Shieh, P., Ho, C.M. and Jan, C.R., 2014. Effects of thymol on Ca^{2+} homeostasis and apoptosis in MDCK renal tubular cells. *Chinese Journal of Physiology*, 57 (2), 90-98.
- Chippindale, A.K., Leroi, A.M., Kim, S.B. and Rose, M.R., 2004. Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction. *Methuselah flies: A case study in the evolution of aging*, World Scientific, 122-144.
- Choy, W.N., 2001. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. CRC Press.
- Clark, A.M. and Rockstein, M., 1964. Aging in Insects. 2nd ed. *The Physiology of Insecta*, Ed: Rockstein, M. Academic Press, Florida, 227-281.
- Clark, R.L., 2009. Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. *Reproductive Toxicology*, 28, 285-296.
- Clarkson, P.M. and Thompson, H.S., 2000. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72 (2), 637-646.
- Coelho, V.R., Giansinia, J., Von Borowskia, R., Mazzardo-Martinsb, L., Martinsb, D.F., Picadaa, J.N., Santosb, A.R.S., Bruma, L.F.S. and Pereira, P., 2011. Acquisition in the object recognition task, inhibitory avoidance test and habituation to a novel environment in rats. *Phytomedicine*, 18, 896-901.
- Connolly, J.D. and Hill, R.A., 1991. Dictionary of Terpenoids, Mono and Sesquiterpenoids. London, 1, 333-337.

- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.
- Cristofalo, V.J., 1991. Overview of biological mechanism of aging. *Special Focus on the Biology of Aging*, Springer, 1-22.
- Cupp, M.J., 2000. *Toxicology and Clinical Pharmacology of Herbal Products*. Springer Science & Business Media.
- Curtis, B.A., 1966. Ca fluxes in single twitch muscle fibers. *The Journal of General Physiology*, 50 (2), 255-267.
- Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5), 343-356.
- Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38 (2), 99-107.
- Cutler, R.G., 1991. Antioxidants and aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53 (1), 373-379.
- Çakır, Ş. ve Sarıkaya, R., 2004. Bazı organik fosforlu insektisitlerin *Drosophila melanogaster*'in yaşama yüzdesi üzerine etkisi. *Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24 (3), 71-80.
- Çalışkan, H., 2019. *Drosophila melanogaster*'de Pgrp-Lf Geninin Otoinflamasyon Bakımından Etkileştiği Diğer Genlerin Genom Çaplı İlişkilendirme Modeliyle Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Çetin, D., 2011. Paklitaksel ve Sisplastin Nörotoksitesinin Sıçan Nöron Kültürlerinde Antioksidan Parametrelerle İlişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Dall'acqua, S., 2013. Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of alzheimer's disease. *Botanics: Targets Therapy*, 3, 19.
- David, J., Van Herrewege, J. and Fouillet, P., 1971. Quantitative under-feeding of *Drosophila*: effects on adult longevity and fecundity. *Experimental Gerontology*, 6 (3), 249-257.
- Davies, K.J. and 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.
- Davis, E.M. and Croteau, R., 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Topics in Current Chemistry*, 209, 53-95.
- De Vincenzi, M., Silano, M., Stacchini, P. and Scazzocchio, B., 2000. Constituents of aromatic plants: I. methyleugeno. *Fitoterapia*, 71 (2), 216-221.
- Demir, B. and Uysal, H., 2017. Effects of Pyrethroids on Aging, XIII. Congress of Ecology and Environment with International Participation. 12 - 15 May, UKECEK, Edirne.
- Desai, N., Sabanegh, J.E., Kim, T. and Agarwal, A., 2010. Free radical theory of aging: implications in male infertility. *Urology*, 75 (1), 14-19.
- Di Costanzo, F., Gasperoni S., Rotella V. and Di Costanzo F., 2009. Targeted delivery of albumin bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer. *OncoTargets and Therapy*, 2, 179-188.
- Di Sotto, A., Evandri, M.G. and Mazzanti, G., 2008. Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 653 (1-2), 130-133.

