

**DOĞUANADOLU TIBBİ BİTKİLERİNE AİT BAZI
TÜRLERİN AMES/SALMONELLA MİKROZOM TESTİ
KULLANILARAK ANTİMUTAJENİK
ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI**

TÜLİN ÖZBEK

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE
2006
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOĞUANADOLU TIBBİ BİTKİLERİNE AİT BAZI TÜRLERİN
AMES/SALMONELLA MİKROZOM TESTİ KULLANILARAK
ANTİMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI**

TÜLİN ÖZBEK

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2006

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOĞUANADOLU TIBBİ BİTKİLERİNE AİT BAZI TÜRLERİN AMES/SALMONELLA MİKROZOM TESTİ KULLANILARAK ANTİMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI

Tülin ÖZBEK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada AMES/*Salmonella*- mikrozom test sistemi kullanılarak Doğu Anadolu Bölgesinde yetişen ve tıbbi öneme sahip *Origanum vulgare*, *Artemisia absinthium*, *Achillea millefolium*, *Helychrysum pilicatum*, *Salvia nemerosa*; *Salvia verticillata* *Nepeta racemosa* ve *Salvia limbata* bitki türlerinin antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklerinin varlığı araştırılmıştır.

O.vulgare, *A.absinthium*, *A.millefolium*, *H.pilicatum* ve *S.nemerosa*; *Salmonella typhimurium* TA 1535 suşunda doza bağlı olarak belli ölçülerde antimutajenik aktivite gösterirken, *Salmonella typhimurium* TA 1538 suşunda sadece *S.verticillata* ve *H.pilicatum* bitki ekstraktları yine doza bağlı olarak antimutajenik aktivite göstermiştir. Çalışılan *N. racemosa* ve *S.limbata* bitki ekstraktları ise her iki bakteri suşunda ve uygulanan her üç dozda da antimutajenik aktiviteye rastlanmamıştır.

2006, 71 Sayfa

Anahtar Kelimeler: AMES, *Salmonella*/mikrozom test sistemi, tıbbi bitkiler, antimutajenite

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION THE ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES OF SOME SPECIES OF MEDICINAL PLANTS GROWN IN EAST ANATOLIA USING AMES/*SALMONELLA*-MIKROSOME TEST SYSTEM

Tülin ÖZBEK

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assos. Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In this study, using Ames/*Salmonella*-microsome test system, *Origanum vulgare*, *Artemisia absinthium*, *Achillea millefolium*, *Helychrysum pilicatum*, *Salvia nemerosa*; *Salvia verticillata* *Nepeta racemosa* ve *Salvia limbata* plants species that growth in East Anatolia Reagion and have importance medicine have been evaluated whether have the antimutagenic and anticarcinogenic activities or not.

While *O. vulgare*, *A. absinthium*, *A. millefolium*, *H. pilicatum* ve *S. nemerosa*; was showed the antimutagenic activities at certain measurement as related to dose-response in *Salmonella typhimurium* TA 1535 strain, only *S. verticillata* and *H. pilicatum* plant extracts was showed the antimutagenic activities as related to dose-response. Not antimutagenic activities was demonstrated *N. racemosa* and *S. limbata* plant extracts by using each three dose and each bacteria strain.

2006, 71 Pages

Keywords: AMES, *Salmonella*/mikrozom test system, medicinal plants, antimutagenite

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde büyük emeği geen, her aşamasında ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen, Sayın hocam Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye, Sayın Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e, Yrd. Doç. Dr. Güleray AĞAR, Biyoloji Bölüm Başkanım Sayın Prof. Dr. Ö. Faruk ALGUR'a ve çalışmalarım sırasında her konuda yardımcı olan Sayın Arş. Gör. Özlem BARIŞ'a ve Sayın Fatih DADAŐOĐLU'na, bu araştırmayı proje (BAP 2004/166) dahilinde destekleyen Atatürk Üniversitesi Fon Saymanlığına teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım süresince; destek, teőfik ve yardımlarını esirgemeyen aileme özellikle babama ve anneme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Tülin ÖZBEK

Temmuz 2006

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| KISALTMALAR DİZİNİ..... | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER..... | 5 |
| 2.1. Tıbbi Bitkiler..... | 5 |
| 2.1.1. Tıbbi bitkilerin tarihçesi ve önemi | 5 |
| 2.1.2. Çalışılan Tıbbi Bitkiler ve Biyolojik Aktiviteleri | 8 |
| 2.2. Mutasyonlar ve Mutajenik Ajanlar | 11 |
| 2.2.1. Mutasyonlar | 11 |
| 2.2.2. Mutajenik ajanlar | 14 |
| 2.2.2.a. Kimyasal mutajenler..... | 14 |
| 2.2.2.b. Fiziksel mutajenler..... | 18 |
| 2.2.3. Deneysel mutasyonlar | 19 |
| 2.3. Antimutajenite ve Tıbbi Bitkilerin İçerdiği Önemli Antimutajenik Bileşikler | 21 |
| 2.3.1. Polifenoller..... | 22 |
| 2.3.2. Flavonoidler | 22 |
| 2.3.3. α -Tokoferol..... | 23 |
| 2.3.4. Askorbik asit | 24 |
| 2.3.5. Karotenoidler | 24 |
| 2.4. Kısa Zamanlı Antimutajenite Test Sistemleri..... | 25 |
| 2.4.1. <i>Salmonella</i> - mikrozom antimutajenite test sistemi | 27 |
| 2.4.1.a. Histidin gereksinimi | 28 |
| 2.4.1.b. rfa mutasyonu..... | 31 |
| 2.4.1.c. uvrB mutasyonu | 32 |

| | |
|---|----|
| 2.4.1.d.R faktörü | 32 |
| 2.4.1.e. S9 fraksiyonu..... | 35 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | |
| 3.1. Materyal | 36 |
| 3.1.1. Antimutajenite potansiyeli araştırılan bitki ekstraktları..... | 36 |
| 3.1.1.a. Bitkilerin toplanması ve adlandırılması | 36 |
| 3.1.1.b. Bitkilerin kurutulması ve sekonder metabolitlerin eldesi | 38 |
| 3.1.2. Kullanılan test suşları..... | 38 |
| 3.1.3. Pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler | 38 |
| 3.1.4. Çalışmalarda kullanılan aletler..... | 39 |
| 3.1.5. Stok çözeltiler ve besi ortamları..... | 40 |
| 3.2. Yöntem..... | 44 |
| 3.2.1. <i>Salmonella</i> /mikrozom test sisteminde kullanılan suşların genetik özelliklerinin kontrolü..... | 44 |
| 3.2.1.a. Histidin gereksinimi | 44 |
| 3.2.1.b. rfa mutasyonun kontrolü | 45 |
| 3.2.1.c. uvrB mutasyonunun kontrolü..... | 45 |
| 3.2.1.d. Kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü..... | 45 |
| 3.2.1.e.Mutajenlerin sitotoksitelerinin araştırılması..... | 46 |
| 3.2.1.f. Test suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerin hazırlanması | 47 |
| 3.2.2. Antimutajenite testi (AMES/ <i>Salmonella</i> mikrozom testi) | 47 |
| 3.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi | 48 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI | 49 |
| 4.1. Test bakterilerinin genotiplerinin kontrolü | 49 |
| 4.1.1. Histidin mutasyonun kontrolü..... | 49 |
| 4.1.2. rfa mutasyonun kontrolü | 50 |
| 4.1.3. uvrB mutasyonun kontrolü..... | 50 |
| 4.1.4. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı kontrolü..... | 51 |
| 4.2. Mutajenlerin sitotoksitelerinin belirlenmesi | 51 |
| 4.3. Çalışılan bitkilerin antimutajenik özelliklerinin belirlenmesi..... | 51 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 61 |

| | |
|-----------------|----|
| KAYNAKLAR | 66 |
| ÖZGEÇMİŞ | 72 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|----------------------|---|
| 2AP | 2 aminopürin |
| 2AF | 2-asetilaminofluoren |
| 2-NF | 2-nitrofluoren |
| 4NQO | 4-nitro-1-quinoline oksit |
| 50×VB tuzları | Vogel-bonner medyum E |
| A | Adenin bazı |
| B[a]P | Benzo amino pirin |
| C | Sitozin bazı |
| CO ₂ | Karbondioksit |
| DMSO | Dimetilsülfooksit |
| EMS | Etimetanosülfonat |
| G | Guanin bazı |
| HNO ₂ | Nitröz asit |
| MAB | N-metil-4-aminbenzen |
| MMC | Mitomisin C |
| MMS | Metilmetanosülfonat |
| MNNG | <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoquanidin |
| NA, NaN ₃ | Sodyum azid |
| NG | Nitroguanidin |
| PAH | Polisiklik aromatik hidrokarbonlar |
| RNA | Ribonükleik asit |
| ROS | Reaktif oksijen türleri |
| SCE | Kardeş kromatid değişimi |
| T | Timin bazı |
| U | Urasil bazı |
| UV | Ultraviyole |
| WHO | The World Health Organization |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. DNA üzerinde mutasyonların ve mutajenik ajanların gösterilmesi..... | 20 |
| Şekil 2.2. Histidin oluşumu..... | 28 |
| Şekil 2.3. Kimyasal olarak histidin oluşumu | 29 |
| Şekil 2.4. Histidin G46 mutasyonu | 30 |
| Şekil 2.5. Histidin D3052 mutasyonu | 30 |
| Şekil 2.6. Histidin G428 mutasyonu | 31 |
| Şekil 4.1. <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 ve TA1538 suşunda histidin gereksiniminin gösterilmesi | 49 |
| Şekil 4.2. <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 ve TA1538 suşunda rfa mutasyonunun gösterilmesi..... | 50 |
| Şekil 4.3. <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 ve TA1538 suşunun ultraviyole duyarlılık testi | 50 |
| Şekil 4.4. <i>Origanum vulgare</i> 'nin <i>S.typhimurium</i> TA1535-1538 suşları üzerine etkisi | 56 |
| Şekil 4.5. <i>Helycrysium pilicatum</i> 'un <i>S.typhimurium</i> TA1535-1538 suşları üzerine etkisi | 56 |
| Şekil 4.6. <i>Artemisia absinthium</i> 'un <i>S.typhimurium</i> TA1535-1538 suşları üzerine etkisi | 57 |
| Şekil 4.7. <i>Salvia verticillata</i> 'nın <i>S.typhimurium</i> 1538 suşu üzerine etkisi..... | 57 |
| Şekil 4.8. <i>Salvia nemerosa</i> 'nın <i>S.typhimurium</i> 1535 suşu üzerine etkisi | 58 |
| Şekil 4.9. <i>Achillea millenfolium</i> 'un <i>S.typhimurium</i> 1535 suşu üzerine etkisi..... | 58 |
| Şekil 4.10. <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 ile denenen bitki ekstraktların standart plate inkorporasyon test sonuçları histogramı..... | 59 |
| Şekil 4.11. <i>Salmonella typhimurium</i> TA1538 ile denenen bitki ekstraktların standart plate inkorporasyon test sonuçları histogramı..... | 59 |
| Şekil 4.12. <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 ile denenen bitki ekstraktların standart plate inkorporasyon test sonuçları histogramı..... | 60 |
| Şekil 4.13. <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 ile denenen bitki ekstraktların standart plate inkorporasyon test sonuçları histogramı..... | 60 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 2.1. Mutajenitenin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar..... | 26 |
| Çizelge 2.2. <i>Salmonella</i> / mikrozom test sisteminde yaygın olarak kullanılan test strainlerinin genotipleri..... | 34 |
| Çizelge 4.1. Mutant suşların kendiliğinden geri dönen koloni sayısı..... | 51 |
| Çizelge 4.2. <i>S. typhimurium</i> TA1535-TA1538 suşlarının <i>O. vulgare</i> , <i>H. pilicatum</i> <i>N.racemosa</i> , <i>A.absinthium</i> bitki ekstraktları ile AMES/ <i>Salmonella</i> - mikrozom testinden elde edilen sonuçlar..... | 54 |
| Çizelge 4.3. <i>S. typhimurium</i> TA1535-TA1538 suşlarının <i>S.verticillata</i> , <i>S.limbata</i> , <i>S.nemerosa</i> ve <i>A. millenfolium</i> bitki ekstraktları ile AMES/ <i>Salmonella</i> - mikrozom testinden elde edilen sonuçlar..... | 55 |

1. GİRİŞ

Bitkiler hem geleneksel ilaçlar hem de endüstrileşmiş ürünler olarak tıpta yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Rovado *et al.* 2004). Kanseri de içine alan çeşitli hastalıkların gelişmesine karşı bitkisel metabolitlerin koruyucu olabileceğini gösteren *in vivo* ve *in vitro* deneysel araştırmalardan ve epidemiyolojiden elde edilen kanıtlar; bu metabolitler üzerine antimitojenik ve antitümör çalışmaları büyük ölçüde artmasını sağlamıştır (Abdullaev *et al.* 2003). Antimitojenik veya antikanserijenlerin kanser etyolojisiyle ilgili olan faktörlerle mücadelede aktif rol oynadıkları bilinmektedir (Karker *et al.* 2000). Bununla birlikte antimitojenik ve antikanserijenik özelliğe sahip kimyasal bileşikler araştırmak ve keşfetmek; günümüzde insanlarda kanser riski ve mutasyon oranlarındaki artışın beraberinde getirdiği istenmeyen sonuçlar nedeniyle de zorunlu hale gelmiştir (Hartman and Shankel 1990). Tümörögenезisin moleküler mekanizmasını araştırmak ve tümör gelişimini engellemede biyomedikal olabilecek yararların saptanmasına pratik bir yaklaşım sunabilmek de, bu araştırmaları kaçınılmaz kılmıştır (Abdullaev *et al.* 2003).

Beslenme alışkanlıkları insan sağlığı için son derece önemlidir. Günlük alınan vitamin ve mineral içerikli besin maddeleri (askorbik asit, tokoferoller, isoflavonlar, flavonoidler, polifenolik bileşikler); DNA sentezi, DNA tamiri, metilasyon, apoptozis gibi birçok DNA metabolizmasını içine alan DNA stabilitesi bakımından son derece önemlidir (Fenech 2001). Endojen savunma mekanizmalarının yanı sıra alınan bu besinlerin antioksidant aktiviteleri ROS (serbest radikal reaksiyonu)'a karşı korunmada hayati bir rol oynar.

Flavonların insan kolon kanser hücrelerinde hücre bölünmesini yavaşlattığı ve apoptozisi indüklediği bulunmuştur. Bu hücrelerde flavon etkisi nükleer transkripsiyon faktörü, apoptozisle ilgili genler ve hücre döngüsünün mRNA seviyesindeki değişiklikleriyle bağlantılıdır (Wenzel *et al.* 2004).

Kanser tedavisinde flavonoidlerin yararlı etkileri ROS indirgeme ve süpürücü özelliğini içeren antioksidant olarak davranabilme kapasiteleriyle bağlantılıdır (Galati and Brien 2004). *Hypericum perforatum*'un çiçek ve yapraklarından elde edilen ekstraktın, quercetin ve hyperoside gibi birkaç flavonoid ihtiva etmesinden dolayı serbest radikal süpürücü özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Ivanova *et al.* 2005).

Özellikle üzümde bulunan ve doğal bir polifenol olan resveratrol (3, 4',5-trihydroxystilbene); anti-inflamatuar ve antitümör aktivitelerini içine alan oldukça geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu bileşik koroner kalp hastalığına karşı koruyucu özelliğe sahip olmakla birlikte kanserleşme olgusunda başlangıç, gelişme ve yayılım safhalarının tümünde pleiotropik biyolojik düzenleyici olarak da görev alır (Fremont 2000). Olas and Wachowicz (2001), aktive edilmiş trombositlerde singlet oksijen, hidrojen peroksit ve süperoksit radikal gibi farklı reaktif oksijen türlerinin oluşumu üzerine inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Nar suyu içindeki polifenoller (ellagitannin, ellagic acid, punicalagin) üzerine yapılan bir çalışmada insanlarda çeşitli kanserler üzerinde antiproliferatif etkiye sahip oldukları, apoptotik etki gösterdikleri, lipid peroksidasyonunu inhibe ettikleri tespit edilmiştir (Sreeram *et al.* 2005). Yine ahududu bitkisinden elde edilen polifenollerin %88'lik oranını oluşturan ellagic acid bileşiğinin yüksek antiradikal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Antikarsinojenik ve antioksidant aktiviteleri üzerine çok sayıda kanıt bulunması nedeniyle özellikle meyveler de bulunan ellagic acid ve gallic acid bileşikleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Ancos *et al.* 2000).

Vitamin E'nin bazı formlarının (succinate, tocotrienol) insan kanser hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu ve yine bazılarında normal insan hücrelerinde değil de kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir. Vitamin E'nin biyolojik membranları stabilize ettiği ve hücrel membranlarda polyunsaturated yağ asitlerinin peroksidasyonunu bloke eden bir antioksidant olduğu bilinmektedir (Cameron *et al.* 2003). β -karotenin ise dişi Swiss albino farelerine oral olarak

verildiğinde deride karsinogenesisi indükleyen B[a]P üzerine engelleyici etkisi olduğu bulunmuştur (Lee and Park 2003).

Bitkisel metabolitlerin antimutajenik aktivitelerinin belirlenmesinde, deney hayvanları kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalar uzun süre ve yüksek maliyet nedeniyle başlangıç aşamasında tercih edilen test sistemleri değildir (Iarc 1980).