- Dietrich, L.E.P., Okegbe, C., Price-Whelan, A., Sakhtah, H., Hunter, R.C. and Newman, D.K., 2013. Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. *Journal of Bacteriology*, 195 (7), 1371-1380.
- Ding, K. and Dai, L.X., 2012. *Organic Chemistry: Breakthroughs and Perspectives*. Wiley Online Library, 853.
- Ding, W., Lev, D.D., Bishop, M.E., Lyn- Cook, L.E., Kulkarni, R., Chang, C.W., Aidoo, A. and Manjanatha, M.G., 2011. Methyleugenol genotoxicity in the Fischer 344 rat using the comet assay and pathway- focused gene expression profiling. *Toxicology Science*, 123, 103– 112.
- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z. and Ughy, B., 2013. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research*, 52 (4), 539–61.
- Dorman, HJ., Bachmayer, O., Kosar, M. and 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.
- Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82 (1), 47-95.
- Dudai, N., Larkov, O., Mayer, A.M., Poljakoff-Mayber, A., Putievsky, E. and Lerner, H.R., 2000. Metabolism of essential oils during inhibition of wheat seed germination. *Seed Biology: Advances and Applications. Proceedings of the Sixth International Workshop on Seeds*, Merida, Mexico 315- 320.
- Economos, A.C. and Lints, F.A., 1984. Growth rate and life span in *Drosophila*. I. methods and mechanisms of variation of growth rate. *Mechanisms of Ageing and Development*, 27 (1), 1-13.
- Edwards, J.A., Bellion, P., Beilstein, P., Rumbeli, R. and Schierle, J., 2016. Review of genotoxicity and rat carcinogenicity investigations with astaxanthin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 75, 5-19.
- Edwin, E., Edwin, S. and Amalraj, A., 2006. Antihyperglycemic activity of *Bougainvillea glabra* choisy. *Planta India*, 2, 25-26.
- EFSA/EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition Allergies, 2010. Scientific opinion on the substantiation of health claims related to various food (s)/food constituent (s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 8 (2), 1489.
- Eichorn, S.E. and Evert, R.F., 2016. *Raven Bitki Biyolojisi*. Çeviri Editörü: İsmail Türkan, Palme Yayıncılık.
- Eisen, J.S., Koren, G., Juurlink, D.N. and 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. and 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. ve 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.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339 (1), 37-59.
- Fallarero, A., Skogman, M., Kujala, J., Rajaratnam, M., Moreira, V.M., Yli-Kauhaluoma, J. and Vuorela, P., 2013. (+) Dehydroabietic acid, an abietane-type diterpene, inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (6), 12054-12072.
- Fandohan, P., Gnonlonfin, B., Laleye, A., Gbenou, J.D., Darboux, R. and Moudachirou, M., 2008. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (7), 2493-2497.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. and El-Baroty, G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, 52 (9), 665-667.
- Fernandez, M.A., Tornos, M.P., Garcia, M.D., de las Heras, B., Villar, A.M. and 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.
- Ferrucci, L., 2008. *The Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA): a 50-Year-Long Journey and Plans for the Future*. Oxford University Press.
- Fışkın, K., Kandemir, S., Hamamcı, D., Yeşilada, E. and Bozcuk, A.N., 1994. Age-related changes in catalase, glutathione reductase activities, the amount of glutathione in total body of Oregon and vestigial *Drosophila melanogaster*. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 19, 58-90.
- Fiori, J., Gotti, R., Albini, A. and Cavrini, V., 2008. Study on the photostability of guaiazulene by high- performance liquid chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry:RCM*, 22 (17), 2968-2706.
- Fiori, J., Teti, G., Gotti, R., Mazzotti, G. and 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.
- Fischer, N.H., Jeffrey, D.W., James, L.R., Leovigildo, Q. and Marias, A.M., 1990. Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structureactivity study. *Phytochemistry*, 29 (8), 2479-2483.
- Foley, P.A. and Luckinbill, L.S., 2001. The effects of selection for larval behavior on adult life- history features in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 55 (12), 2493-2502.
- Franzios, G., Mirotsou, M., Hatzia Apostolou, E., Kral, J., Zacharias, G.S. and Mavragani-Tsipidou, P., 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (7), 2690-2694.
- Fred, H.S. and Timothy, B.J., 1997. An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 43 (8), 779-788.
- Freeman, S. and Herron, J.C., 2007. *Evolutionary analysis*. Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Frei, H. and Würgler, 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.

- Frei, H. and Würgler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 11 (4), 315-325.
- Friedman, M., 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (1), 116-134.
- Fuller, B., Smith, D., Howerton, A. and Kern, D., 2006. Anti- inflammatory effects of CoQ10 and colorless carotenoids. *Journal of Cosmetics Dermatology*, 5 (1), 30-38.
- Galeotti, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M. and Lanzotti, V., 2008. Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry Letters*, 1 (1), 44-48.
- Galloway, S.M., Miller, J.E., Armstrong, M.J., Bean, C.L., Skopek, T.R. and Nichols, W.W., 1998. DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 400 (1-2), 169-186.
- Gardner, L., Wakazono, H., Bergin, P., De Waziers, I., Beaune, P., Kenna, J.G., Caldwell, J., 1997. Cytochrome P450 mediated bioactivation of methyleugenol to 1'-hydroxymethyleugenol in Fischer 344 rat and human liver microsomes. *Carcinogenesis*, 18 (9), 1775-1783.
- Gattefosse, R.M., 2012. Gattefosse's Aromatherapy. Random House.
- Gil da Costa, R.M., Oliveira, P.A., Bastos, M.M., Lopes, C.C. and Lopes, C., 2014. Ptaquiloside-induced early-stage urothelial lesions show increased cell proliferation and intact β -catenin and e-cadherin expression. *Environmental Toxicolog*, 29, 763-769.
- Gomes-Carneiro, R., Felzenszwalb, I. and Paumgarten, F.J., 1998. Mutagenicity testing (+) camphor, 1,8 cineole, citral, citronellol, (-) menthol and terpineol with the *Salmonella* microsome assay. *Mutation Research*, 416, 129-136.
- Gonzales, B.M., 1923. Experimental studies on the duration of life. VIII. The influence upon duration of life of certain mutant genes of *Drosophila melanogaster*. *The American Naturalist*, 57 (651), 289-325.
- Goulart, M., Batoreu, M.C., Rodrigues, A.S., Laires, A. and Rueff, J., 2005. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*, 20 (5), 311-315.
- Gowen, J.W. and Johanson, L.E., 1946. On the mechanism of heterosis. I. Metabolic capacity of different races of *Drosophila melanogaster* for egg production. *The American Naturalist*, 89 (788), 149-179.
- Gracy, R.W., 1985. Impaired protein degradation may account for the accumulation of abnormal proteins in aging cells. *Modification of Protein During Aging*, 1-18.
- Graf, U. and Singer, D., 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 8 (1), 15-27.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán-Rincón, J. Würgler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402 (1-2), 203-209.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6 (2), 153-188.

- Graves, J.L. and Mueller, L.D., 1993. Population density effects on longevity. *Genetica*, 91, 99-109.
- Guarrera, M., Turbino, L. and Rebora, A., 2001. The anti-inflammatory activity of azulene. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*, 15, 486-7.
- Gupta, J., Siddique, Y.H., Beg, T., Ara, G. and 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.
- Gurley, B.J., Gardner, S.F. and Hubbard, M.A., 2000. Content versus label claims in ephedra-containing dietary supplements. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 57 (10), 963-969.
- Guzman-Rincon, J. and Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *Environmental Science Research*, 50, 169-182.
- Gülmez, C., 2014. Vitamin B12, Folik Asit, Tiroid Hormonları ve Antioksidan/Oksidan Sistemin Yaşla İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Haller, C.A. and Benowitz, N.L., 2000. Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing ephedra alkaloids. *New England Journal of Medicine*, 343 (25), 1833-1838.
- Hammer, K. A., Carson, C.F. and Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- Hard, G.C. and Whysner, J., 1994. Risk assessment of d-limonene: an example of male rat-specific renal tumorigens. *Critical Reviews in Toxicology*, 24 (3), 231-254.
- Harman, D., 1981. The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78 (11), 7124-7128.
- Harraan, D., 1955. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11 (3), Pages 298-300.
- Haseman, J.K., Tharrington, E.C., Huff, J.E. and Mc Connell, E.E., 1986. Comparison of site-specific and overall tumor incidence analyses for 81 recent National Toxicology Program carcinogenicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 6 (2), 155-170.
- Hassan, A.M., Khalil, W.K.B. and Ahmed, K.A., 2006. Genetic and histopathology studies on mice: effect of fenugreek oil on the efficiency of ovarian and liver tissues. *African Journal of Biotechnology*, 5 (5), 477-483.
- Hayder, N., Abdelwahed, A., Kilani, S., Ammar, R.B., Mahmoud, A., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L., 2004. Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 564 (1), 89-95.
- Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y. and Greider, C.W., 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*, 107 (1), 67-77.
- Hercus, M.J. and Hoffman, A.A., 2000. Maternal and grandmaternal age influence offspring fitness in *Drosophila*. *Proceedings of The Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267 (1457), 2105-2110.
- Hilliard, C.A., Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K. and Galloway, S.M., 1998. Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic

- chemicals and metabolic poisons. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31 (4), 316-326.
- Hirono, I., Ogino, H., Fujimoto, M., Yamada, K., Yoshida, Y., Ikagawa, M. and Okumura, M., 1987. Induction of tumors in ACI rats given a diet containing ptaquiloside, a bracken carcinogen. *Journal of The National Cancer Institute*, 79 (5), 1143-1149.
- Hodge, S., 2001. The effect of pH and water content of natural resources on the development of *Drosophila melanogaster* larvae. *Drosophila Information Service*, 84, 38-43.
- Howes, A.J., Chan, V.S.W. and Caldwell, J., 1990. Structure-specificity of the genotoxicity of some naturally occurring alkenylbenzenes determined by the unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 28 (8), 537-542.
- Huang, Z.R., Lin, Y.K. and Fang, J.Y., 2009. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, 14 (1), 540-54.
- Huffman, J., Gerber, R. and Du, L., 2010. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide- derived mycotoxins. *Biopolymers*, 93 (9), 764-776.
- Hussein, G., Goto, H., Oda, S., Sankawa, U., Matsumoto, K. and Watanabe, H., 2006. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (4), 684-688.
- Iliadi, K.G., Kamyshev, N.G., Popov, A.V., Iliadi, N.N., Rashkovetskaya, E.L., Nevo, E. and Korol, A.B., 2009. Peculiarities of the courtship song in the *Drosophila melanogaster* populations adapted to gradient of microecological conditions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 45 (5), 579.
- İpek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoglu, M. and Baser, K.H.C., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. *Food and Chemistry*, 93, 551-556.
- Jain, A.K. and Andsorbhoy, R.K., 1988. Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding remarks. *Cytologia*, 53: 427-436.
- Janmaat, A.F., Jan de Kogel, W. and Woltering, E.J., 2001. Enhanced fumigant toxicity of p-cymene against *frankliniella occidentalis* by simultaneous application of elevated levels of carbon dioxide. *Pest Management Science*, 58, 167-173.
- Jazwinski, S.M., 1996. Longevity, genes, and aging. *Science*, 273 (5271), 54-59.
- Jena, G.B., Kaul, C.L. and Ramarao, P., 2002. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian Journal of Pharmacology*, 34 (2), 86-99.
- Jordens, R.G., Berry, M.D., Gillott, C. and Boulton, A.A., 1999. Prolongation of life in an experimental model of aging in *Drosophila melanogaster*. *Neurochemical Research*, 24 (2), 227-233.
- Jyonouchi, H., Sun, S., Iijima, K. and Gross, M.D., 2000. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition and Cancer*, 36 (1), 59-65.
- Kamaya, Y., Tokita, N. and Suzuki, K., 2005. Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61 (1), 83-88.