Bu nedenle araştırmacılar, antikarsinojenite taramalarına esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans and Ziger 2000). AMES-*Salmonella*/mikrozom test sistemi kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinden biri olup antimutajen/antikarsinojenlerin veya tersine mutajen/karsinojenlerin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan önemli bir tekniktir (Abdullaev *et al.* 2003).

Yeşil çay polifenollerinin (catechin, epicatechin, catechin gallate, epigallocatechin gallate) antimutajenik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla AMES/*Salmonella*-mikrozom tekniği kullanılmış, bunların tütünle indüklenmiş mutajeniteyi inhibe ettiği bulunmuştur (Santhosh *et al.* 2005)

Elma polifenol ekstraktının AMES tekniği kullanılarak yapılan mutajenite taramasında *S. typhimurium* TA98 suşunda geri dönen koloni sayısında çok az sayıda bir artış meydana getirirken diğer suşlarda herhangi bir artış meydana getirmediği tespit edilmiştir (Shoji *et al.* 2004).

Kakao bitkisinden elde edilen liquor taninler ve polifenollerin heterosiklik aminlerle indüklenmiş mutasyon insidansını *S. typhimurium* TA98 suşunda büyük ölçüde indirmediği gözlenmiştir. Aynı bitkiden elde edilen quercetin ise zayıf etki göstermiştir. Fakat aynı ortama S9 metabolik fraksiyonu ilave edildiğinde quercetin, heterosiklik aminlerin etkisini önemli ölçüde baskılamıştır (Yamagishi *et al.* 2000).

Capsicum (kırmızı biber)'de ilk kez tesbit edilen capsaicin karotenoidi de; B[a]P mutajenik maddesinde içinde bulunduğu karsinojenik polisiklik aromatik hidrokarbonların metabolizması için gerekli olan alkil hidroksilazı inhibe etmektedir. İlaveten, mikrozomal sitokrom P450 enzimlerinin modülasyonunu sağladığı da tespit edilmiştir (Lee and Park 2003).

Bu çalışmada; yukarıda adı geçen metabolitler bakımından zengin olan ve Doğu- Batı arasında coğrafi bir köprü konumunda olan Doğu Anadolu Bölgesinde, geleneksel olarak, halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılan, *Artemisia absinthium*, *Achillea millefolium*, *Helychrysum pilicatum*, *Nepeta racemosa* *Origanum vulgare*, *Salvia limbata*, *Salvia nemerosa* ve *Salvia verticillata* tıbbi bitkilerinden elde edilen özütlerin, sodyum azid ve 4-nitro quinoline-1-oksit mutajenlerine karşı antimutajenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bire bir olmamakla beraber , *O. vulgare* hariç diğer bitkilerin antimutajenik aktiviteleri ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmadığından adı geçen bitki türlerinin AMES/*Salmonella* mikrozom testi ile antimutajenik etkilerinin değerlendirilmesi orijinal bir araştırma konusu olarak görülebilir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Tıbbi Bitkiler

2.1.1. Tıbbi bitkilerin tarihçesi ve önemi

Hastalık etmenlerinin, insanlardan önce, yeryüzünde bulunduğu çok eski devirlere ait kemikler, fosiller v.b. kalıntılardan anlaşılmaktadır. İlk insandan itibaren hastalık etmenlerine karşı korunma çareleri aranmaya başlanmıştır. Erişilebilen ilk yazılı kaynaklar da, insanların çeşitli hastalıkların tedavisi için bitkilerden yararlandıklarını ortaya koymaktadır. Bu kullanım biçimi etken madde olan doğal ürününden çok, bitkinin kendisine veya değişik yollarla elde edilen özütlerine dayanmaktadır.

Tıbbi bitkiler hakkındaki en eski kitabın Çin Hükümdarı SHIN-NONG tarafından M.Ö. 3700 yıllarında yazıldığı belirtilmektedir. HIPPOCRAT'ın yaşadığı devirde Yunanlılar da tıp ve tedavi alanlarında oldukça ilerlemiş ve birçok bitkiyi drog yapımında kullanmışlardır.

İlk olarak ARİSTOTELES bitkiler alemi ile etraflı bir şekilde uğraşmış ve ana eseri olan "Bitkinin Teorisi" adlı kitabını yazmıştır. Aristo'nun öğrencisi olan Meşhur botanikçi THEOPHRAST, özellikle farmakognozi ile ilgilenmiş ve yazdığı "Historie de Plante" adlı eserinde çok sayıda bitkisel drog hakkında bilgi vermiştir.

8. yüzyılda İslam aleminde eczacılık ve ilaç kitapları ortaya çıkmıştır. Kimya ve eczacılığın oluşmasında büyük rolü olan EBU-BEKİR el RAZİ'nin tıbbi bitkiler listesi, bu bitkilerin ne kadar zengin olduğunu göstermektedir. Bu dönemde göze çarpan değerli İslam alimlerinden İBNİ SİNA tıp ansiklopedisi mahiyetinde olan "Kanun" isimli önemli eserini yazmıştır (Barış 2004).

16. yüzyılın ilk yarısında hekim PARACELSUS farmasötik kimyayı kurmuş ve bitkilerden belirli maddeleri izole edip bunlardan ilaç hazırlamaya başlamıştır (Barış 2004).

Bütün bu gelişmelerin akabinde ilk defa 19. yüzyılda bitki droglarının yapı, tanım ve işlevlerini inceleyen farmakognozi bilimi ortaya atılmıştır (Ceylan 1995). Tıbbi bitkilerin yetiştirilmesi de farmakognozi ilminin gelişmesine paralel olarak artmıştır. Ancak 1920-1950'li yıllar arasında doruk noktasına ulaşan sentetik ilaçların geliştirilmesi ve mikroorganizmalar kullanılarak antibiotiklerin üretimi, tıbbi bitkilerin dünya ticaret hacmindeki payını azaltmıştır. Fakat sentetik katkı maddelerinin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilerinin ortaya çıkmasıyla birlikte; et, süt, meyve, sebze, deniz ürünleri ve meşrubat sektörlerinde "doğal" ürünlere duyulan talep giderek artmıştır (Fowler 1982).

Günümüzde tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen sekonder metabolitler üzerine yapılan çalışmalar; tedavi alanına giren yeni sentetik maddelerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkilerin bitkisel droglarda daha az görülmesi; genellikle bir tek etkiye sahip olan sentetik bileşiklere göre bitkisel drogların birkaç etkiye birden sahip olmaları ve yeterli düzeyde bir kimya endüstrisine sahip olmayan kalkınma yolundaki ülkelerin, memleketlerindeki bitkilerden yararlanarak, kolay ve ucuz tedavi olanağı elde etmek istemeleri (Aboolenein 1982), nedenlerinden dolayı oldukça artmıştır.

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i sağlık gereksinmelerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun %80'nin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse toplam dünya nüfusunun %64'ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır (Farnsworth 1990). Gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların da yaklaşık %25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Principe 1991). Bununla birlikte gelişmekte olan ülkelerin popülasyonlarının büyük bir kısmı batı farmasötiklerinin ve buna bağlı sağlığı korumanın büyük maliyetinden dolayı sağlığı koruma kaynağı olarak geleneksel ilaçları kullanmaktadır. Çünkü geleneksel ilaçlar genellikle kültürel ve dinsel perspektifte çok daha kabul görmektedir (Verschaeve *et al.* 2004).

Ayrıca bitkisel ilaçların, gelişmiş ülkelerde de alternatif tıbbı sürekli olarak artan ilgiyle bağlantılı olarak, bireylerin ve toplumların sağlıklarının korunmasında geniş bir kullanıma sahip olduğu da gözlenmektedir. Tüketici araştırmaları, alternatif tıbbı pozitif bir halk yaklaşımının olduğunu göstermektedir. Bitkisel ilaçların kullanımı her ülkenin tarihi, tıbbi ve etnolojik geçmişine bağlı olarak değişmektedir. WHO (The World Health Organization); geleneksel ilaçların kullanımına gereken önemi vermek, toplumlar ve özellikle aktarlar tarafından kullanılan tıbbi bitkilerin değerlendirilmesi ve sistematik envanterini yapmak, bilimsel olarak kanıtlanmış, güvenli ve etkili geleneksel ilaçların kullanımıyla ilgili modern tıp ve alternatif tıp arasında işbirliğini geliştirecek araştırmaları yoğunlaştırmak amacıyla farklı devletlerin teşvik edilmesini önermektedir. Bu önerilerin amacı, ulusal standartlar ve teknik rehberler geliştirerek tıbbi bitkilerin kullanımını ciddi bir şekilde değerlendiren ulusal sağlık sistemi içine tıbbi bitkilerin daha fazla girmesini sağlamak ve bunların bilimsel değerlendirilmesini hızlandırmaktır (Benzi and Ceci 1997). Ancak çoğu doğal ürün halen herhangi bilimsel veri olmaksızın medikal tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Stephen 1998). Kronik hastalıkları tedavi etme veya engellemek için tıbbi bitkilerin ve onların aktif bileşiklerinin modern tıpta kullanımı bilimsel kanıtların yetersizliğinden dolayı değer kaybetmekte ve sadece birkaç bitki, bilim adamlarının dikkatini çekmektedir (Kaur *et al.* 2001).

In vivo ve *in vitro* çalışmalar, bitkilerin yaprak, meyve, kök gibi kısımlarından elde edilen bazı doğal bileşiklerin ksenobiyotik etkiler üzerine düzenleyici rol oynadıklarını göstermiştir. Bu bileşiklerin karakterizasyonu, tanılanması, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin belirlenmesi insanlarda kanser hastalığının gelişmesini azaltmak için önemli bir stratejiyi de beraberinde getirmiştir (Rovado *et al.* 2004). Bu hastalığı önlemek için geliştirilen strateji; ya çevresel mutajenleri nötralize eden ajanların kullanımını artırmak yada bu ajanların kullanımını sınırlayan veya azaltan çevresel mutajenleri elemine etmektir (Lee and Park 2003). Son zamanlarda birçok doğal bileşiğin tümör inhibe edici etkiye ve immun sistemi kuvvetlendirici niteliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Lien and Li 1985). Özellikle makromolekülleri içine alan birçok doğal ürün bireysel immun sisteminin modülasyonunu sağlamasından dolayı antitümör aktiviteye sahiptir. Bu makromoleküllerin, kimyasal antitümör druglarla

karşılaştırıldığında daha az yan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Tsukagoshi and Ohashi 1974). Yine çeşitli biyoaktif bileşikler ve bunların türevlerinin; başlangıç, gelişme ve yayılım safhalarını içine alan birçok deneysel sistemlerde karsinogenesisi inhibe ettiği gözlenmiştir (Huang *et al.* 1994). Bu yüzden çabalar, kanserin indüklenmesi ve sonraki gelişim safhalarını engelleyen, azaltan veya gerilemesini sağlayacak doğal antikarsinojenleri tanımlamaktır (Chuang *et al.* 2000).

2.1.2. Çalışılan bitkiler ve biyolojik aktiviteleri

***Achillea millefolium* L.(Yarrow- Civan Perçemi- Kandil Çiçeği)**

Asteracea familyasına ait *Achillea* cinsi ülkemizde 42 türle temsil edilmekte (Karamenderes ve Kesercioğlu 2002) olup; çayır ve çalılıklar arasında, kurak yerlerde, yol boylarında ve otlak arazide bulunmaktadır (Asımgil 1997).

Achillea millefolium kimyasal olarak yapısında; çeşitli alkaloidleri, flavanoidleri, sesquiterpen laktonları, aminoasitleri ihtiva etmektedir. Yapısındaki flavonoidler antiinflamatuvar ve antispazmotik özelliğe sahiptir. Ayrıca bu bitki alternatif tıpta analjezik, antihelmintik, antiinflamatuvar, antiviral, kontraseptif, diaforetik, diüretik, laksatif amaçla kullanılmaktadır (Chandler *et al.* 1982).

***Artemisia absinthium* L. (Wormwood- Deniz Pelini- Deniz Yavşanı)**

Asteraceae familyasına ait *Artemisia* cinsi 180 türle temsil edilmekte ve kimyasal-biyolojik içeriğinin çeşitliliği, geleneksel tıbbi uygulamalarda çok sık kullanımı, zengin bitki materyali dolayısıyla büyük önem arz etmektedir. Bu cins; sesquiterpenoidler, flavonoidler, kumarinler, glikozitler, steroller, poliasetilenleri içine alan çok farklı sekonder metabolit sınıfını yapısında bulundurmaktadır. Bitkiden izole edilen ve sesquiterpen lakton grubuna ait olan arteminolidlerin tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda mantar, bakteri, virus

enfeksiyonlarında ve inflamasyon, kanser, hepatit, malarya gibi hastalıklarda sıklıkla kullanılmaktadır (Berlin and Smilkstein 1996).

Artemisia absinthium'un kimyasal kompozisyonu incelendiğinde absinthin, absinthic asit, anabsinthin, artametin, suksinik asit gibi acı glikozitler, tanin, resin, malat flavonoidleri ve potasyum nitrat ile diğer tuzları içerdiği tespit edilmiştir (Grieve 1931). Bitkiye kendisine has acı tadı veren içerisindeki absinthin ve anabsinthin (Tyler 1999) önceleri kırmızı şarabın ana maddesi olarak, günümüzde de içki sanayinde tatlandırıcı olarak çok sınırlı miktarlarda da olsa kullanılmaktadır. Absinthin aynı zamanda; antihelmintik, digestive, diüretik, antibakteriyel, antipiretik etkiye sahiptir (Duke 1985).

***Helychrysum pilicatum* D.C. (Ölmez çiçek)**

Compositae familyasına ait bu bitki Anadolu da oldukça yaygındır. Yapısında reçine, acı madde, kumarin, flavon glikozitleri ve uçucu yağ mevcuttur. Taşıdığı flavon glikozitleri sebebiyle idrar sökücü olarak ve idrar yolları taşlarını düşürebilmek amacıyla kullanılmaktadır (Baytop 1984).

***Nepeta racemosa* L. (Kedi nanesi)**

Labiatae familyası bitkilerinden olan *Nepeta* cinsinin dünya üzerinde Asya ve Avrupa'da yaygın olmak üzere 250'den fazla (~280) türü bulunmaktadır (Moghaddam and Hosseini 1996). Türkiye'de 17'si endemik olmak üzere 33 *Nepeta* türü yetişmektedir (Aydın vd 1999). *Nepeta* türleri kediler üzerinde öforik etki gösterdiklerinden "Kedi Nanesi" adı ile de bilinmektedirler. *Nepeta* türlerinin tıbbi özellikleri, içerdikleri uçucu yağ ve flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. *Nepeta* türlerinde bulunan nepetalaktonun kedilere özgü bir fizyolojik aktivitesinin bulunduğu bilinmektedir (Başer vd 2000). Taşıdıkları iridoid ve nepetalaktonlardan dolayı da halk arasında antiseptik, antitussif, antispazmodik, antiastmatik, antipiretik, diüretik, antibakteriyel, fungisidal, antiviral, bakteriostatik ve disinfektant olarak egzema tipi

deri hastalıklarına karşı kullanılmaktadırlar (Başer vd 2000; Skaltsa *et al.* 2000; Kalpoitzakis *et al.* 2001; Baranauskienė *et al.* 2003).

***Origanum vulgare* L. (Güvey otu, keklik otu, kekik)**

Labiatae familyasına ait bu bitki ülkemizde 20 türle temsil edilmektedir ve Anadolu da oldukça yaygındır (Baytop 1984). Bu bitkinin ülkemizde baharat olarak kullanımı oldukça yaygındır. Ayrıca bitki çayı olarak da tüketilmektedir (Başer 2002).

Bu bitkiden özellikle karvakrol uçucu yağı elde edilmektedir (%70-80). Bunun dışında gamma-terpine (8–10%), p-cymene (5–10%) alpha-pinene, flavonoid de yapısında bulunan önemli sekonder metabolitlerdendir. Yapısındaki karvakrol; oral olarak alındığında gastrointestinal düzensizlikleri tedavi ettiği, kandaki glukoz ve kolesterol seviyesini düşürdüğü ve kanseri engellediği bilinmektedir. Bununla birlikte ağrıyan bölgelere sürterek özellikle eklem bölgelerindeki romatizmal ağrıları dindirmede kullanılır (Başer 2002). Bronşit, sinüzit , soğuk algınlığı gibi durumlarda kullanıldığı gibi (Tabata 1990); terletici, idrar atıcı, gaz sökücü olarak da kullanılmaktadır (Baytop 1984). Ayrıca antiviral, antibakteriyal, antifungal, antiparasitik, antiseptik özelliğe sahip olan bitki özellikle güçlü analjezik ve antiromatik ajan olarak da kullanılmaktadır (Baytop 1984).

***Salvia* L.(Adaçayı)**

Lamiaceae familyasına ait bu cins, dünyada 600, ülkemizde ise Doğu Anadolu bölgesinde 7 tanesi endemik olmak üzere 42, toplam 87 tür ile temsil edilmektedir (Barış 2004).

Salvia türlerinin tıbbi özellikleri içerdikleri uçucu yağlardan kaynaklanmaktadır. Özellikle sineol uçucu yağı iyi bir solunum yolları antiseptiği olarak kullanılırken (Tanker vd 1998), tuyon uçucu yağı uyarıcı etkiye sahiptir ve gaz söktürücü, diüretik ve

antiasit olarak kullanılmaktadır. Linalol uçucu yağı ise parfümeri sanayisinde değerlidir (Baytop 1984).