- Karahan, A., 2007. Sideritis Gülendami H. Duman ve F.A Karavelioğlu Bitkisinin Diterpen Bileşiklerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Karasu, Ç., 2008. Biyolojik oksidasyon ve yaşlanma. Türkiye Klinikleri Cosmetic Dermatology, 1 (2), 51-57.
- Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z.G. and Mavragani-Tsipidou P., 1998. Insectisidal and genotoxic activities of *Oregano* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1111-1115.
- Katz, L., 1997. Manipulation of modular polyketide synthases. Chemical Reviews, 97 (7), 2557-2576.
- Keller, J.E.C. and Mitchell, D.F., 1964. Interchromosomal genotypic interactions in *Drosophila*. II. an analysis of viability characters. Genetics, 49 (2), 293.
- Kern, S., Ackermann, M., Stearns, S.C. and Kawecki, T.J., 2001. Decline in offspring viability as a manifestation of aging in *Drosophila melanogaster*. Evolution, 55 (9), 1822-1831.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B. and Lusby, W.R., 2009. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. Pure and Applied Chemistry, 63 (1), 71-80.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A. and Roberts, T.H., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules, 18 (2), 2328-2375.
- Kılınç, A. ve Kılınç, K., 2003. Nitrik Oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme Yayınları.
- Kırbağ, S. ve Bağcı, E., 2000. *Piceae abies* (L.) Karst. ve *Picea orientalis* (L.) link uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma. Journal of Quafqaz University, 3 (1), 183-1882.
- Kırca, A., Özkan, M. and Cemeroğlu, B., 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. Food Chemistry, 97, 598-605.
- Kirkland, D.J. and Müller, L., 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 464 (1), 137-147.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U. and Decordier, I., 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicology Letters, 140, 63-74.
- Kittakoop, P., Mahidol, C. and Ruchirawat, S., 2014. Alkaloids as important scaffolds in therapeutic drugs for the treatments of cancer, tuberculosis, and smoking cessation. Current Topics in Medicinal Chemistry. 14 (2), 239-252.
- Klarsfeld, A. and Rouyer, F., 1998. Effects of circadian mutations and LD periodicity on the life span of *Drosophila melanogaster*. Journal of Biological Rhythms, 13 (6), 471-478.
- Klepacka, J., Gujska, E. Michalak, J., 2011. Phenolic compounds as cultivar-and variety-distinguishing factors in some plant products. Plant Foods for Human Nutrition, 66 (1), 64-69.
- Knight, T.E. and Hausen, B.M., 1994. *Melaleuca oil* (tea tree oil) dermatitis. Journal of the American Academy of Dermatology, 30 (3), 423-427.
- Koci, J., Jeffery, B., Riviere, J.E. and Monteiro- Riviere. N.A., 2015. *In vitro* safety assessment of food ingredients in canine primary renal proximal tubule cells. Toxicology in Vitro, 29, 289– 298.

- Kopáček, P., Weise, C. and Götz, P., 1995. The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25 (10), 1081-1091.
- Korkmaz, B., 2005. Bazı 2-Süstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kounatidis, I., Papoti, V.T., Nenadis, N., Franzios, G., Oikonomou, M., Partheniou, F., Tsimidou, M. and Mavragani-Tsipidou, P., 2009. Evaluation of potential genotoxicity of virgin olive oil (VOO) using the *Drosophila* wing-spot test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (17), 7785-7789.
- Kuruvilla, A., 2002. Herbal Formulations as Pharmacotherapeutic Agents. NISCAIR-CSIR, India.
- Lanciani, C.A., Anderson, J.F. and Giesel, J.T., 1991. Effect of photoperiod on metabolic rate in a subtropical population of *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 100 (2), 347-348.
- Lansing, A.I., 1952. Cowdry's Problems of Ageing: Biological and Medical Aspects. Edited by Albert I. Lansing. 3rd Ed. Baltimore: Williams and Wilkins Company.
- Latt, S.A., 1981. Sister chromatid exchange formation. *Annual Review of Genetics*, 15 (1), 11-53.
- Lazutka, J.R., Mierauskien, J., Slapšyt, G., and Dedonyt, V., 2001. Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 39 (5), 485-492.
- Lee, S.K., Lee, H.J., Min, H.Y., Park, E.J., Lee, K.M., Ahn, Y.H., Cho, Y.J. and Pyee, J.H., 2005. Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia*, 76 (2), 258-260.
- Levan, A., 1938. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, 24, 471– 486.
- Levine, R.L. and Stadtman, E.R., 1996. Protein modifications with aging. *Handbook of the biology of aging*. In: Schneider EL, Rowe JW, editors. *Handbook of the biology of aging*. San Diego (CA): Academic Press, 184-97.
- Lewis, F.M., Shah, M. and Gawkrödger, D.J., 1995. Contact sensitivity to food additives can cause oral and perioral symptoms. *Contact Dermatitis*, 33 (6), 429-430.
- Li, W., Hellsten, A., Jacobsson, L.S., Blomqvist, H.M., Olsson, A.G. and Yuan, X.M., 2004. Alpha-tocopherol and astaxanthin decrease macrophage infiltration, apoptosis and vulnerability in atheroma of hyperlipidaemic rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37 (5), 969-978.
- Lints, F.A. and Lints, C.A., 1969. Influence of preimaginal environment on fecundity and ageing in *Drosophila melanogaster* hybrids I. preimaginal population density. *Experimental Gerontology*, 4 (4), 231-244.
- Lints, F.A., 1971. Life span in *Drosophila*. *Gerontology*, 17 (1), 33-51.
- Liss, S.N., Bicho, P.A. and Saddler, J.N., 1997. Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a mini review. *Canadian Journal of Microbiology*, 43 (7), 599-611.
- Ljubuncic, P. and Reznick, A.Z., 2009. The evolutionary theories of aging revisited—A mini review. *Gerontology*, 55 (2), 205-216.

- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á. and Kamer, A.M., 2015. *In vitro* pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology In Vitro*, 29 (4), 647-656.
- Loh, D.S.Y., Er, H.M. and Chen, Y.S., 2009. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. *Journal of Ethnopharmacology*, 126 (3), 406-414.
- Luo, M., Jiang, L.K., and 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.
- Mac Gregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, B.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R. and Wild, D., 1987. Guide lines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189 (2), 103-112.
- Maharajan, K., Muthulakshmi, S., Nataraj, B., Ramesh, M. and Kadirvelu, K., 2018. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): a multi biomarker study. *Aquatic Toxicology*, 196, 132-145.
- Manner, S., Skogman, M., Goeres, D., Vuorela, P. and 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.
- Manou, I.L., Bouillard, M., Devleeschouwer, J. and Barel, A.O., 1988. Evaluation of the preservation properties of *Thymus vulgaris* essential oil in applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 368-376.
- Maralhas, A., Monteiro, A., Martins, C., Kranendonk, M., Laires, A., Rueff, J. and Rodrigues, A.S., 2006. Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. *Mutagenesis*, 21, 199– 204.
- Marnett, L.J., 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181, 219-222.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I. and Kirsch-Volders, M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88 (11), 1515-1531.
- Matolcsy, G., Nádasy, M. and Andriská, V., 1989. *Pesticide Chemistry*. Elsevier.
- Mattsoff, L. and Nikinmaa, M., 1988. Dehydroabietic acid (DHAA) does not inhibit bilirubin conjugation in the liver of rainbow trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 894-901.
- Mattsoff, L. and Oikari, A., 1987. Acute hyperbilirubinaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) caused by resin acids. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 88 (2), 263-268.
- Maynard-Smith, J., 1966. *Theories of Aging*. Interscience, New York.
- Mc Cann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N., 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 72 (12), 5135-5139.
- Mc Donald, M., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S. Floss, H.G., 2001. Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1, 6-dicarboxylic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 123 (38), 9459-9460.

- Mc Intyre, G.S. and Gooding, R.H., 2000. Effects of maternal age on larval competitiveness in house flies. *Heredity*, 85 (5), 480-489.
- Mc Millan, I., Fitz-Earle, M. and Robson, D.S., 1970. Quantitative genetics of fertility I. Lifetime egg production of *Drosophila melanogaster* theoretical. *Genetics*, 65 (2), 349.
- Min, K.J. and Tatar, M., 2006. *Drosophila* diet restriction in practice: do flies consume fewer nutrients? *Mechanisms of Ageing and Development*, 127 (1), 93-96.
- Minciullo, P.L., Catalano, A., Mandraffino, G., Casciaro, M., Crucitti, A., Maltese, G., Morabito, N., Lasco, A., Gangemi, S. and Basile, G., 2016. Inflammaging and anti-inflammaging: the role of cytokines in extreme longevity. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 64 (2), 111-126.
- Mishra, B.B. and Tiwari, V.K., 2011. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (10), 4769-4807.
- Missirlis, F., Rahlfs, S., Dimopoulos, N., Bauer, H., Becker, K., Hilliker, A. and Phillips, J.P., 2003. A Putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 384 (3), 463-472.
- Mobbs, C.V., 1996. Neuroendocrinology of aging. *Handbook of the Biology of Aging*, 234-282.
- Moon, H.I., Cho, S.B., Lee, J.H., Paik, H.D. and Kim, S.K., 2011. Immunotoxicity activity of sesquiterpenoids from black galingale (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker) against *Aedes aegypti* L. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33, 380-383.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455 (1-2), 29-60.
- Morton, C.A., Garioch, J., Todd, P., Lamey, P.J. and Forsyth, A., 1995. Contact sensitivity to menthol and peppermint in patients with intra- oral symptoms. *Contact Dermatitis*, 32 (5), 281-284.
- Moskovitz, J., Berlett, B.S., Poston, J.M. and Stadtman, E.R., 1997. The yeast peptidomethionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 9585-9589.
- Moss, G.P., Smith, P.A.S. and Tavernier, D., 1997. IUPAC compendium of chemical terminology. *Pure and Applied Chemistry*, 67, 1307-1375.
- Mouhssen, L., 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
- Mouquinho, A., Saavedra, M., Maiau, A., Petrova, K., Barros, M.T., Figueirinhas, J.L. and Sotomayor, J., 2011. Films based on new methacrylate monomers: synthesis, characterisation and electro-optical properties. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 542 (1), 132-140.
- Murakami, S. and Johnson, T.E., 1996. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 143, 1207-1218.
- Muthulakshmi, S., Maharajan, K., Habibi, H.R., Kadirvelu, K. and Venkataramana, M., 2018. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. *Chemosphere*, 198, 111-121.
- Nahrstedt, A. and Davis, R.H., 1983. Occurrence, variation and biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in species of the *Heliconiini* (Insecta:

Lepidoptera). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 75 (1), 65-73.

- Nair, B., 2001. Final report on the safety assessment of *Mentha piperita* (peppermint) oil, *Mentha piperita* (peppermint) leaf extract, *Mentha piperita* (peppermint) leaf, and *Mentha piperita* (peppermint) leaf water. International Journal of Toxicology, 20, 61-73.
- Nalbant, S., 2006. Yaşlanmanın biyolojisi. Türk Fizyoloji Tıp Rehabilitasyon Dergisi, 52, A12-A17.
- Nathalie, D., Yannick, G., Caroline, B., Sandrine, D., Claude, F., Corinne, C. and Pierre-Jacques, F., 2006. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. Toxicology in Vitro, 20 (4), 480-489.
- National Toxicology Program 2010. Toxicology and Carcinogenesis Studies of isoeugenol. National Toxicology Program: Research Triangle Park, NC.
- NCAHF Home Page, NCAHF Position Paper on Overthe Counter Herbal Remedies 1995; www.ncahf.org, 25.04.2009.
- Nieto, G., 2017. Biological activities of three essential oils of Lamiaceae family. Medicines, 4 (3), 63.
- Nogueira, A.C.M.A., Carvalho, R.R., Souza, C.A.M., Chahoud, I. and Paumgarten, F.J., 1995. Study on the embryofeto-toxicity of citral in the rat. Toxicology, 96 (2), 105-113.
- Olaharski, A.J., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonsebatt, M.E., Guzman, P., Mohar, A. and Eastmond, D.A., 2006. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. Carcinogenesis, 27 (2), 337-343.
- Olovnikov, A.M., 1996. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. Experimental Gerontology, 31 (4), 443-448.
- Oomah B.D. and Mazza, G., 1996. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44 (7), 1746-1750.
- Orgel, L.E., 1963. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 49 (4), 517.
- Orr, W.C. and Sohal, R.S., 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. Science, 263 (5110), 1128-1130.
- Ortega, M.T., Jeffery, B., Riviere, J.E. and 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. ve Uysal, H., 2018. Bir çeşit sekonder metabolit olan stigmasterol ömür uzunluğu üzerine ketvurucu olabilir mi? EurasianBioChem 26-27 April, Ankara, Türkiye.
- Osborn, A.E., 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. The Plant Cell, 8 (10), 1821.
- Öksüzokyar, M.M., Eryiğit, S.Ç., Düzen, K.Ö., Mergen, B.E., Sökmen, Ü.N. ve Öğüt, S., 2016. Biyolojik yaşlanma nedenleri ve etkileri. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4 (1), 34-41.

- Pacheco, S.M., Soares, M.S.P., Gutierrez, J.M., Gerzson, M.F.B., Carvalho, F.B., Azambuja, J.H., Schetinger, M.R.C., Stefanello, F.M. and Spanevello, R.M., 2018. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 56, 193-204.
- Pappas, A., 2009. Epidermal surface lipids. *Dermato-Endocrinology*, 1 (2), 72–76.
- Patra, A.K. and Saxena, J., 2009. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, 22 (2), 204-219.
- Pavela, R., 2008. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). *Phytotherapy Research*, 22, 274-278.
- Pavlidou, V., Karpouhtsis, I., Franzios, G., Zambetaki, A., Scouras, Z. and Mavragani-Tsipidou, P., 2004. Insecticidal and genotoxic effects of essential oils of Greek sage, *Salvia fruticosa*, and mint, *Mentha pulegium*, on *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae* (Diptera:Tephritidae). *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 21 (1), 39-49.
- Peng, G. and Roberts, J.C., 2000. Solubility and toxicity of resin acids. *Water Research*, 34 (10), 2779-2785.
- Perumalsamy, H., Jang, M.J., Kim, J.R., Kadarkarai, M. and Ahn, Y.J., 2015. Larvicidal activity and possible mode of action of four flavonoids and two fatty acids identified in *Millettia pinnata* seed toward three mosquito species. *Parasites & Vectors*, 8 (1), 237.
- Phillips, D.H., Reddy, M.V., and Randerath, K., 1984. 32 P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. II. Newborn male B6C3F 1 mice. *Carcinogenesis*, 5 (12), 1623-1628.
- Pierson, L.S. and Pierson, E.A., 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (6), 1659-1670.
- Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolff, S. and Wassom, J.S., 1981. Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: A Report of the US EPA's Gene-Toxicology Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 87 (2), 143-188.
- Prokop, A., 2016. Fruit flies in biological research. *Biological Sciences Review*, 28 (2), 2-5.
- Qiu, J. and Hardin, P.E., 1996. per mRNA cycling is locked to lights-off under photoperiodic conditions that support circadian feedback loop function. *Molecular and Cellular Biology*, 16 (8), 4182-4188.
- Qu, Y.H., Xu, G.X., Zhou, J.Z., Chen, T.D., Zhu, L.F., Shields, P.G., Wang, H.W., and Gao, Y.T., 1992. Genotoxicity of heated cooking oil vapors. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 298 (2), 105-111.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87, 955-979.
- Rabergh, C.M.I., Lilius, H., Eriksson, J.E. and Isomaa, B., 1999. The resin acids dehydroabietic acid and isopimaric acid release calcium from intracellular stores in rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 46 (1), 55-65.

- Rajoshok, G. and 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. and 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.
- Raymond, S.S., Jonathan, S.J. and Watkins-Pitchford, J.M., 2010. The essence of analgesia and analgesics. Cambridge University Press Cambridge.
- Reiter, R.J., 1994. Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 54, 31-39.
- Renkema, J.M., Buitenhuis, R. and Hallett, R.H., 2017. Reduced *Drosophila suzukii* infestation in berries using deterrent compounds and laminate polymer flakes. *Insects*, 8 (4), 117.
- Robbers, J.E., Speedie, M.K. and Tyler, V.E., 1996. Chapter 9: Alkaloids. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (1), 2866-2887.
- Robert, M.F., 2013. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Springer Science & Business Media.
- Rose, M.R., 1999. Genetics of aging in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 34 (5), 577-585.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. and Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91 (4), 621-632.
- Sadock, B.J. and Sadock, V.A., 2006. *Klinik Psikiyatri El Kitabı*. Çev. Editörü: Bozkurt A.
- Samis J.H.V., Erk, F.C. and Baird, M.B., 1971. Senescence in *Drosophila* I. Sex differences in nucleic acid, protein and glycogen levels as a function of age. *Experimental Gerontology*, 6 (1), 9-18.
- Sampson, B.J., Tabanca, N., Kırimer, N., Demirci, B., Başer, K.H.C., Khan, I.A., Spiers, J.M. and Wedge, D. E., 2005. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). *Pest Management Science*, 61, 1122-1128.
- Schaik, VN. and Graf, U., 1991. Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressant in the wing somatic mutation and recombination test in *D. melanogaster*. *Mutation Research*, 260, 99-104.
- Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I. and Milner, J.A., 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 567-579.
- Sekizawa, J. and Shibamoto, T., 1982. Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 101 (2), 127-140.
- Selby, P.B. and Olson, W.H., 1981. Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 83 (3), 403-418.
- Servizi, J.A., Martens, D.W., Gordon, R.W., Kutney, J.P., Singh, M., Dimitriadis, E., Hewitt, G.M., Salisbury, P.J. and Choi, L.S.L., 1986. Microbiological detoxification of resin acids. *Water Quality Research Journal*, 21 (1), 119-129.