Biz bu çalışmamızda; *Salvia nemerosa*, *Salvia verticillata*, *Salvia limbata*'yı antimutajenik özelliği açısından değerlendirdik. *S. verticillata*; ülkemizin hemen her yerinde görülen, geniş yayılış gösteren bir türdür, *S. nemerosa* ise ülkemizin doğu bölgelerinde yayılış göstermektedir (Barış 2004).

2.2. Mutasyonlar ve Mutajenik Ajanlar

2.2.1. Mutasyonlar

DNA' da meydana gelen kalıtsal nitelikte yapısal değişiklikler olarak tanımlanabilir. Mutasyon terimi geniş anlamda a) kromozom sayısı, b) kromozom yapısı değişimleri , c) genlerin yapısındaki fiziksel ve kimyasal değişiklikleri ifade etmek için kullanılmaktadır. Mutasyonlar, oluşum biçimleri ve koşulları, meydana geldikleri hücre tipi yada yol açtıkları durumlara bağlı olarak değişik sınıflandırmalara tabii tutulurlar. Oluşum koşullarına göre, doğal (kendiliğinden oluşan) ve yapay (deneysel) mutasyon tiplerini ayırt etmek mümkündür. Doğal mutasyonların oluşum olasılığı 10^{-5} – 10^{-8} arasında değişebilir. Genellikle bir nükleotidin mutasyona uğrama olasılığı 10^{-7} dir.

Biyolojik açıdan önem taşıyan genlerin yapısında fiziksel ve kimyasal değişime neden olan gen mutasyonlarının temelde üç tipi vardır;

1. İleri mutasyonlar;

a) DNA seviyesinde mutasyonlar:

i) Karşılıklı geçiş (transisyon türü substitisyon): Bir pirimidinin diğer bir pirimidinle, yada bir pürin bazının diğer bir pürin bazıyla yer değiştirmesi şeklinde (AT→GC) oluşur.

ii) Çaprazlama geçiş (transversiyon türü substitisyon): Bir pürin bazı ile bir pirimidin bazının veya bir pirimidin ile bir pürin bazının yer değiştirmesi şeklinde (AT→CG) meydana gelir.

b) Protein seviyesinde yada kodonlar üzerinde bıraktıkları etkiye göre mutasyonlar:

i) Sessiz mutasyon (silent mutasyon): DNA baz dizisinde meydana gelen bir mutasyon mRNA kodonunda değişikliğe neden olur. Ancak; aminoasit sırası değişmediğinden yani aynı aminoasit için bu aminoasiti taşıyan diğer kodon oluştuğundan sentezlenen proteinin özelliği değişmez. Örneğin; ACG kodonu CGG olarak değişmesine rağmen, her iki kodon arginini kodlamaktadır.

ii) Anlamlı mutasyon (missense mutasyon): Gende bir baz dizisinde meydana gelen bir başkalaşım mRNA kodonunda da değişiklik oluşturur ve sonuç olarak farklı bir aminoasit taşınmasına neden olur.

iii) Anlamsız mutasyon (nonsense mutasyon): Protein sentezini sonlandıran stop kodonun kodlanmasına sebep olan ve protein sentezini yarıda bırakan mutasyon türüdür. Yani proteinin yapısal kısmı oluşmadan protein sentezi durdurulur. Glisin'i kodlayan CAG kodonunun stop kodonu olan UAG'ye dönüşmesi gibi.

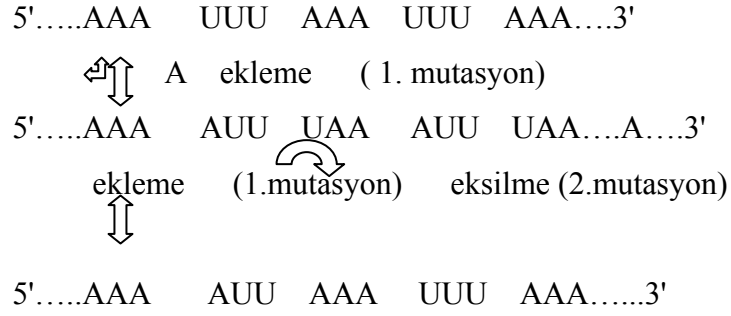
iv) Çerçeve kayması (frameshift mutasyon): Bir gende üç bazdan daha az yada daha fazla küçük delesyonlar yada insersiyonlar tarzında gerçekleşen mutasyon türüdür. Bu mutasyon sonucu hem transkripsiyon hemde mRNA'daki okuma çerçevesinde olan değişme sonucu önemli kusurlar ortaya çıkabilir (Bahçeci 2002).

| <u>DNA baz dizisi</u> | <u>mRNA dizisi</u> | <u>Aminoasit dizisi</u> |
|--|--------------------|-------------------------|
| <u>Mutasyon türü</u> CTA TTC CGA ACA Normal dizi | GAU AAG GCU UGU | Asp-Lys-Ala-Cys |
| CTA TTT CGA ACA Silent | GAU AA▲ GCU UGU | Asp-Lys-Ala-Cys |
| CTA CTC CGA ACA Missense | GAU GAG GCU UGU | Asp-Glu-Ala-Cys |
| CTA ATC CGA ACA Nonsense | GAU UAG GCU UGU | Asp-Stop |
| CTA TTT CCG ACA A Frameshift | GAU AA▲ GGC UGU | Asp-Lys-Gly-Cys |

2. Tersine Mutasyonlar: Mutant fenotiplerden yabani tiplerin yada yabani tiplerden mutant fenotiplerin oluşmasına neden olan mutasyonlardır. Yabani tiplerden anormal fenotipleri oluşturan mutasyonlara ileri mutasyonlar, anormal tiplerden yabani fenotipleri oluşturan mutasyonlara geri mutasyonlar adı verilir (Solak vd 1997).

3. Baskılayıcı Mutasyonlar: Bir mutasyonun etkisi bazen aynı gende yada başka bir gende meydana gelen ikinci bir mutasyon ile baskılanabilir (=supresyon).

i) Gen içi supresyon (Intragenic suppressor mutations): Baskılayıcı nitelikte bir mutasyonun etkisiyle aynı gende ilk mutasyonun etkisinin kalkmasıdır. Örneğin; insersiyon tipi mutasyonu izleyen delesyon tipi mutasyonun gerçekleşmesi. Bu sayede ilk mutasyondan aşağıdaki tüm baz dizisinin okunmasında bir kayma engellenmiş olur ve mutasyonun etkisi (iki mutasyonun arasındaki uzaklığa bağlı olmak üzere) aminoasit dizisindeki bir iki değişiklikle sınırlanır:



(Bunun yanı sıra teori olarak, bir nokta mutasyonun etkisinin onu geriye dönüştüren ikinci bir mutasyonla kalkabileceği de düşünülebilir: 1. mutasyon U-C ; 2. mutasyon C-U)

ii) Gen dışı supresyon (Extragenic suppressor mutations): DNA molekülünde mutasyona uğramış genden başka bir gende meydana gelen mutasyona gen dışı supresyon denilir. Bir mutasyonun etkisi genler arası supresyon mekanizmasında tRNA moleküllerinin (supressor tRNA'ların) aracılığıyla da baskılanabilir. Bu ikinci mekanizmada supresyona yol açan tRNA molekülünün antikodonunu şifreleyen DNA baz dizisinde, ikinci bir mutasyonun olduğu görülür. Antikodonundaki bu değişiklik sayesinde tRNA molekülü birinci mutasyonunun sonucu ortaya çıkabilecek (anlamsız) bir kodonu bir amino asitmiş gibi okuyarak sentezin zamansız durmasını önler. Örneğin; tirosini kodlayan UAC kodonu bir mutasyon sonucu anlamsız kodon UAG'ye dönüşebilir. Tirosine özgü tRNA moleküllerinin birinin antikodonunun (AUG) ikinci mutasyon sonucu mRNA'daki UAG'yi tanıyan AUC antikodonuna dönüşmesiyle anlamsız mutasyona karşın normalde beklenen proteinin yapılması mümkün olabilir (Petek 1999).

2.2.2. Mutajenik ajanlar

2.2.2.a. Kimyasal mutajenler

Birçok gruba ayrılabilen kimyasal mutajenler DNA bazları ile kovalent olarak bağlanabilmektedir. Bunlar ya elektrofilik (elektron kaybetmiş) gruplara sahiptir veya metabolik olarak elektrofilik özellikte türevlere dönüştürülürler. Elektrofilik özellikteki

bu gruplar diğer moleküllerin yapılarında bulunan nükleofilik (elektronca zengin) amino, sülfidril ve hidroksil grupları ile kovalent bağlar oluştururlar. Nükleofilik gruplar proteinlerin, RNA ve DNA yapılarında bulunurlar. Elektrofilik özellikteki kimyasal maddeler, bu hedef moleküllerin tümü ile etkileşirler, ancak bunların bağlanarak zarar verdikleri en önemli hedef DNA molekülüdür (Petek 1999).

Aynı zamanda birçok eksojen mutajen insan vücudunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırmak suretiyle aktivite göstermektedir. ROS'un oluşumu çevre kirliliği, UV, radyasyon gibi birçok metabolik prosesle bağlantılıdır. ROS; kanser, kalp hastalığı, yaşlanma ile bağlantılı olan mutasyon ve DNA zararı gibi dejeneratif hastalıkların endojen başlangıcı olarak büyük rol oynar (Negi *et al.* 2003). İnsan vücudundaki sayısız fizyolojik ve biyokimyasal proseste oksijen merkezli serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri oluşabilir (Chai *et al.* 2004). Örneğin; vücuda alınan besin maddesinin su ve CO₂'e kadar yıkılması reaksiyonunda oksijenin dört elektron vererek indirgenmesi gerekir. I. elektron superoksit anyon radikalini, II. elektron peroksit anyonu, III.'sü hidroksi radikalini ve sonuncusu suyu meydana getirir. Bu proses bölmelere ayrıldığında ve sürekli gerçekleştiğinde zararlı sonuçlar ortaya çıkmaz. Ancak bu serbest radikal türlerinden herhangi biri zincirden ayrıldığında, ayrılan radikal; lipit membranlara, DNA'ya, proteinlere v.b. zarar veren reaktif oksijen türlerinin oluşmasını sağlayan diğer radikal zincir reaksiyonunu (lipid peroksidasyonu) başlatabilme yeteneğindedir (Murray 2004). Bu tür serbest radikallerin aşırı üretimi biyomoleküller üzerinde oksidatif hasara sebep olur ve sonunda insanlarda arterioskleroz, kanser, yaşlanma, diabet, diğer dejeneratif hastalıklar gibi kronik hastalıkları oluşturabilirler (Chai *et al.* 2004).

Genotoksik özellikteki kimyasal maddelerin birçoğu da sitokrom P-450 enzimleri vasıtasıyla epoksit ve hidroksil türevlerine (ileri derecede mutajenik veya karsinojenik) dönüşür. Bu dönüşümden önce karsinojen veya mutajen özellikte olmayan kimyasal maddeler, vucutta metabolizma sonucu aktif karsinojen haline dönüşür ve çok kuvvetli elektrofilik özellik göstermelerinden dolayı nükleofilik olan DNA molekülüne kolayca saldırıp çok sayıda mutasyonun oluşmasına neden olurlar (Petek 1999; Murray 2004).

Örneğin; aflatoksin β_1 , benzoaminopirin, bromobenzen gibi ksenobiyotik maddeler karaciğerde glutasyonu kendine bağlar ve yapısındaki aromatik halkalar epoksidasyona uğrar. Onların epoksitleri ve ara ürünleri elektrofilik özelliklerinden dolayı hücre membranlarında lipit peroksidasyonunu indükler. Bununla birlikte bu bileşenler DNA zincirlerinde mutajeniteye sebep olacak şekilde onunla reaksiyona girer. Bu yüzden birçok ksenobiyotik madde karsinojen olarak fonksiyon gösterir (Park *et al.* 2004).

Proliferasyon fazında olmayan, durağan hücrelerde, çift sarmalı oluşturan iki DNA zincirinin bu tür kimyasal maddelerle bağlanma eğilimi yoktur. Ancak DNA sentezi sırasında iki zincir birbirinden ayrıldığında, DNA; karsinojenik ve mutajenik saldırılara özellikle çok duyarlı hale gelir (Petek 1999).

Çoğu endüstriyel aktivitelerin yan ürünleri olarak doğal ortama verilen, mutasyona sebep olduğu bilinen genotoksik kimyasal maddelerin belli başlı grupları aşağıdakilerden oluşmaktadır.

a) Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAHs): PAH'lar orijinal olarak yağların ve biyolojik materyallerin piroliziyle ortaya çıkan bileşiklerdir. Tütünde, viskide, ızgara et de ve yanması tamamlanmamış kömür ve petrolde ortaya çıkar. Sitokrom P-450 tarafından enzimatik olarak aktive edilmiş PAH'lar, pürin bazlarıyla, özellikle guanin ile bağ oluştururlar. Bu bağlanma sonucu sitozin ile bağlanamaz, karşısına eş olarak timini alır (Günalp vd 1992). Benzoaminopirin (B[a]P), dimetilbenzatriasen gibi kimyasal maddeler prokarsinojen nitelikte polisiklik aromatik hidrokarbonlardır ve sitokrom P-450 enzimlerinin (phase I detoksifikasyon enzimleri) hidroksilleme reaksiyonları ile etkin karsinojen maddelere dönüşürler (Murray 2004).

b) Aromatik Aminler: Arilaminler olarak da adlandırılan bu maddeler boya içerisinde, lastik ve petrokimya endüstrisinde kullanılır (Murray 2004) ve karsinojenik-mutajenik özelliğe sahip çevresel ve endüstriyel kimyasalların en önemli sınıfından birini oluşturur (Josefina *et al.* 2004).

Bu maddeler DNA ile bağlanamazlar, N-hidroksil gruplarının sülfatlanmasına ve asetilasyonuna sebep olurlar. Bu ürünler DNA'nın guanin bazları ile reaksiyona girerler. Böylece guaninin yanlış eşleşmesine sebep olurlar. 2-asetilaminofluoren (2AF), N-metil-4-aminbenzen (MAB) mutajenik ve karsinojenik etkiye sahip önemli kimyasal aromatik aminlerdir (Murray 2004). 2-asetilaminofluoren ve 2-aminoanthracene gibi aromatik aminler nitro grubu radikal anyonların oluşumunu sağlayan indirgeme prosesi dolayısıyla mutajeniktir. Nitro ve amino grubu heterosiklik bileşikler; mutajenik hidroksi amin bileşiklikleri ve nitro iyonları üreten *N*-asetil ve *O*-asetiltransferazlar, sitokrom P450 monooksijenazlar, nitroredüktezlar tarafından metabolize edilebilirler (Beudot 1998).

c) Deaminasyon yapan ajanlar: Tütülenmiş et ve balıklarda, ayrıca, gıdalarda koruyucu olarak ilave edilmiş nitritlerle birlikte, doğal aminler olarak DNA için tehlike oluştururlar. "Amino" grubu içeren bazlarla reaksiyona girerek, DNA bazlarının, "Amino" gruplarını deamine eder ve baz sıralamalarında bozukluğa neden olurlar. Örneğin; böyle bir etki, adenini →hipoksantine, sitozini→urasile, guanini→ksantine kolayca dönüştürebilir. Böyle bir durum; adenin yerine geçmiş hipoksantinin özgül olarak sitozin ile baz çifti oluşturmasına sebep olur (Nitröz asit- HNO_2) (Petek 1999)

d) Alkilleyici ajanlar: Hardal gazı, polivinil klorid, kükürt ve nitrojen mustard, etilenoksitler ve daha az toksik olan etil-metan-sulfonat bu gruba girer. EMS(etimetanosulfonat), MMS(metilmetanosulfonat), NG(nitroguanidin) gibi alkilleyici bileşikler, nükleotitlerin amino ya da keton grubuna $-\text{CH}_3$ ya da $-\text{CH}_3\text{-CH}_2$ gibi bir alkil grubunu verirler. Özellikle G'nin O^6 ve N^7 pozisyonlarına etil ya da metil grubu sokarak glikozid bağını gevşetir ve G'nin ayrılmasına neden olabilir. Ayrıca EMS, G'nin 6.pozisyonuna etil grubunu vererek (O-6-alkilguanin) timinle eşleşmesine ve bu değişiklik sonucu bir sonraki DNA sentezinde GC → AT (transisyon) değişikliğine yol açarlar. Dolayısıyla bu etkenler; depürinasyon, zincir kırılması, transisyon ve transversiyon tipinde nokta mutasyonlarına neden olabilmektedirler (Şekil 2.1) (Petek 1999).

e) İnterkalasyon yapan ajanlar: Akridinler (proflavine, acriflavine, acridin orange).

Akridin boyları C-G→A-T veya A-T→T-A şeklinde transversiyonlara yol açarlar. Ayrıca çift sarmal DNA'nın bazları arasına girerek (intercalating) şeker-fosfat omurgasını bozabilmektedirler. Bu bileşikler DNA'da nükleotit eksilmesine ya da artmasına böylece DNA diziliminde çerçeve kaymasına neden olabilen mutajenlerdir. Bunlar rekombinasyon esnasında bir zinciri kopan DNA molekülüne bağlanarak, zincirlerin onarılmasında yanlışlıklara da neden olurlar (Şekil 2.1) (Petek 1999).

f) Baz analogları: 5.Bromurasil; bu baz timine çok benzediğinden DNA eşleşmesi sırasında timin yerine kullanılabilir. Timinden tek farkı 5. karbona bağlı metil grubunun yerine brom atomu bulunmasıdır. Urasilde ise aynı yerde bir hidrojen atomu bulunur. Hidrojenin bromla yer değiştirmesinden meydana geldiği için 5.bromurasil olarak adlandırılır. 2 Aminopürin; bu madde adenine çok benzer. Bu molekül amino formunda iken timinle çift oluşturur (2AP-T). 2AP, nadiren bir "İmino"formunda bulunabilir ve bu durumda iken sitozinle arasında tek hidrojen bağı olacak şekilde çift oluşturabilir (2AP-C). Bunun sonucunda, gen üzerinde A-T çiftleri yerine 2AP-C oluşur. Böylece A-T yerine G-C geçmiş olur (Petek 1999).

2.2.3.b. Fiziksel mutajenler

a) Sıcaklık derecesi ve pH: Yüksek sıcaklık, moleküllerin kinetik enerjilerini artırmak suretiyle mutasyonlara sebep olur. Özellikle pürin bazlarının uzaklaşması ile depürinasyona neden olurlar. Ortamın pH derecesi de moleküller arası etkileşmelerde ve özellikle tautomerik dönüşümlerde rol oynar. Bunlar da depürinasyona sebep olurlar (Petek 1999).

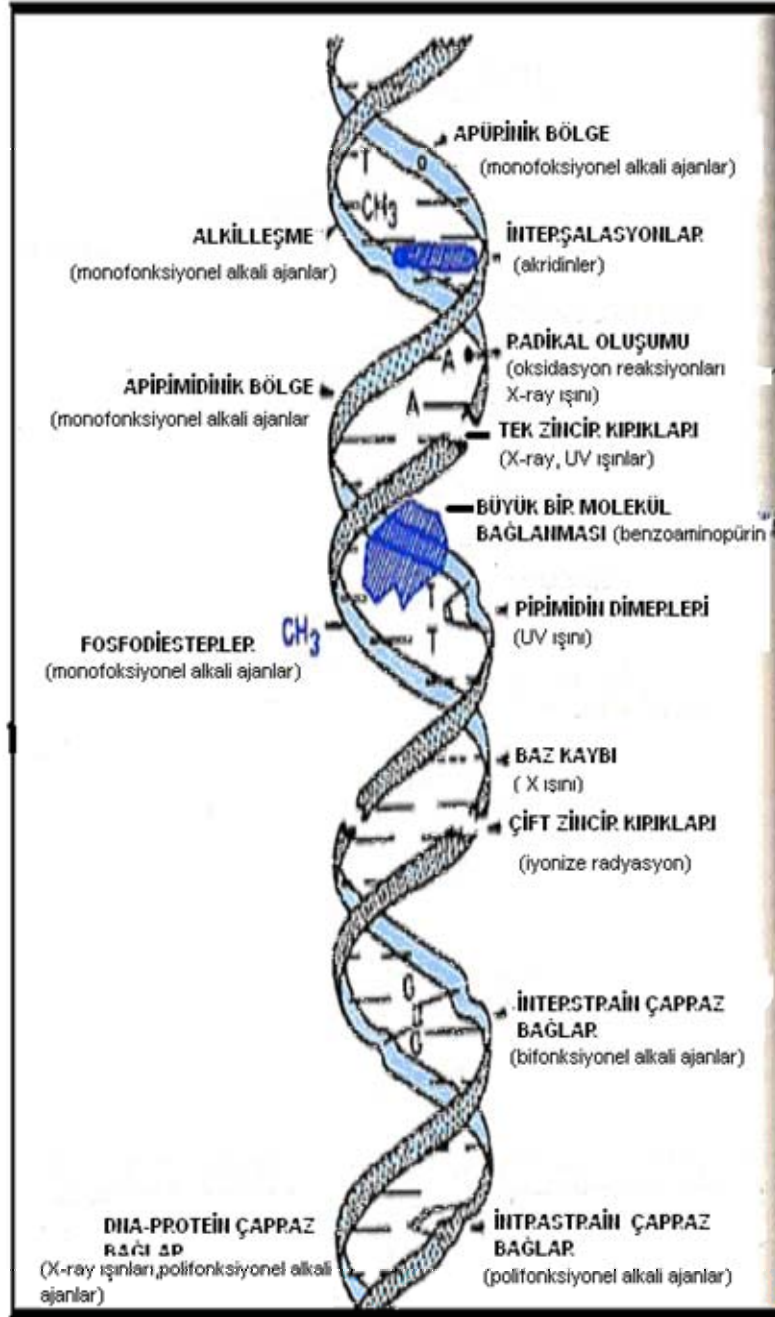
b) Işıklar: İyonizan ışıklar; mutajenik ve karsinojenik etkiye sahiptir. Mor ötesi ışınlar, pirimidin dimerlerinin oluşmasına neden olabilir. Karşılık gelen bazların uzaklaştırılması ile pürinsiz veya pirimidinsiz bölgeler oluşabilir, tek veya çift zincir kırıkları veya zincirler arasında çapraz bağlanma görülebilir (Şekil 2.1). X ve γ ışınları,

DNA üzerindeki doğrudan etkilerinin yanı sıra (delesyon ve insersiyonlar, zincir kırıkları v.b.), dokularda serbest radikallerin oluşmasına neden olur (Murray 2004). Bu serbest radikallerde DNA'da bazların hasarına ve baz ile deoksiriboz şeker arasındaki glikozid bağını kırarak pürinsiz bölgelerin oluşmasına yol açabilmektedir.

Non iyonizan ışınlar; UV ışınlarının DNA üzerindeki fotoşimik etkisidir. DNA molekülündeki pirimidin bazlar arasında "dimerler" oluşturur. Yapılan incelemeler U.V. ışınlarının, DNA'nın aynı polinükleotid zinciri üzerindeki primidinler arasında da bağlanmalar oluşturduğu gibi, karşılıklı iki zincir üzerindeki primidinler arasında da oluşturabileceğini göstermiştir (Şekil 2.1) (Petek 1999).

2.2.3. Deneysel mutasyonlar:

Bilindiği üzere spontan mutasyonlar çok seyrek olarak, ortalama 1/1.000.000 ihtimalle meydana gelmektedir. Araştırmacılar çeşitli ışınlar, radyoaktif maddeler, kimyasal maddeler v.s. gibi mutajenleri canlılara tatbik ederek mutasyonların frekansını artırır ve bunlardan yararlanarak genetik mekanizmanın işleyişini aydınlatmaya çalışırlar (Bahçeci 2002).



Şekil 2.1. DNA üzerinde mutasyonların ve mutajenik ajanların gösterilmesi

2.3. Antimutajenite ve Tıbbi Bitkilerin İÇerdiği Önemli Antimutajenik Bileşikler

Antimutajenite; mutajenik maddelerin mutajen veya kanserojen etkilerinin ortadan kaldırılması veya bunların DNA ile etkileşimlerinin önlenmesidir. Genellikle antimutajenik maddeler etki etme şekillerine göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olmak üzere ikiye ayrılır. Mutajenin DNA'nın yapısına katılmasından sonra DNA replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarının işleyişini düzenleyerek mutagenezisi azaltan maddeler biyoantimutajenik maddelerdir. DNA polimeraz I ve DNA polimeraz III sentezini artırmak, error- prone DNA tamir mekanizmasını engellemek, error- free DNA tamir mekanizmasını geliştirmek bioantimutajenlerin etkiledikleri önemli mekanizmalardır. Mutajen ajanların hücreye girişini bloke eden yani DNA'nın yapısına dahil olmadan onları inaktif hale getiren antimutajenik maddeler ise desmutajenler olarak tanımlanmaktadır. Ajanları bloke etme, nitrosation reaksiyonlarını engelleme, serbest radikalleri (ROS- reaktif oksijen türleri) giderme, devre I ve devre II detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu başlıca etki mekanizmalarıdır (Nakasugi *et al.* 2000)

Bitkiler; fenolik bileşikler (fenolik asit, flavonoid, quinonlar, koumarinler, taninler), nitrojen bileşikler (alkaloidler, betaalaninler, aminler), vitaminler, terpenoidler (karotenoidler) ve antioksidant aktivite bakımından zengin olan bazı endojen metabolitler içerebilirler. Epidemiyolojik araştırmalar böyle antioksidant bileşiklerin anti-inflamatuvar, anti-arteriosklerotik, antitümör, anti-mutajenik, antikarsinojenik, antiviral, antibakteriyal aktivitelere çok veya az ölçüde sahip olduğunu göstermiştir (Chai *et al.* 2004).

Antimutajenik özelliği bilinen sekonder metabolitlerin en önemlileri aşağıda sıralanmıştır;

2.3.1. Polifenoller

Fenolik bileşikler veya polifenoller aromatik halkalarında bir veya daha fazla sayıda hidroksil grup içeren bileşiklerdir ve büyük bir kısmı hidrofiliktir. Meyvelerde ve sebzelerde bol bulunan fenolik bileşikler birçok besin ve ieeğinin tadının, lezzetinin, renginin kaynağını oluşturur (Moss 1993).

Fenolik bileşiklerin sahip olduğu antioksidant aktivite esas olarak metal şelatlama, singlet oksijen giderme, hidrojen verici ve indirgeyici ajan olarak davranmalarını sağlayan redox özelliklerinden kaynaklanır (Ancos *et al.* 2000). Ayrıca fenoller ROS radikallerini süpürücü özelliğe sahiptir ve bu özellik fenolik molekülün aromatik halkası üzerindeki hidrojen-donating hidroksil grupların pozisyonuna-sayısına, fenolik hidrojenlerin mevcudiyetine ve hidrojen vererek oluşan fenoksi radikallerinin kararlı hale geçebilmesine bağlıdır (Silva *et al.* 2000; Chai *et al.* 2004).

Polifenollerin antimutajenik ve antikarsinojenik etkiye sahip olduğunu gösteren çok önemli çalışmalar yapılmıştır.

2.3.2. Flavonoidler

Flavonoidler bir asırdan fazladır bitki pigmenti olarak bilinmekte olup bitki orijinli bütün besinlerde bol miktarda bulunan oldukça geniş olan polifenolik bileşikler grubuna dahildir ve bitkilerin herhangi yerinde oluşabilirler (Wenzel 2004, Chai *et al.* 2004; Galati and O'Brien 2004). Doğal olarak oluşabilen 4000 farklı flavonoid tanımlanmıştır ve bu sayı giderek artmaktadır (Galati and O'Brien 2004).

Flavonoidlerin (galangin, kaempferol, quercetin, myricetin, fisetin, morin, catechin, rhamnetin, rutin v.b.) birçok biyolojik aktiviteyi düzenlediği belirlenmiştir;

- bakterisit etkiye sahiptir,

- mitokondrial suksinooksidazı engelleyebilmesi ve biyotransformasyon enzimlerinin düzenleyicisi olarak görev almasından dolayı antitümör ajan olarak davranır,
- lipit sistemlerde antioksidant olarak görev alır dolayısıyla düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu engelleme, ROS'un giderilmesi, demir şelatlama özelliklerine sahiptir. Prekarsinojenlerin biyotransformasyonunda gerekli olan enzimleri inhibe eder (Silva 2000),
- redox-aktif metalleri içeren sistemlerde prooksidant olarak davrandıkları gösterilmiştir. O₂ varlığında, demir ve bakır gibi transisyon metaller DNA, lipidler, diğer biyolojik moleküllere zarar verebilen fenoksi radikaller ve ROS oluşumunu yöneten fenoliklerin redox döngüsünü katalizler (Galati and O'Brien 2004).
- A,B ve C halkalarında amino grubu taşıyan birçok flavonoidin antineoplastik ajan olduğu rapor edilmiştir. Dahası; farklı mutajen türleri kullanılarak yapılan Ames testinde antimutajenitesi kanıtlanmıştır. 3-hidroksiflavonolun, B(a)P ve diğer hidrokarbonlar tarafından indüklenen mutajeniteyi inhibe ettiği rapor edilmiştir. Edenharter ve ark. heterosiklik aminlere karşı 4.pozisyonda fonksiyonel bir karboksil grubu içeren flavonoidlerin antimutajenik aktivitede son derece önemli rol olduklarını rapor etmiştir (Beudot *et al.* 1998).

2.3.3. α -Tokoferol

Vitamin E sekiz bileşikli bir gruptur (α , β , δ , γ tokoferol ve α , β , δ , γ tokotrienol). Bunlar doyumluk ve yapılarındaki metil gruplarının yerleşimine göre farklılık gösterir. Vücudumuzda en baskın bulunan formu α -tokoferoldur (Lodge 2005).

α -Tokoferol serbest radikal reaksiyonlarının yayılımını engelleyen zincir kırıcı özelliğe sahip bir antioksidant ve yağda eriyebilen önemli bir vitamindir (Ramanathan *et al.* 2005).

Bazı formlarının (vitamin E succinate, tocotrienol) insan kanser hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu ve yine bazılarının da normal insan hücrelerinde

değil de kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir (Cameron *et al.* 2003).

2.3.4. Askorbik asit

Askorbik asit (vitamin C), etkili serbest radikalleri toplayıcı özelliğe sahip bir antioksidanttır ve bilinen birçok mutajene karşı antimutajenik etkisi gösterilmiştir (Gentile *et al.* 1998).

Askorbik asit; α -tokoferolun rejenerasyonunu katkı sağladığı gibi hücresel zararı indükleyen serbest radikalleri yavaşlatmada güçlü bir savunma hattı oluşturduğu için önemli bir rol oynar. Askorbik asit insan kolon kanseri hücrelerinde yetersiz mismatch onarım sisteminde spontan mutasyon oranını azalttığı gözlenmiştir. Başlangıç safhasında hücre siklusunu düzenleyen proteinlerdeki mutasyonlar vasıtasıyla tetiklenen karsinogenesisin en son evresinde, kolorektal adenomlu hastalara vitamin C,E,A'nın ilave edilmesiyle prekanserojen şartların belirleyicisi olabilen hücre kinetiklerindeki anormallikleri indirgediği önemli bir nottur. Ancak yüksek oranda vitamin C'nin alınımı apoptozisi indirgediği için adenomlu hastalarda kontrendike olabilmektedir (Wenzel *et al.* 2004)

2.3.5. Karotenoidler

Koruyucu özelliği bilinen besin faktörleri arasında karotenoidler önemli bir yer tutmaktadır. Sarı ve turuncu renkteki sebze ve meyveler kadar yeşil bitkilerde de bol miktarda bulunmakta ve geniş dağılım göstermektedirler. Domates, havuç, portakaldan elde edilen çeşitli karotenoid fraksiyonlarının antimutajenik etkileri (hidrokarbon karotenoidleri, ksantofiller, karotenoid esterleri) iki farklı mutajenle indüklenmiş *Salmonella* TA98 ve TA100 suşları üzerinde araştırılmış ve tüm bu fraksiyonların antimutajenik etki gösterdikleri kanıtlanmıştır (Raucher *et al.* 1998).

2.4. Kısa Zamanlı Mutajenite Test Sistemleri

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akıllıca yaklaşım deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Bu testlerde, kimyasal maddelerin uygulanmasıyla, deney sonuçlarının alınması arasında geçen sürenin oldukça uzun olmasından dolayı bunlara "uzun zamanlı testler" adı verilmiştir. Uzun zamanlı test sistemlerinin kullanılması istenen bir durum olmakla birlikte, deney hayvanlarına kimyasal verildikten sonra, bu hayvanlarda tümör oluşması oldukça zaman almakta ve bu testlerin maliyeti yüksek olmaktadır (Petek 1999).

Bu nedenle araştırmacılar, karsinojenite taramalarına esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans and Ziger 2000). Bu testler kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemeye yöneliktir. Denemeler veya seri halindeki genotoksik testler; mutasyonlar (genlerin bloke edilmesine veya tek gen değişikliklerine neden olan mutasyonları), klastojenicity (yapısal kromozom aberasyonları), anöploid (sayısal kromozom aberasyonları) olmak üzere insandaki hastalıklarla bağlantılı genetik zararın üç büyük son noktası üzerine etkileri değerlendirmek için geliştirilmiştir (Rovado *et al.* 2004).

Karsinojenlerin taranmasında mutajenitenin esas alınması, iki önemli nedene dayanır:

- Genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu,
- Karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşu (Akın 1990).

Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanları, bakteriyel testlerdir. Bakteriler, basit üreme ortamlarında hızla ürediklerinden, basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmalarından dolayı bakteriyel testler tercih edilmektedir (Mortelmans and Ziger 2000).

Çizelge 2.1. Mutajenitenin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar (Akin 1990)

| Kısa zamanlı testler | İzlenen genetiksel/biyokimyasal yollar |
|---|--|
| 1.Salmonella typhimurium | Histidin okzotrofları |
| 2.Escherichia coli | Arjinin-triptofan okzotrofları Profaj indüksiyonu Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu SOS cevabı |
| 3. Bacillus subtilis | DNA onarımı hatalı suşları |
| 4. Neurospora crassa | Adenin okzotrofları |
| 5. Çin hamsteri ovaryum | HGPRT (Hipoksantin guanin fosforilbozil transferaz) ve akciğer hücreleri ile lokusunda mutasyonlar |
| 6. Fare karaciğer epitel hücreleri | 8-Azaguanine dirençlilik |
| 7. Drosophila melanogaster | Kromozomal hatalar |
| 8. Suriye Hamsteri embriyo hücreleri | Morfolojik transformasyonlar |
| 9. Çin Hamsteri hücreleri,İnsan periferel lenfositleri | Kromozomal hatalar Kardeş kromatit değişimi |
| 10. HeLa hücreleri, fare hepatositleri, insan deri fibroblastları | Programsız DNA onarımı |
| 11. İn vivo DNA sentezi | Hata sıklığının artması |
| 12. Soğan ve fasulye kök hücreleri | Kromozom anormallikleri |

2.4.1. *Salmonella*- mikrozom mutajenite test sistemi

Dr.B. Ames tarafından geliştirilmiş ve Ames testi olarak adlandırılan *Salmonella*-mikrozom test sistemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallarla geçerliliği en fazla kabul edilmiş, kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden bir tanesini oluşturmaktadır (Mortelmans and Ziger 2000). Bu sistem; sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, okzotrofik, histidin aminoasitine ihtiyaç duyan, mutant, *Salmonella typhimurium* test bakterileri kullanılarak yapılmaktadır (Jorgensen *et al.* 1987)

Salmonella- mikrozom testi, başta Amerika Bileşik Devletleri ve Japonya olmak üzere birçok ülke tarafından kullanılmaktadır. Bu test sisteminde kullanılan *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonla elde edilen *Salmonella typhimurium* his⁻ mutantları, his operonunun değişik bölgelerinde değişik birer mutasyon içerir. *Salmonella*-mikrozom testi ile kimyasal maddelerin, bu test suşlarını his⁺ revertantları haline dönüştürme özellikleri saptanmaktadır (Mortelmans and Ziger 2000). *Salmonella*-mikrozom testi başlıca iki varsayıma dayanmaktadır. Bunlardan birincisi, bakteri DNA'sı ile etkileşime girerek mutasyona neden olan ajanların, insan dahil diğer türlerde de muhtemel mutasyonlara yol açma yeteneğinde olabilecekleridir. Bu konudaki ikinci varsayım, mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur.

Salmonella/ mikrozom testinin kullanıma başlandığı 1975 yılından 1982 yılına kadar geçen süre içinde, beş binden fazla kimyasal maddenin mutajenik etkileri araştırılmıştır. Bu test sisteminde, karsinojen olarak bilinen 179 madde teste tabi tutulmuş ve bunlardan 156'sının (%87'si) mutajenik olduğu bulunmuştur. Aynı sistem 117 karsinojenik olmayan maddeyi de %86'lık bir başarı ile nonmutajenik olarak sınıflandırmıştır. Bu değerden anlaşılacağı gibi *Salmonella*/mikrozom testi, karsinojenik maddelerin %13'ünü mutajenik etkili olarak saptayamamaktadır. Diğer taraftan aynı

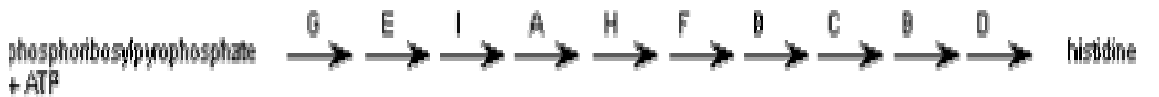
test, nonmutajenik maddelerinde %14'ünü mutajenik olarak tanımlamaktadır (Akın 1990). Ames test sistemi aynı zamanda, kimyasalların mutajen veya kanserojen etkilerini ortadan kaldıran, bu kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyen antimutajenlerin ve antikanserojenlerin tayininde de kullanılmaktadır (Shamberger *et al.* 1979; Rosin and Stich 1978-1979; Alekperov *et al.* 1986; Victorin *et al.* 1987).

Kimyasal kanserojenler veya bunların metabolitleri DNA'ya kovalent olarak bağlanırlar (Miller and Miller 1976). Bu temel ilişki *Salmonella*-mikrozom test sistemi antimutajenlerin araştırılmasını sağlamaktadır. Bir çok doğal ve sentetik bileşiklerin bu test sistemiyle kanserojenlerin genotoksik aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Rosin and Stich 1979; Bahtachariya *et al.* 1987).

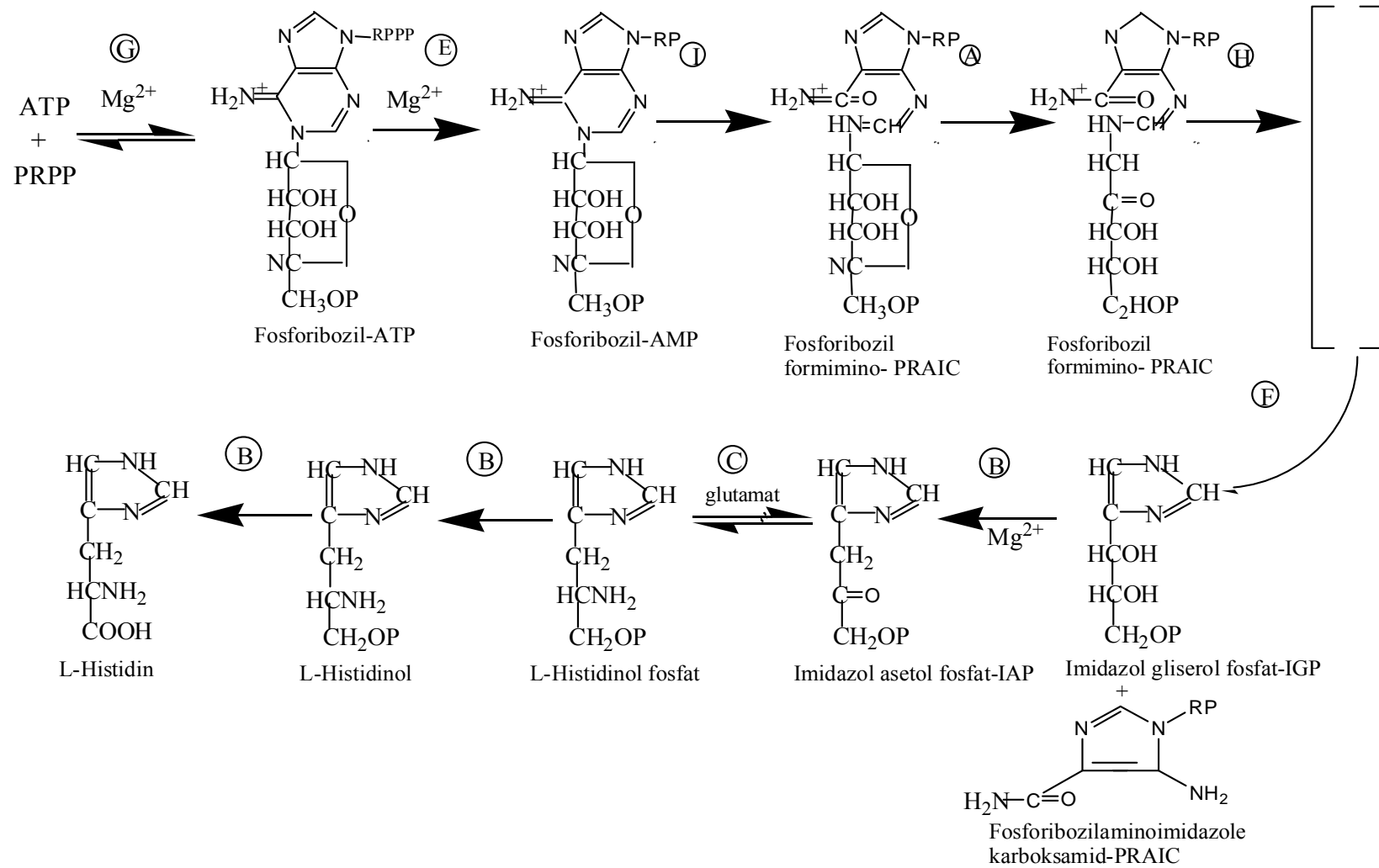
Mutajenite testlerinde kullanılan *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri aşağıda verilmiştir:

2.4.1.a.Histidin gereksinimi

Salmonella/mikrozom mutajenite test sisteminde kullanılan her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar ya DNA'daki tek bir bazın değişmesiyle ortaya çıkan baz değişimleri yada çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Test edilen bileşiğin neden olduğu mutasyonun esas mekanizması, moleküler düzeyde bu suşlarla gösterilebilir (Mortelmans ve Zeiger 2000)



Şekil 2.2. Histidin oluşumu



Şekil 2.3. Kimyasal olarak histidin oluşumu

Salmonella typhimurium his⁻ (histidin gerektiren) mutantların DNA baz dizisi analizleri yapılarak mutasyonların yerleri ve karakterleri saptanmıştır. *S. typhimurium* TA100 ve *S. typhimurium* TA1535 suşlarından saptanan His G46 mutasyonu, histidin biyosentezindeki ilk enzimi kodlayan his G üzerindedir. Bu mutasyon, his G geninde, losin aminoasidin kodonu olan –GAG-, -CTC-, yerine prolin aminoasitinin kodonu olan –GGG-, -CCC-‘nin gelmesine neden olur. *S. typhimurium* TA100 ve *S. typhimurium* TA1535 üzerinde meydana getirilen ve baz çifti değişimine neden olan mutasyon, yine baz çifti değişimine neden olan mutajenler tarafından geri döndürülür (Mortelmans ve Zeiger 2000).

| | wild-type | his G46 mutant | revertant |
|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| DNA | <u>-GAG-</u> -CTC- | <u>-GGG-</u> -GAG- | <u>-CCC-</u> -CTC- |
| mRNA | -CUC- | -CCC- | -CUC- |
| Protein | -leu- | -pro- | -leu- |

Şekil 2.4. Histidin G46 mutasyonu

His D3052 mutasyonu, *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA1538 suşlarında bulunur ve histidin biyosentezindeki son enzim olan ve histidinolu histidine çeviren histidinol dehidrogenazı kodlayan his D geni üzerindedir. His D 3052 mutasyonu çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup, tek bir nükleotidin eksikliği (çerçeve kayması) sonucu oluşmuştur. His D 3052 mutasyonu, His D geni içinde, -GCCGCGCGC-, CGCGCGCG- dizimi olan, 8 kere tekrarlanan GC dizisine sahiptir ve bu dizi -1 çerçeve kayması mutasyon bölgesinin yanında bulunmaktadır (Isono and Yourna, 1974). *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA1538 suşları, çerçeve kayması tipi mutasyonlara neden olan mutajen maddelerle tekrar his⁺ hale geri dönüştürülmektedir (Mortelmans ve Zeiger 2000).

-GCCGCGCGC-
-GCCGCGCGC-

Şekil 2.5. Histidin D3052 mutasyonu

His G428 mutasyonu *S.typhimurium* TA102 ve TA104 suşunda bulunan bir ochre mutasyondur. Bu mutasyon TA102 suşunda pAQ1 plazmidi üzerinde taşınırken TA104 suşunda kromozom üzerinde taşınmaktadır. Bu mutasyon oksidatif hasara sebep olan mutajenlerle geri döndürülebilir (Mortelmans ve Zeiger 2000)

| | wild-type | his G428 mutant | revertant |
|---------|--|--|--|
| DNA | <u>-TTC-GTT-CTC-</u> <u>-AAG-CAA-GAG-</u> | <u>-TTC-ATT-CTC-</u> <u>-AAG-TAA-GAG-</u> | <u>-TTC-GTT-GTC-</u> <u>-AAG-CAA-GAG-</u> |
| mRNA | -AAG-CAA-GAG- | -AAG-UAA-GAG- | -AAG-CAA-GAG- |
| Protein | -lys-gln-glu- | -lys-STOP | -lys-gln-glu- |

Şekil 2.6. Histidin G428 mutasyonu

Başlangıçta geliştirilen his⁻ mutantların çeşitli kimyasallara karşı duyarlılığını artırmak için bu suşlara aşağıda bahsedilen bazı mutasyonlar eklenmiştir.

2.4.1.b. rfa mutasyonu

Bu mutasyon, bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir. rfa mutasyonu, bakteri yüzeyini kaplayan lipopolisakkarit bariyerinin kısmen yok olmasına neden olur ve sonuçta normalde hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllerin memeli hücrelerinde olduğu gibi hücreye girişi kolaylaştırılır. *Salmonella*/mikrozom testinin amacı, kimyasal maddelerle bakteri DNA'sını karşı karşıya bırakmak ve mutasyon yapabilme özelliklerini saptamaktır (Mortelmans and Zeiger 2000).

2.4.1.c. uvrB mutasyonu

DNA onarım sisteminde kesip çıkarma (excision repair) görevini üstlenen enzimi kodlayan uvrB geninin delesyonu ile oluşmuştur. uvrB mutasyonu, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak, teknik nedenlerden ötürü bu delesyon ile birlikte istenmeden, biyotin ve nitroredüktaz enzimini kodlayan chl genleri de delesyona uğramıştır. Nitroredüktaz enzimi, nitrofurojone ve furilfuramid gibi birçok nitro grubu kanserojenlerin aktivasyonuna olanak vermekte ve tayin edilebilmelerini sağlamaktadır. Bu kanserojenlerin *Salmonella* mutasyon testinin tayin edilebilmeleri için memeli nitroredüktaz enzimine gerek duyulmaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000). Biyotin (bio) geni ise vitamin H denilen biyotinin sentezinden sorumludur (Mortelmans and Zeiger 2000). Biyotin geni, delesyona uğradığından, test bakterilerinin üreyebilmesi için ayrıca biyotin vitaminine gerek vardır.

2.4.1.d. R faktörü

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. typhimurium* TA1538 ve TA1535 suşlarına, ampisiline dirençlilik geni taşıyan pKM101 R faktörü plazmidinin eklenmesiyle *S. typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları elde edilmiştir (Mortelmans and Zeiger 2000). R faktörü plazmidi içeren suşların mutajenik olduğu gösterilmiş ajanlara karşı cevapları, plazmidi içermeyen suşlara göre oldukça yükselmiştir. Plazmit içeren yeni suşlar, gerçekte mutajen özellikte olup da orijinal suşlarla zayıf ya da mutajen olmayan ajanlara karşı net bir pozitif cevap vermişlerdir. pKM 101 plazmidi bu suşların daha duyarlı olmasından sorumlu olan hata oranı yüksek (error-prone repair) onarım sistemiyle bağlantılı gen ürünleri içermektedir. Daha sonraki yıllarda, mutajenik özgülüğü *S.typhimurium* TA 1537 ile aynı olan, ancak pKM 101 plazmidi taşıdığı için çerçeve kayması mutajenlerine karşı ondan daha duyarlı olan *S.typhimurium* TA 97 suşu geliştirilmiştir (Mortelmans and Zeiger 2000). Oksidatif mutajenleri belirlemek amacıyla ile de, yeni bir suş olan *S.typhimurium* TA102 suşu geliştirilerek kullanıma sunulmuştur. Bu suшта hisG 428 mutasyonu ve bir tetrasiklin dirençlilik geni taşıyan pAQ1 plazmidi bulunmaktadır. Ames testine daha sonra sıçan karaciğer 9000xg

supernatantını ve kofaktörlerini içeren aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000).

Çizelge 2.2. Salmonella/ mikrozom test sisteminde yaygın olarak kullanılan test strainlerinin genotipleri (Mortelmans ve Zeiger 2000).

| Suş | Histidin Mutasyonu | LPS | Onarım | pKM 101 | Mutasyonun Niteliği |
|--------|---------------------|-----|--------|---------|-----------------------|
| TA1535 | his G46 | rfa | uvrB | - | AT→GC transisyon |
| TA1537 | his C3076 | rfa | uvrB | - | C.....C yanında +1 |
| TA1538 | his D3052 | rfa | uvrB | - | CG.....CG yanından -1 |
| TA98 | his D3052 | rfa | uvrB | + | CG yanından -1 |
| TA100 | his G46 | rfa | uvrB | + | AT→GC transisyon |
| TA97 | his D6610 | rfa | uvrB | + | CCC yanına +4 |
| TA102 | PA Q1 his G428/Δhis | rfa | uvrB | + | GC ochre AT |

2.4.1.e. S9 fraksiyonu (Metabolik aktivasyon sistemi)

Aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bazı kanserojenik kimyasallar aktif formlarına metabolize edilmedikleri müddetçe biyolojik olarak inaktiftirler (Mortelmans and Zeiger 2000). Yani prokarsinojenler mutasyona neden olan DNA'ya kovalent olarak bağlanma yeteneğindeki elektrofilik bileşiklerin enzimatik transformasyonuna kadar inaktif halde kalır (Hakura *et al.* 1999). İnsanlarda ve yüksek yapılı canlılarda bulunan P450 sitokrom aktivasyon sistemi bu enzimleri metabolize edebilme yeteneğindedir. Sitokrom P450 aktivasyon sistemi akciğer ve böbreklerde çok düşük, karaciğerde ise yüksek düzeyde bulunmaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000).

Ames testinde kullanılan bakteriler bu sisteme sahip olmadığı için memeli exogenous organ aktivasyon sisteminin test kimyasalları ve bakterilerle birlikte petri platelerine ilave edilmesi gerekir.

Metabolik aktivasyon sistemi; fenobarbital, 5,6- benzoflavon veya karaciğer enzim aktivitesini indükleyen Aroclor 1254 ile beslenen sıçan karaciğerden elde edilir (Mortelmans and Zeigers 2000).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Antimutajenite potansiyeli araştırılan bitki ekstraktları

3.1.1.a. Bitkilerin toplanması ve adlandırılması

Artemisia absinthium, *Achillea millefolium*, *Helychrysum pilicatum*, *Nepeta racemosa*, *Origanum vulgare*, *Salvia nemerosa*, *Salvia verticillata*, *Salvia limbata*'nın yetiştiği lokaliteler ve çiçeklenme dönemleri tespit edildi. Bitkilerin teşhisine yardımcı olacak farklı boyutlardan fotoğrafları çekildi. Örneklerin toprak üstü yapıları (gövde, yaprak ve çiçek) ilgili lokalitelerden toplandı. Araziye gerekli notlar tutularak bitkilerden tip örnekler tanılamak için ayrıldı. Toplanan bitkiler temiz torbalara konarak kurutulma işleminin yapılacağı yere getirildi. Adlandırma işleminde, temel kaynak olarak, DAVIS (1988)'in "Flora of Turkey and The Aegean Island" adlı eserinden yararlanıldı. Teşhis işlemleri, Meryem ŞENGÜL (Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından yapıldı. Türlerin adlandırılmasından sonra bitkilerin herbaryum için gerekli olan, toplandığı habitat, yükseklik, toplama tarihi, toplayıcı adı ve numarası bilgileri not alınarak herbaryum numaraları verildi. Teşhis edilen türlerin örnekleri Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda (ATA Herbaryumu) mevcuttur. Çalışılan bitkilerin adları ve toplandıkları lokaliteler aşağıda verilmiştir.

**Achillea millenfolium*

A8 Erzurum-Bayburt arası, taşlık ve yamaç yerlerden 17.06.2004 ve 20.06.2005 tarihlerinde toplanmıştır (ATA HERB 9789).

**Artemisia absinthium*

A8 Aşkale- Kop Dağı arası, taşlık ve yamaç yerlerden 17.06.2004 ve 20.06.2005 tarihlerinde toplanmıştır (ATA HERB 9578).

**Helychrysum pilicatum*

A8 Aşkale- Kop Dağı arası, taşlık ve yamaç yerlerden 17.06.2004 ve 20.06.2005 tarihlerinde toplanmıştır (ATA HERB 9562).

**Nepeta racemosa*

A8 Aşkale- Kop Dağı arası, taşlık ve yamaç yerlerden 17.06.2004 ve 20.06.2005 tarihlerinde toplanmıştır (ATA HERB 9632).

**Origanum vulgare*

A8 Oltu- Erzurum arası, taşlık ve yamaç yerlerden 10.06.2004 ve 17.06.2005 tarihlerinde toplanmıştır (ATA. HERB. 9731).

** Salvia nemerosa*

A8 Erzurum-Pasinler ve Erzurum-Dumlu arası, taşlık ve yamaç yerlerden 08-09.07.2004 ve 03-04.07.2005 tarihinde toplanmıştır (ATA.HERB 9775).

** Salvia limbata*

A8 Oltu- Erzurum ve Tortum-Uzundere arası, taşlık ve yamaç yerlerden 14-15.06.2004 ve 19-20.06.2005 tarihlerinde toplanmıştır (ATA.HERB 9776).

** Salvia verticillata*

A8 Erzurum-Bayburt ve Tortum-Uzundere arası, taşlık ve yamaç yerlerden 12-13.06.2004 ve 18-19.06.2005 tarihlerinde toplanmıştır (ATA.HERB 9777).

3.1.1.2. Bitkilerin Kurutulması ve Sekonder Metabolitlerin Eldesi

Toplanan bitkiler doğrudan güneş ışığı almayan ve hava akımı bulunan serin bir ortamda kurutuldu. Kurutulan bitkiler öğütüldükten sonra özütleri hazırlandı. Bunun için artan polariteye göre özütleme yöntemi kullanıldı. Öğütülmüş bitkisel materyal soxalet ile öncelikle hekzan ile 16-18 saat daha sonra da diklorometan ile 6 saat özütlendi. Böylece non-polar kısımlar, hekzan ve diklorometan fazları ayrıldı. Son aşamada ise metanol ile özütlenip su ve kloroform fazlarına ayrıldı. Böylece non-polar ve polar fazlar kademeli olarak elde edildi. Elde edilen özütler evaporatör yardımı ile çözücülerden ayrılarak kuru ve saf olarak buzdolabında saklandı (Sökmen vd 1999).

3.1.2. Kullanılan test suşları

Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1538 mutant suşları ATCC (The American Type Culture Collection-Georgetown University, Bacteria Department, Washington,U.S.A)'den sağlanmıştır. (ATCC® Number: 29629, 29631)

3.1.3. Pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler

Antimutajenite tayininde kullanılan pozitif mutajenler; sodyum azid(NaN_3), 4-Nitro-1-quinoline oksit Sigma'dan sağlanmıştır. Bacto agar, Difco nutrient broth, nutrient agar, Difco'dan; Oxoid nutrient broth Oxoid'den; magnezyum sülfat (MgSO_4), sodyum amonyum fosfat ($\text{Na}_2\text{NH}_2\text{PO}_4$), D-glukoz, L-histidin, D-biyotin, sodyum klorit (NaCl), L- histidin.HCl, sodyum fosfat (Na_2HPO_4 -dibasic-anhidroz), kristal viyole Sigma'dan; sitrik asit monohidrat, Merck'den; potasyum fosfat (K_2HPO_4 -dibasic-anhidroz) Fluka'dan; sodyum fosfat (NaH_2PO_4 -monobasic-anhidroz), Riedel-de-Haën'den sağlanmıştır.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Otoklav (Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)

İnkübatör (Nüve, TÜRKİYE, ES 500, SN 03-0591)

Steril Kabin

Magnetik Karıştırıcı (Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083)

Derin Dondurucu (Nuaire, U. S. A, -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK)

Hassas Terazi (Scaltec, GERMANY, SPB42, SN SPB42-90908239)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)

Saf Su Cihazı (Ateks, 7x35, Eu)

Mini Karıştırıcı (IKA, U.S.A., M51, SN 03017581)

Shaker (Gerhardt Bonn, SWITCH, IP20, Thermoshake Typ2)

Vortex (IKA, U.S.A., MS2)

Mikrodalga fırın (Arçelik, TÜRKİYE, MD592)

Benmari (Memmert, Schwabach, 854)

pH Metre (Hana, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202)

U.V. Spektrofotometre (Shimadzu, RC 232C)

3.1.5. Stok çözeltiler ve besi ortamları

Vogel-bonner medyum E (50×VB tuzları): Minimal glukoz agar (bottom-alt agar)'lı ortam için kullanıldı.

| | <u>1000ml. için</u> |
|---|---------------------|
| Distile su (yaklaşık 50 °C) | 650 ml |
| Magnezyum sülfat (MgSO ₄) | 8,7 g |
| Sitrik asit monohidrat | 100 g |
| Potasyum fosfat, dibasic, anhidroz, (K ₂ HPO ₄) | 500 g |
| Sodyum amonyum fosfat, tetra hidrat, (Na ₂ NH ₂ PO ₄) | 175 g |

Belirtilen maddeler yaklaşık 50°C'deki belli bir miktar saf su içerisinde, magnetik bir karıştırıcı üzerinde birinin tam olarak çözüldüğünden emin olunduktan sonra diğeri katılmak suretiyle sürekli karıştırılarak çözünür. Bu çözünme işlemi yaklaşık bir saat sürer. Sonra su miktarı 1000ml tamamlanır. Cam tüplere 20ml'lik hacimlerde dağıtılır. 121°C'de 30 dk otoklav edilir ve karanlıkta oda ısısında muhafaza edilir.

%10'luk Glukoz solüsyonu: Minimal glukoz agarlı ortam için hazırlandı.

| | <u>1000 ml için</u> |
|------------|---------------------|
| Distile su | 1000 ml |
| D-glukoz | 100 g |

Belli bir miktar distile su içerisine glukoz katılır ve magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Son hacim 1000ml tamamlanır. 50ml hacimlerde cam tüplere dağıtılır ve 121°C'de 20dk otoklav edilir. +4°C'de muhafaza edilir.

Minimal glukoz agarlı ortam: Antimutajenite deneylerinde bottom (alt) agar olarak kullanıldı.

| | <u>1000 ml için</u> |
|--------------------------|---------------------|
| Distile su | 930 ml |
| Difco agar | 15 g |
| 50×VB tuzları | 20 ml |
| %10'luk glukoz solüsyonu | 50 ml |

15gr agar tartılıp 2 litrelik erlene konulduktan sonra üzerine 930ml distile su ilave edilir. Karışım otoklavda 121°C'de 30dk otoklav edilir. Otoklavdan çıkarılır, yaklaşık 45-65°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine daha önceden steril edilmiş 20ml 50×VB tuzları ve 50ml %10'luk glukoz solüsyonu ilave edilir, hafifçe karıştırılır. Petrilere yaklaşık 25-30ml olacak şekilde dökülür. Oda sıcaklığında saklanır.

0.5 mM Histidin/ Biotin solüsyonu: Antimutajenite deneylerinde top (üst) agarı ilave edilmektedir.

| | <u>1000ml için</u> |
|------------------------------|--------------------|
| Distile su | 1000 ml |
| D- Biotin (MA.247) | 124 mg |
| L – Histidin.HCl (MA. 191.7) | 96 mg |

Kaynama sıcaklığındaki distile suya biotin ve histidin ilave edilir ve manyetik karıştırıcı üzerinde çözününceye kadar karıştırılır. 0,45µM membran filtre kullanarak steril edilir ve 4°C'de saklanır.

Top (üst) agar: Alt agar (minimal glukoz agarlı ortam) yüzeyine bakteri, mutajen, bitki ekstraktı ve S9 mix veya buffer solüsyonunu yaymak için kullanılmıştır.

| | <u>1000 ml için</u> |
|-----------------------|---------------------|
| Distile su | 900 ml |
| Agar | 6 g |
| Sodyum klorit (NaCl) | 6 g |

Karışım otoklavda 121°C'de 30dk steril edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

0.1 mM, pH 7.4 Sodyum fosfat buffer; S9 ilavesinin yapılmadığı, direkt mutajenler kullanılarak gerçekleştirilen antimutajenite çalışmalarında kullanılmıştır.

1000 ml için

| | |
|--|--------|
| Sodyum fosfat (NaH ₂ PO ₄ -monobasic-anhidroz) | 120 ml |
| (1000 ml distile suya 11.9 gr NaH ₂ PO ₄ ilave edilir.) | |
| Sodyum fosfat (Na ₂ HPO ₄ -dibasic-anhidroz) | 880 ml |
| (1000 ml distile suya 12.6 gr Na ₂ HPO ₄ ilave edilir.) | |

İki madde belirtilen miktarlarda karıştırıldıktan sonra dibasic sodyum fosfat kullanılarak pH 7.4 olarak ayarlanır. Cam tüplere dağıtılarak 121°C'de 30dk otoklavda steril edilir, oda sıcaklığında saklanır.

Nutrient broth: Test strainlerinin gecelik kültürlerinin eldesi için kullanılmıştır.

1000 ml için

| | |
|----------------------------|---------|
| Distile su | 1000 ml |
| Oxoid nutrient broth No: 2 | 23 g |

1000ml distile su içerisine 23g nutrient broth (Oxoid, No:2) ilave edilir. 50ml erlenlere 20ml olarak dağıtılır, otoklavda 121°C'de 20dk steril edilir. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Nutrient agar: Tek koloni eldesi, test strainlerindeki rfa mutasyonunun tespiti ve bakterilerin canlılığının kontrol edilmesi amaçları için kullanılmıştır.

1000 ml için

| | |
|---------------------|---------|
| Distile su | 1000 ml |
| Difco nutrient agar | 28 g |

1000ml distile su içerisine 28g difco nutrient agar ilave edilir. Besiyeri otoklavda 121 °C’de 30dk steril edilir. 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılır ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

% 0.1’lik Kristal viyole solüsyonu: Test suşlarındaki rfa mutasyonunun doğrulanması için kullanılmıştır.

| | <u>100 ml için</u> |
|----------------|--------------------|
| Distile su | 100 ml |
| Kristal viyole | 100 m |

Kristal viyole distile 100ml distile suda iyice çözülür. +4°C’de güneş ışınlarından korumak için siyah şişe içerisinde saklanır.

% 0.01’lik biyotin solüsyonu: Strainlerin biyotine gereksinmelerinin kontrolü için kullanılmıştır.

| | <u>100 ml için</u> |
|------------|--------------------|
| Distile su | 100 ml |
| D- Biotin | 10 g |

Sıcak suya biyotin ilave edilir, çözününceye kadar karıştırılır. 0.45µm filtreden geçirilerek steril edilir ve +4°C’de muhafaza edilir.

%5’lik histidin solüsyonu: Strainlerin genetik işaretlerinin kontrolü için minimal glukoz agar ortamına ilave edilmiştir.

| | <u>100 ml için</u> |
|--------------|--------------------|
| Distile su | 100 ml |
| L – Histidin | 500 g |

Histidin distile su içerisinde iyice çözüldükten sonra 121°C’de 15dk steril edilir. +4°C’de muhafaza edilir.

3.2 Yöntem

3.2.1. *Salmonella*/mikrozom test sisteminde kullanılan suşların genetik özelliklerinin kontrolü

3.2.1.a. Histidin gereksinimi

Test suşlarının his⁻ özelliği, minimal glukoz agar petrilere ekilmeleri yoluyla kontrol edildi. Suşlar; uvrB delesyonu nedeniyle histidine ek olarak biyotine de gereksinim duydukları için histidin/ biyotin içeren ve sadece biyotin içeren histidinsiz minimal glukoz agar petrilere ekildi. Suşların histidin varlığında üreyip, histidin yokluğunda ürememeleri his⁻ karakteri doğrulamaktadır.

Bu genetik işaretin kontrol edilmesinde kullanılan minimal glukoz agarlı petrilere; 20ml 50×VB tuzları, 50ml %10'luk glikoz solüsyonu, 8ml %0.5'lik histidin solüsyonu, 8ml %0.01'lik biyotin solüsyonu, 15gr agar, 900ml distile su kullanılarak hazırlandı. Histidinsiz minimal glukoz agarlı petrilere sadece histidin solüsyonu ilave edilmedi.

3.2.1.b. rfa mutasyonunun kontrolü

Test suşlarının gecelik kültüründen alınan 0.1ml'lik örnekler, nutrient agarlı petrilere ekilip yayıldı. Filtre kağıdından hazırlanmış ve 10µl kristal viyole çözeltisi (1mg/ml) emdirilmiş diskler, petrilere ortasına yerleştirildi. Petrilere bir gece 37°C'de inkübe edildikten sonra diskin etrafında inhibisyon zonu gözlemlendi. Diskin çevresindeki şeffaf bölge, büyük molekül olan kristal viyolenin bakteri içerisine girip, onu öldürmesine izin veren rfa mutasyonunun varlığının göstergesidir.

3.2.1.c. uvrB mutasyonunun kontrolü

Bu mutasyonun varlığı ultraviyole ışınlarla duyarlılık testi ile ölçüldü. Test suşlarının gecelik kültüründen öze ile alınan örnekler, nutrient agarlı petrilere ekilip yayıldı. Petri kaplarının kapakları açılıp yarısı kapatılarak 30 wattlık U.V. lambası altında 10 saniye ışınlandı. Işınlanan plaklar, 37°C' de bir gece inkübe edildildi. U.V. ışınına maruz kalan petrinin kapatılmayan kısmında üreme olmazken kapalı olan kısımda üremenin gözlenmesi suşların uvrB mutasyonuna sahip olduğunu göstermiştir.

3.2.1.d. Kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü

Test suşlarının, histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden dönüş yaptığımız çalışmalarda sürekli olarak ölçüldü ve her petride kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısı olarak ifade edildi. Kendiliğinden geriye dönüş frekanslarını saptayabilmek için minimal glukoz agarlı petrilere hazırlandı. %0.6 agar, %0.5 NaCl içeren 100ml'lik top agar 45°C'deki su banyosunda eritilerek üzerine steril L - Histidin.HCl /D- Biotin çözeltisinden 10ml eklenerek cam tüplere dağıtıldı. Her bir suş için ayrı olmak üzere cam tüplere suşların gecelik kültüründen de 100µl ilave edildi ve minimal glukoz agarlı petrilere dökülüp yayılması sağlandı. 37°C'de 48h inkübe edilerek geriye dönen kolonilerin sayımı yapıldı.Bu deney bir çok kez tekrarlandı ve ortalama değerler alındı.

3.2.1.e. Mutajenlerin sitotoksitelerinin araştırılması:

Ames tekniğinde toksiditenin değerlendirilmesi 48h inkübasyondan sonra minimal glukoz agar besiyeri üzerindeki son bakteri popülasyonunun karakteristiklerinin değerlendirilmesidir. Bu karakteristikler;

- Besiyeri üzerindeki geri dönen koloni sayısının az veya hiç olmaması
- Besiyeri üzerinde çok sayıda küçük non-revertant kolonilerin varlığı

Bir gecelik Salmonella nutrient broth kültürler; çok sayıda histidine bağımlı bakterinin yanı sıra birkaç tane histidinden bağımsız bakteriyi de (bunlar inkübasyon esnasında oluşur) içerir. Top agara çok az miktarda histidinin ilave edilmesi petrideki $\sim 10^8$ bakterinin histidin tükeninceye kadar 6-8 arasında hücre bölünmesine uğramasına neden olur. Bu sınırlı büyüme mutagenезisin mutasyonel lezyonlara yerleşmesi açısından son derece önemlidir. Böylelikle his⁻ bakterilerin his⁺ hale dönüşerek gözle görülebilen koloniler oluşturacaktır. Bu his⁺ bakteriler; histidine bağımlı bakterilerin oluşturduğu mikrokolonileri içeren hafifçe bulutlu gibi gözükten zeminde(background lawn) kolaylıkla sayılabilirler. Ancak ortama toksik bir kimyasal konulduğunda petrideki bakteriler toksiditenin dozuna göre ya tamamen ölürlere yada 'thinning' etki denilen seyrelme gözlenebilir. Thinning etkide koloniler çıplak gözle görülemeyecek kadar küçüktür. Böyle dozlar çalışmada kullanılmamalıdır.

Bir diğer durum ise; çok sayıda küçük non-revertant kolonilerin varlığıdır. Bu koloniler yüksek kimyasal toksiditeye maruz kalmasına rağmen hayatta kalan histidine bağımlı bakterilerin oluşturduğu 'pinpoint koloniler' olarak kabul edilirler. Bu koloniler çıplak gözle çok rahat görülebildiklerinden his⁺ kolonilerle karıştırılabilir.

Bütün bu durumları önlemek için çalışmada kullanılan mutajenlerin bakteriler için toksik olmayan dozu belirlenmelidir. Bu amaçla üst agara 0.1ml bakteri kültürü ve 0.05 ml olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Karışım, minimal glukoz agarlı petrilere dökülerek 37°C'de 48 h inkübe edilmiştir.

3.2.1.6. Test suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerin hazırlanması

Salmonella test strainlerinin uzun süreli saklanması -80°C'de dondurulması ile sağlanır. Genetik işaretleri doğrulanan test suşları, nutrient broth ortamda ml'sinde $1-2 \times 10^9$ (veya $\sim 10^8$) bakteri bulunacak şekilde çoğaltılır (540 nm absorbans da 0.1-0.2 arası). Bakteri kültürüne, kültürün her ml'si için 0.09ml olacak şekilde spektrofotometrik saflıkta DMSO ilave edilir ve yavaşça karıştırılır. Ependorf tüplere 1'er ml dağıtılır.

Tüpler hemen kuru buz içerisinde yerleştirilerek ~ 30dk bekletildikten sonra -80°C'lik derin dondurucuya yerleştirilir. Test suşları, bu şekilde üç yıl saklanabilmektedir.

Her deneme için test strainlerin gecelik kültürleri ml'sinde $1-2 \times 10^9$ yoğunluğunda olacak şekilde nutrient broth ortamında geliştirilmelidir. Kültür flaskları her bir test strainiyle inoküle edilir. Şayet donmuş stok kültürler kullanılacaksa oda sıcaklığında eritildikten sonra sıvı besiyerinin %1'ini oluşturacak şekilde kültüre ilave edilir. Stok kültürün geri kalanı ise atılmalıdır. Bu taze inoküle edilmiş kültürler çalkalama olmaksızın oda sıcaklığında karanlıkta çalkalayıcıda 4h bekletilir. Sonra 37°C'de hafif çalkalayarak 11-14h çalkalayıcıda inkübe edilir. Çalkalayıcıdan çıkardıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edilir.

3.2.2. Antimutajenite testi (AMES/ *Salmonella* mikrozom testi):

AMES/ *Salmonella* mikrozom test sistemini çalışırken 'standart plate incorporation' yöntemini kullandık. Bu teknikte; bitki ekstraktı, mutajen, bakteriyel test suşu ve sodyum fosfat buffer top agara ilave edilerek minimal glukoz agarlı besiyerine dökülmektedir (Mortelmans and Zeiger 2000). 37°C'de 48-72h inkübasyondan sonra his⁺ haline dönüşen koloniler sayılır.

Bu yöntemde; histidin ve biyotin eklenmiş 43°C'deki 2ml'lik top agara, bitki ekstraktından 50µl, mutajen maddeden 50µl, sodyum fosfat bufferdan 500µl eklenir ve 3sn düşük hızda vortekslenerek minimal glukoz agarlı petrilere yayılmıştır. Top agarın düzenli bir şekilde yayılmasını sağlamak için petriler düzgün bir zemin üzerine yerleştirilmiştir. Top agarın petrinin bütün yüzeyine yayılmasını sağlamak için karıştırma, dökme ve yayma işlemlerinin tümü 20sn'den az bir sürede yapılmıştır. Her deneyde mutlaka pozitif ve negatif kontroller kullanılmaktadır. Negatif kontrol olarak top agara sadece çözücü ilave edilirken, pozitif kontrol olarak sadece mutajen ilave edilmiştir.

3.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi:

Çalışmamızda denemeler üç tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen değerler % inhisyon ve SPSS 11.0 istatistik programı kullanılarak ANOVA ve Tukey testleri ile analiz edilerek tablo halinde sunulmuştur.

Salmonella mikrozom test sisteminde elde ettiğimiz sonuçları değerlendirilirken % inhibisyonu aşağıdaki formülü kullanarak hesapladık;

$$\% \text{ inhibisyon} = \left[1 - \frac{T}{M} \right] \times 100$$

T→ Mutajen ve bitki ekstraktı varlığında geri dönen koloni sayısı

M→ Sadece mutajen varlığında geri dönen koloni sayısı

Bitki ekstraktının mutajen üzerindeki inhibitör etkisi %20-40 arasında olduğu durumlarda antimutajenik etki orta dereceli olarak tanımlanırken; %40'dan fazla olduğu durumlarda bitki ekstraktı güçlü antimutajenik olarak kabul edildi. İnhibitör etkinin %20'den daha az olduğunda ise antimutajenik etki pozitif olarak kabul edilmedi (Negi *et al.* 2003)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Test bakterilerinin genotiplerinin kontrolü

Çalışmamızda kullandığımız *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1538 suşlarının genetik işaretleri materyal ve metotta belirtildiği gibi kontrol edildi.

4.1.1. Histidin mutasyonun kontrolü

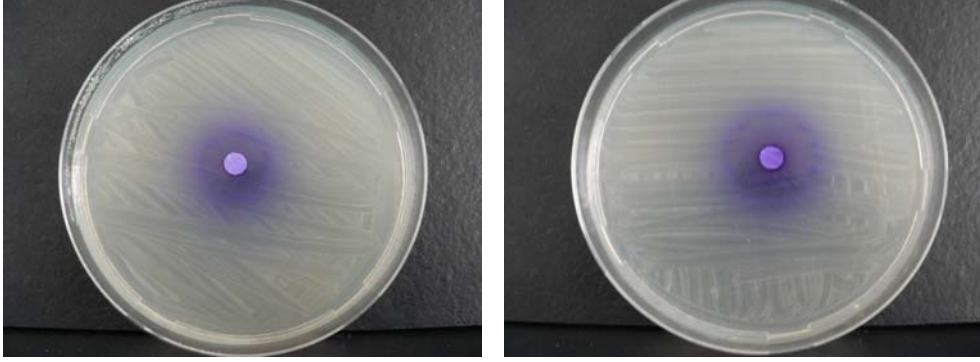
Salmonella typhimurium TA1535 ve TA1538 suşları histidin\biyotin içeren minimal glukoz agarlı petrielerde üredi. Test bakterileri, biyotin içeren histidinsiz minimal glukoz agarlı petrielerde üremedi. Suşların his⁻ karakteri doğrulandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1538 suşunda histidin gereksiniminin gösterilmesi

4.1.2. rfa mutasyonunun kontrolü

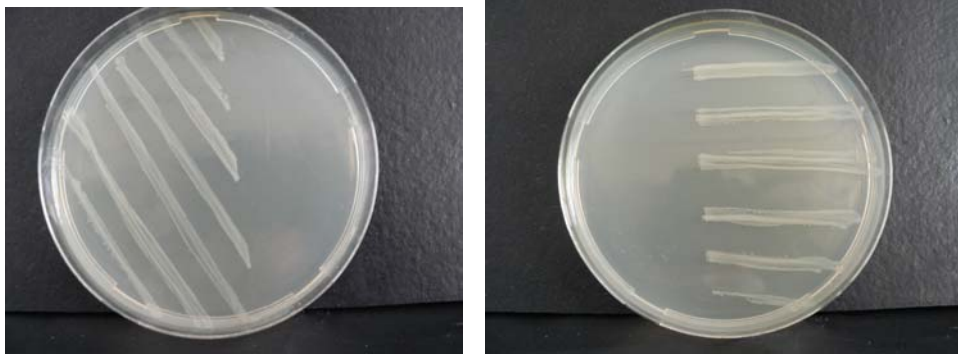
Nutrient agarlı besiyeri ortamında üretilen test suşlarının kristal viyole disklerinin çevresinde üremediği gözlemlendi. Bu rfa mutasyonunun varlığını doğrulamaktadır (Şekil 4.2)



Şekil 4.2. *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1538 suşunda rfa mutasyonunun gösterilmesi

4.1.3. uvrB mutasyonunun kontrolü

Suşlar nutrient agarlı besiyerine ekildikten sonra petri kaplarının kapakları açılıp yarısı kapatılarak 30 wattlık U.V. lambası altında 10 saniye ışınlandı. U.V. ışınına maruz kalan petrinin kapatılmayan kısmında üreme olmazken kapalı olan kısımda üreme gözlemlendi. Test suşlarının uvrB mutasyonu taşıdıkları doğrulandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1538 suşunun ultraviyole duyarlılık testi

4.1.4. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı kontrolü

Test bakterilerinin histidinsiz minimal glukoz agarlı petrielerde kendiliğinden geriye dönen his⁺ revertantlar gözlemlendi.

Test suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları her denemede rutin olarak belirlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Mutant suşların kendiliğinden geri dönen koloni sayısı

| <i>Salmonella typhimurium</i> mutant suşlar | Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı |
|---|--|
| TA1535 | 13 ± 2.98 |
| TA1538 | 20.33 ± 3.52 |

* ortalama değer ± standart hata

4.2. Mutajenlerin sitotoksitelerinin belirlenmesi

Çalışmada mutajen olarak kullandığımız sodyum azid ve 4-Nitro-1-quinoline oksit bakteriler için toksik olmayan dozu belirlendi. Elde ettiğimiz verilere göre mutajenleri; 1µg\petri sodyum azid, 0.2µg\petri 4-Nitro-1-quinoline oksit dozlarında kullandık.

4.3. Çalışılan bitkilerin antimutajenik özelliklerinin belirlenmesi

Origanum vulgare, *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium*, *Helychrysum pilicatum*, *Salvia nemerosa*, *Salvia limbata*, *Salvia verticillata*, *Nepeta racemosa*'nın antimutajenik aktivitelerinin araştırılması için yaptığımız antimutajenite deneylerinde bitki ekstraktları bakteriler üzerine üç ayrı dozda uygulandı; 5µg/petri, 0.5µg/petri, 0.05µg/petri. Ayrıca her çalışmamızda denemeler üç tekerrürlü olarak yapıldı.

O. vulgare her üç dozda önemli antimutajenik aktivite gösterirken inhibisyon etki doza bağımlı olarak değişmiştir. Sodyum azid tarafından indüklenen *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerinde; 5µg/petri ve 0.05µg/petri dozları sırasıyla %24 ve %27 inhisyonla orta derecede antimutajenik etki gösterirken, 0.5µg/petri dozu %40 inhibisyonla güçlü antimutajenik etki göstermiştir. 4NQO mutajenine karşı önemli antimutajenik etkiye sahip olduğu (p < 0.05) Anova ve Tukey testleri ile tespit edilmiş, fakat inhibisyon etki %20'in altında kalmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.4, 4.10, 4.11).

H. pilicatum her iki bakteri suşunda sadece 5µg/petri dozunda sırasıyla %36 ve %22 inhisyonla orta dereceli antimutajenik etki göstermiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.5, 4.10, 4.11).

Salvia nemerosa ise sadece sodyum azidle indüklenmiş *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerinde 5µg/petri dozunda %27 inhibisyonla orta derecede antimutajenik etki göstermiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.8, 4.12, 4.13).

S. verticillata *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerinde uygulanan hiçbir dozda antimutajenik etki göstermezken; TA1538 suşunda mutasyonu indükleyen 4NQO üzerinde ise 0.5 ve 0.05µg/petri dozlarında sırasıyla %33 – 27 oranında inhibisyon etki göstermiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.7, 4.12, 4.13).

A. millefolium sadece *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerine ve 5µg/petri dozunda %37 inhibisyon etkiyle orta derecede antimutajenik etki göstermiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.9, 4.12, 4.13).

A. absinthium'un sodyum azid mutajenine karşı 5 ve 0.5µg/petri dozlarında sırasıyla %31-38 oranında inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bitkinin 4NQO mutajenine karşı etkisi ise 5µg/petri dozunda sadece p<0.05 önem aralığında önemli bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ışığında *A. absinthium*'un sadece *S.typhimurium*

TA1535 suşu üzerinde orta derecede antimutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.6, 4.10, 4.11).

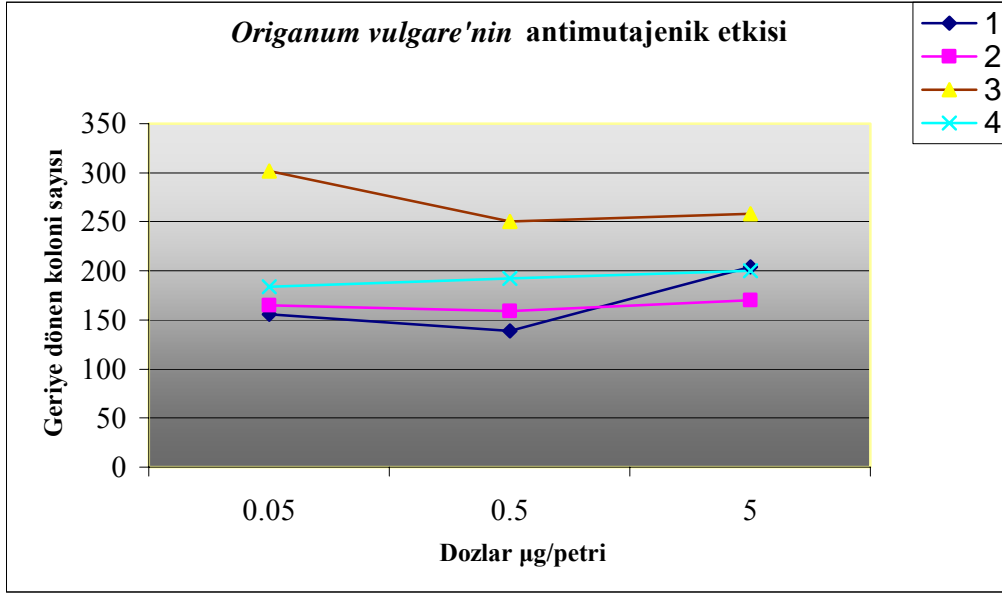
S. limbata ve *N. racemosa* her iki suş üzerinde ve uygulanan her üç dozda da hiçbir antimutajenik aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.2, 4.3, Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13).

Çizelge 4.2. *S. typhimurium* TA1535-TA1538 suşlarının *O. vulgare*, *H. pilicatum*, *N.racemosa*, *A.absinthium* bitki ekstraktları ile AMES/*Salmonella*- mikrozom testinden elde edilen sonuçlar

| Test edilen bitkiler | Konsantrasyon (µg\ petri) | Geriye dönen (revertant) koloni sayısı | | | |
|------------------------------|---------------------------|--|--------------|--------------------------------|--------------|
| | | Salmonella typhimurium TA 1535 | | Salmonella typhimurium TA 1538 | |
| | | Ortalama ± S.hata | % inhibisyon | Ortalama ± S.hata | % inhibisyon |
| Negatif kontrol | - | 34,67 ± 4,22 | - | 10,25 ± 1,31 | - |
| Pozitif kontrol | | | | | |
| 4NQO | 0,2 µg\ petri | | | 196,5 ± 10,01 | - |
| NaN ₃ | 1 µg\ petri | 255,0 ± 11,81 | - | | |
| <i>Origanum vulgare</i> | 5 µg\ petri | 204,33 ± 11,57 * | 24 | 170,66 ± 1,33 * | - |
| | 0,5 µg\ petri | 139,67 ± 35,67 * | 40 | 159,33 ± 9,83 * | - |
| | 0,05 µg\ petri | 156,00 ± 20,07 * | 26 | 165,00 ± 4,05 * | - |
| | | | | | |
| <i>Helycrysium pilicatum</i> | 5 µg\ petri | 178,33 ± 9,53 * | 36 | 148,33 ± 4,7 * | 22 |
| | 0,5 µg\ petri | 292,00 ± 8,32 | - | 184,33 ± 3,18 | - |
| | 0,05 µg\ petri | 282,33 ± 9,28 | - | 200,00 ± 6,43 | - |
| | | | | | |
| <i>Nepeta racemosa</i> | 5 µg\ petri | 350,66 ± 11,62 | - | 185,33 ± 8,11 | - |
| | 0,5 µg\ petri | 252,00 ± 13,58 | - | 183,00 ± 6,67 | - |
| | 0,05 µg\ petri | 288,33 ± 6,98 | - | 204,67 ± 6,76 | - |
| | | | | | |
| <i>Artemisia absinthium</i> | 5 µg\ petri | 186,00±15,71 * | 31 | 174,00±7,21 * | - |
| | 0,5 µg\ petri | 165,00±16,70 * | 38 | 183,67±5,90 | - |
| | 0,05 µg\ petri | 275,00±8,74 | - | 200,00 ± 3,43 | - |
| | | | | | |

Çizelge 4.3. *S. typhimurium* TA1535-TA1538 suşlarının *S.verticillata*, *S.limbata*, *S.nemerosa* ve *A. millefolium* bitki ekstraktları ile AMES/ *Salmonella*- mikrozom testinden elde edilen sonuçlar

| Test edilen bitkiler | Konsantrasyon (µg\ petri) | Geriye dönen (revertant) koloni sayısı | | | |
|-----------------------------|---------------------------|--|--------------|--------------------------------|--------------|
| | | Salmonella typhimurium TA 1535 | | Salmonella typhimurium TA 1538 | |
| | | Ortalama ± S.hata | % inhibisyon | Ortalama ± S.hata | % inhibisyon |
| Negatif kontrol | - | 34,67 ± 4,22 | | 10,25 ± 1,31 | |
| Pozitif kontrol | | | | | |
| 4NQO | 0,2 µg\ petri | | | 200,0 ± 13,11 | |
| NaN ₃ | 1 µg\ petri | 243,00±8,13 | | | |
| <i>Salvia verticillata</i> | 5 µg\ petri | 271,00 ± 6,24 | - | 164,33 ± 4,3 | - |
| | 0,5 µg\ petri | 255,33 ± 20,1 | - | 133,33 ± 4,09 * | 33 |
| | 0,05 µg\ petri | 229,67 ± 9,35 | - | 145,33 ± 7,26 * | 27 |
| <i>Salvia limbata</i> | 5 µg\ petri | 236,33 ± 21,86 | - | 204,67 ± 4,05 | - |
| | 0,5 µg\ petri | 227,67 ± 10,83 | - | 204,67 ± 8,97 | - |
| | 0,05 µg\ petri | 202,00 ± 14,00 | - | 191,33 ± 8,11 | - |
| <i>Salvia nemerosa</i> | 5 µg\ petri | | 27 | | - |
| | 0,5 µg\ petri | 148,67 ± 12,45 * | - | 191,00 ± 6,80 | - |
| | 0,05 µg\ petri | 203,33 ± 10,68 | - | 192,00 ± 5,29 | - |
| | | 261,33 ± 10,48 | | 211,00 ± 4,04 | |
| <i>Achillea millefolium</i> | 5 µg\ petri | 138,33 ± 20,04 * | 37 | 182,00 ± 11,01 | - |
| | 0,5 µg\ petri | 194,00 ± 25,40 | - | 201,33 ± 8,68 | - |
| | 0,05 µg\ petri | 193,67 ± 25,67 | - | 248,00 ± 32,68 | - |



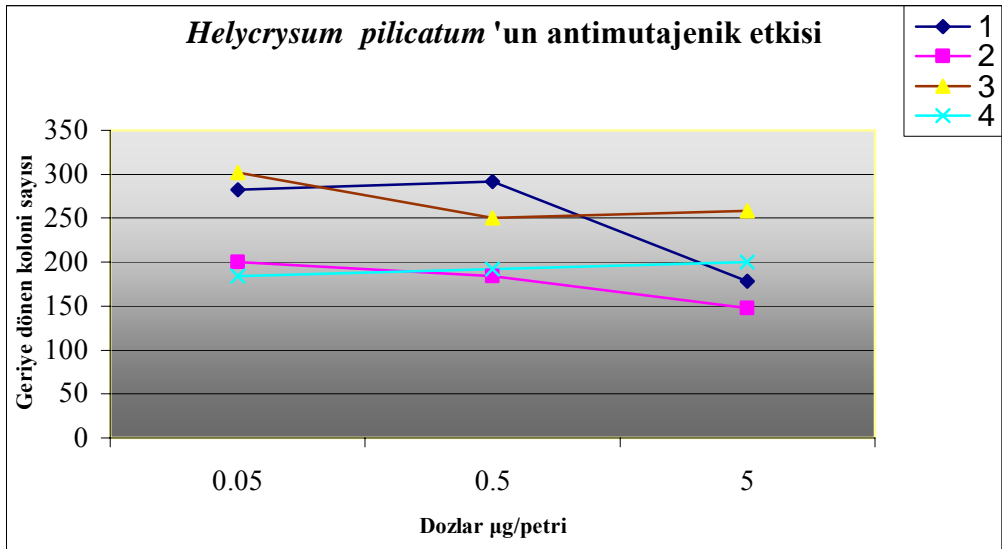
Şekil 4.4. *Origanum vulgare*'nin *S.typhimurium* TA1535-1538 suşları üzerine etkisi

1→ *Origanum vulgare*'nin *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerine etkisi

2→ *Origanum vulgare*'nin *S.typhimurium* TA1538 suşu üzerine etkisi

3→ *S.typhimurium* TA1535 suşu pozitif kontrol

4→ *S.typhimurium* TA1538 suşu pozitif kontrol



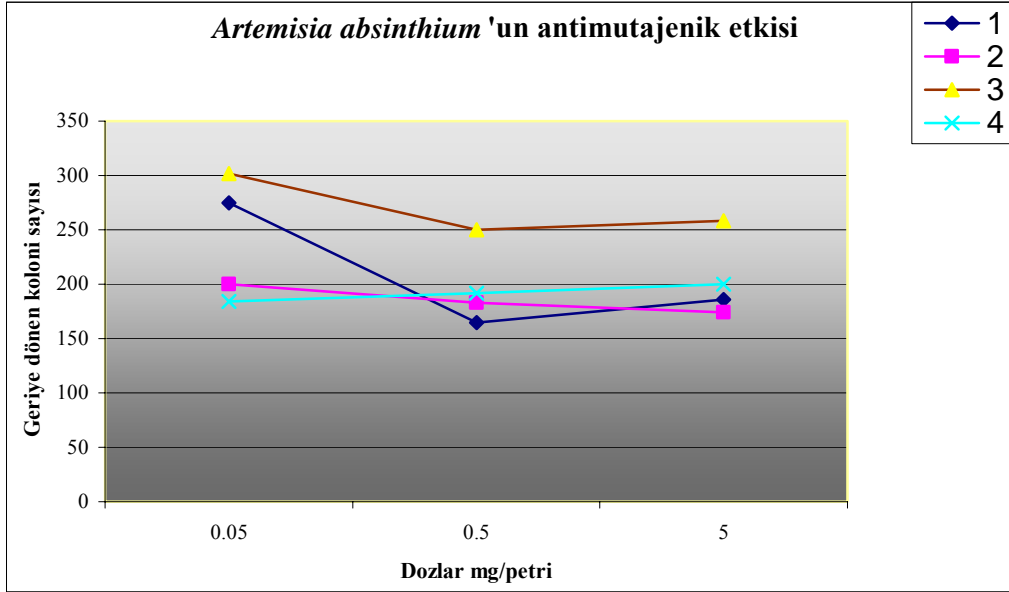
Şekil 4.5. *Helychrysum pilicatum*'un *S.typhimurium* TA1535-1538 suşları üzerine etkisi

1→ *Helychrysum pilicatum*'un *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerine etkisi

2→ *Helychrysum pilicatum*'un *S.typhimurium* TA1538 suşu üzerine etkisi

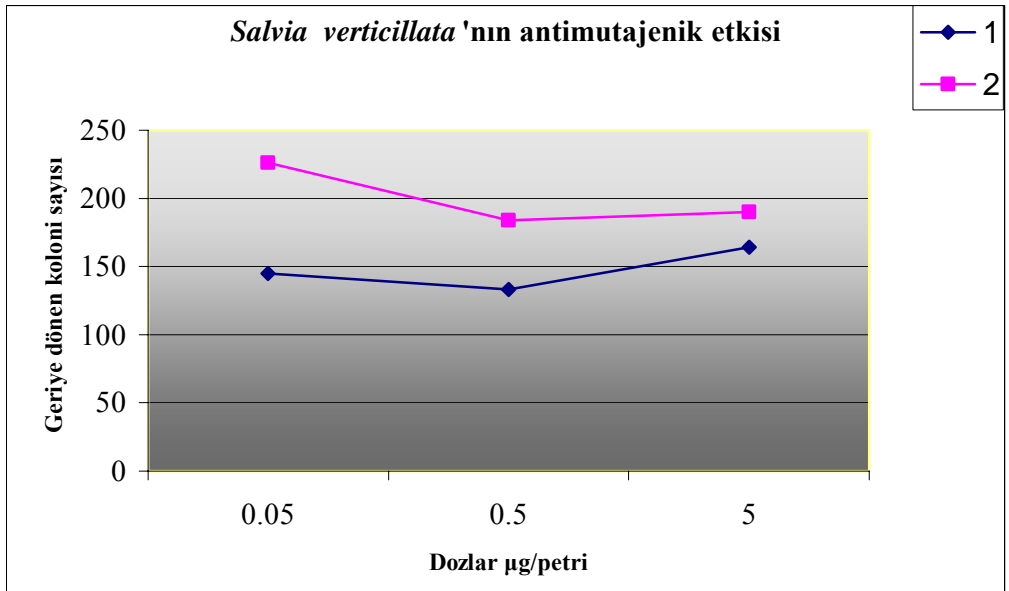
3→ *S.typhimurium* TA1535 suşu pozitif kontrol

4→ *S.typhimurium* TA1538 suşu pozitif kontrol



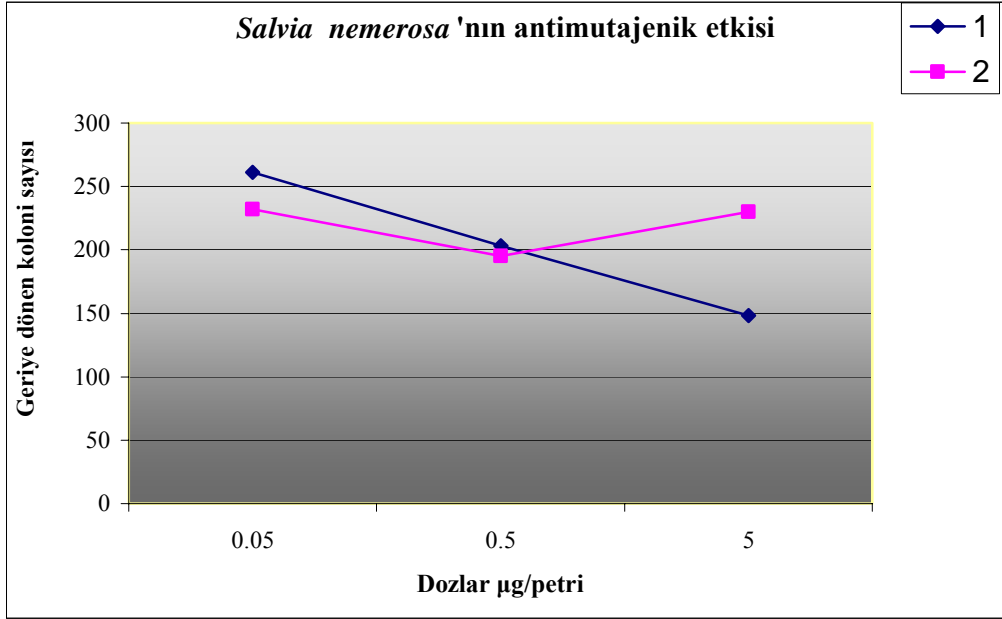
Şekil 4.6. *Artemisia absinthium*'un *S.typhimurium* TA1535-1538 suşları üzerine etkisi

- 1→ *Artemisia absinthium*'un *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerine etkisi
- 2→ *Artemisia absinthium*'un *S.typhimurium* TA1538 suşu üzerine etkisi
- 3→ *S.typhimurium* TA1535 suşu pozitif kontrol
- 4→ *S.typhimurium* TA1538 suşu pozitif kontrol

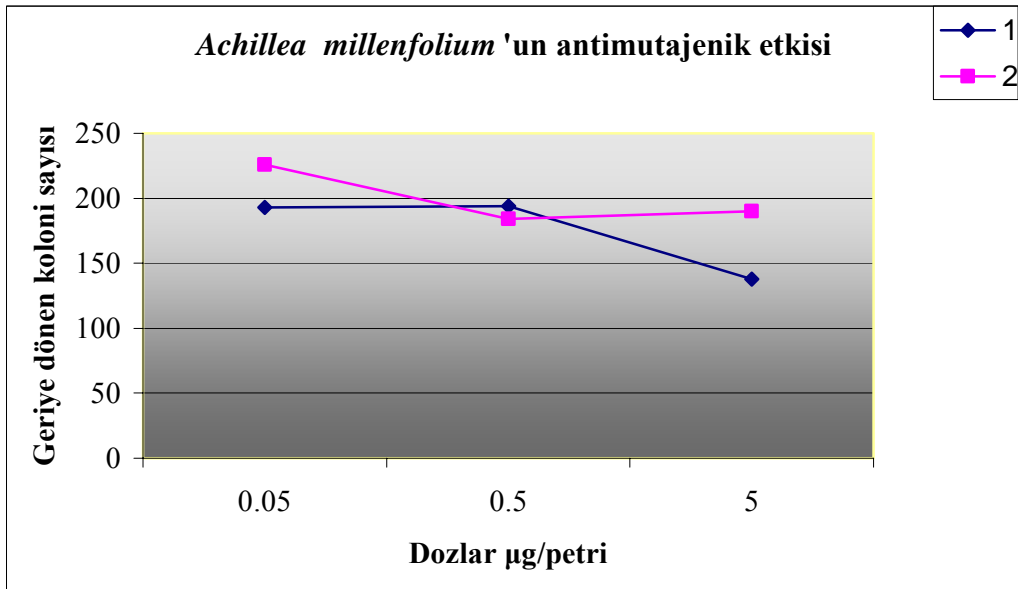


Şekil 4.7. *Salvia verticillata*'nın *S.typhimurium* 1538 suşu üzerine etkisi

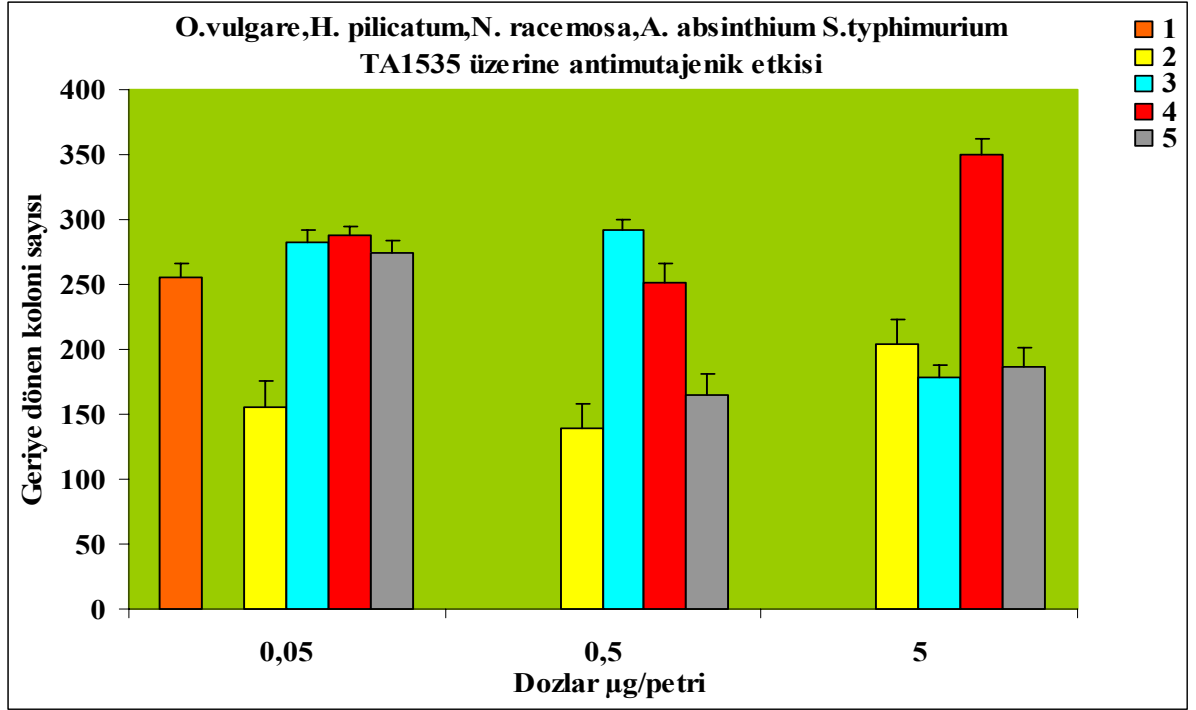
- 1→ *Salvia verticillata*'nın *S.typhimurium* TA1538 suşu üzerine etkisi
- 2→ *S.typhimurium* TA1538 suşu pozitif kontrol