- Sestini, E.A., Carlson, J.C. and Allsopp, R., 1991. The effects of ambient temperature on life span, lipid peroxidation, superoxide dismutase, and phospholipase A2 activity in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 26 (4), 385-395.
- Shah, M., Lewis, F.M. and Gawkrödger, D.J., 1996. Contact allergy in patients with oral symptoms: a study of 47 patients. *American Journal of Contact Dermatitis*, 7 (3), 146-151.
- Shahin, M., Smith, B.L., Worran, S., Moore, M.R., Seawright, A.A. and Prakash, A.S., 1998. Bracken fern carcinogenesis: Multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF α levels and mammary gland carcinoma in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244, 192– 197.
- Shapiro, S., Meier, A. and Guggenheim, B., 1994. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components toward oral bacteria. *Molecular Oral Microbiology*, 9, 202-208.
- Sharma, P.R., Mondhe, D.M., Muthiah, S., Pal, H.C., Shahi, A.K., Saxena, A.K. and Qazi, G.N., 2009. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chemico-Biological Interactions*, 179, 160– 168.
- Sheeba, V., Sharma, V.K., Shubha, K., Chandrashekar, M.K. and Joshi, A., 2000. The effect of different light regimes on adult lifespan in *Drosophila melanogaster* is partly mediated through reproductive output. *Journal of Biological Rhythms*, 15 (5), 380-392.
- Silva, N.C.C. and Fernandes, J.A., 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16 (3), 402-413.
- Sinclair, B.J. and Roberts, S.P., 2005. Acclimation, shock and hardening in the cold. *Journal of Thermal Biology*, 30 (8), 557-562.
- Sinha, S., Jothiramajayam, M., Ghosh, M. and Mukherjee, A., 2014. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food Chemical Toxicology*, 68, 71– 77.
- Slamenova, D., Horváthová, E., Wsólóvá, L., Sramková, M. and 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.
- Sleha, R., Mosio, P., Vydrzalova, M., Jantovska, A., Bostikova, V. and Mazurova, J., 2014. *In vitro* antimicrobial activities of cinnamon bark oil, anethole, carvacrol, eugenol and guaiazulene against *Mycoplasma hominis* clinical isolates. *Biomedical Papers of the Medical Faculty University Palacky, Olomouc Czechoslovakia Republic*, 158 (2), 208–11.
- Slijepcevic, P., 2006. The role of DNA damage response proteins at telomeres an “integrative” model. *DNA Repair*, 5 (11), 1299-1306.
- Sorensen, J.G. and Loeschcke, V., 2002. Decreased heat shock resistance and downregulation of hsp70 expression with increasing age in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, 16, 379-384.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Sekonder metabolit üretimi. *Bitki Biyoteknolojisi*, 1, 211-261.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.L. and Wright, A., 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 813-823.

- Stara, A., Kristan, J., Zuskova, E. and Velisek, J., 2013. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105 (1), 18-23.
- Street, R.A., Stirk, W.A. and Van Staden, J., 2008. South African traditional medicinal plant trade challenges in regulating quality, safety and efficacy. *Journal of Ethnopharmacology*, 119 (3), 705-710.
- Struwe, M., Csato, M., Singer, T. and 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.
- Sugiura, M., Hayakawa, R., Kato, Y., Sugiura, K. and Hashimoto, R., 2000. Results of patch testing with lavender oil in Japan. *Contact Dermatitis*, 43 (3), 157-160.
- Sumner, J., 2000. *The Natural History of Medicinal Plants*. Timber press.
- Sun, H.X., Xie, Y. and Ye, Y.P., 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27 (12), 1787-1796.
- Suzuki, Y., Nakamura, S., Sugiyama, K. and Furuta, H., 1987. Differences of superoxide production in blood leukocytes stimulated with thymol between human and non-human primates. *Life Sciences*, 41 (13), 1659-1664.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. and Hejia, G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mozaik and the sex-linked recessive letal test. *Mutation Research*, 113, 117-133.
- Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu, V., 2011. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4 (3), 221-229.
- Tapsell, L.C., Hemphill, L., Cobiac, L., Sullivan, D.R., Fenech, M., Patch, C.S., Roodenrys, S., Keogh, J.B., Clifton, P.M. and Williams, P.G., 2006. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Medical Journal of Australia*, 185 (4), 1-24.
- Tatar, M. and Promislow, D.E.L., 1997. Fitness costs of female reproduction. *Evolution*, 51 (4), 1323-1326.
- Theis, N. and Lerchau, M., 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164 (3), 93-102.
- Togar, B., Çelik, K. and 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. And Geyikoglu, F., 2015b. Guaiazulene biochemical activity and cytotoxic and genotoxic effects on rat neuron and N2a neuroblastom cells. *Jornal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4 (1), 29-33.
- Tosato, M., Zamboni, V., Ferrini, A. and Cesari, M., 2007. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clinical Interventions in Aging*, 2 (3), 401.
- Tosun, A. and Özkal, N., 2000. Chemical constituents and biological activities of *Helianthus* Species. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 29, 49-74.
- Tosun, A. and Özkal, N., 2003. Chemical constituents and biological activities of *Seseli* L. (Umbelliferae) species. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32, 269- 284.
- Troen, B.R., 2003. The biology of aging. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 70 (1), 3-22.

- Turgay, K., Krause, M. and Marahiel, M.A., 1992. Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate- forming enzymes. *Molecular Microbiology*, 6 (4), 529-546.
- Turner, J.M. and Messenger, A.J., 1986. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Advances in Microbial Physiology*, 27, 211-275.
- Tümen, İ. ve Hafızoğlu, H., 2003. Türkiye’de yetişen ardıç (*Juniperus* L.) türlerinin kozalak ve yaprak uçucu yağlarının bileşiminde bulunan terpen grupları. *Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 5 (5), 78-87.
- Umay, A., 2007. *Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Urso, M.L. and Clarkson, P.M., 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, *Toxicology*, 189, 41-54.
- Uysal, H., Açar, G., Atıcı, Ö. and Dumlupınar, R., 2000. The effect of plant growth regulators on the soluble proteins content of *Drosophila melanogaster*. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Biological Sciences*, 48, 287-292.
- Uysal, H., Şişman, T. ve Aşkın, H. 2006. *Drosophila* Biyolojisi ve Çaprazlama Yöntemleri. Erzurum, Türkiye, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 53 pp. ISBN:975-442-111-0.
- Uysal, H., Altun, D., Aşkın, H. And Aslan, A., 2009. Effects of water extract of *Usnea longissima* Ach. on the longevity of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 18 (5a). 699-703.
- Uysal, H., Semerdöken, S., Çolak D.A. and Ayar, A., 2015. The hazardous effects of three natural food dyes on developmental stages and longevity of *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Industrial Health*, 31, 624-629.
- Uysal, H. and 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.
- Ünlü, H. and Bozcuk, A.N., 1979. Genetics of longevity in *Drosophila* I: The effects of w, m and f mutant genes in various genotype combinations. *Experimental Gerontology*, 14, 117-124.
- Valerio, L.G. and Gonzales, G.F., 2005. Toxicological aspects of the South American herbs cat’s claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicological Reviews*, 24 (1), 11-35.
- Valnet, J., 2012. *The Practice of Aromatherapy*. Random House.
- Van Breemen, R.B., Fong, H.H.S. and Farnsworth, N.R., 2008. Ensuring the safety of botanical dietary supplements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87 (2), 509-513.
- Verpoorte, R., Van der Heijden, R., Ten Hoopen, H.J.G. and Memelink, J., 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21 (6), 467-479.
- Vijg, J., 2000. Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 447 (1), 117-135.
- Vinholes, J., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M.A. and Rocha, S.M., 2014. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in *in vitro* Caco-2 cell models. *Food Chemistry*, 156, 204-211.

- Vogel, E.W., 1992. Tests for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 284 (1), 159-175.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73 (381), 504-520.
- Wakabayashi, H., Hashiba, K., Yokoyama, K., Hashimoto, K., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Kurihara, T., Satoh, K., Shioda, S. and Saito, S., 2003. Cytotoxic activity of azulenes against human oral tumor cell lines. Anticancer Research, 23 (6C), 4747-4755.
- Walford, J., 1980. Historical development of food coloration. Developments in Food Colours, 1, 1-25.
- Wallace, D.C., 1992. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? Science, 256 (5057), 628-632.
- Walton, J.D., 2006. HC-toxin. Phytochemistry, 67 (14), 1406-1413.
- Wang, L., Yan, J., Fu, P., Parekh, K. and Yu, H., 2003. Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene and guaiazulene. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 530, 19-26.
- Whysner, J. and Williams, G.M., 1996. d-Limonene mechanistic data and risk assessment: Absolute species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferation and tumor promotion. Pharmacology & Therapeutics, 71 (1-2), 127-136.
- Williams, G.C., 1957. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. Evolution, 11 (4), 98-411.
- Williams, G.M., 1989. Methods for evaluating chemical genotoxicity. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 29 (1), 189-211.
- Würgler, F.E. and Vogel, E.W., 1986. *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Chemical Mutagens: Principle and Methods for Their Detection, Ed: Serres, F.J. Plenum Press, New York, 1-72.
- Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B., 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. The Journal of Clinical Investigation, 107 (2), 135-142.
- Yeşilada, E. ve Bozcuk, A.N., 1991. *Drosophila melanogaster* (Oregon ve Malatya soyları) ile *D. erecta* ve *D. virilis*'in çeşitli gelişimsel özellikler açısından karşılaştırılması. Turkish Journal of Biology, 15, 114-123.
- Yılmaz, M., Özsoy, E.D. and Bozcuk, A.N., 2008. Maternal age effects on longevity in *Drosophila melanogaster* populations of different origin. Biogerontology, 9 (3), 163-168.
- Yonemura, I., Motoyama, T., Hasekura, H. and Boettcher, B., 1991. Relationship between genotypes of longevity genes and developmental speed in *Drosophila melanogaster*. Heredity, 66 (1), 143-149.
- Young, R.R., 2002. Genetic toxicology: web resources. Toxicology, 173 (1-2), 103-121.
- Yu, B.P., 1999. Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties. Mechanisms of Ageing and Development, 111 (2-3), 73-87.
- Zainal, T.A., Oberley, T.D., Allison, D.B., Szweda, L.I. and Weindruch, R., 2000. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. The FASEB Journal, 14 (12), 1825-1836.

- Zarrini, G., Bahari-Delgosha, Z., Mollazadeh-Moghaddam, K. and Shahverdi, A.R., 2010. Post-antibacterial effect of thymol. *Journal Pharmaceutical Biology*, 48 (6), 633-636.
- Zeiger, E., 1998. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28 (2), 85-95.
- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44 (5), 363-371.
- Zou, S., Meadows, S., Sharp, L., Jan, L.Y. and Jan, Y.N., 2000. Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (25), 13726-13731.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Hatice Çelik
Doğum tarihi:	10 Mayıs 1994
Doğum Yeri:	Erzurum
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Tel:	0543 280 19 41
E-mail:	htcclk6568@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Selimpaşa Atatürk Anadolu Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi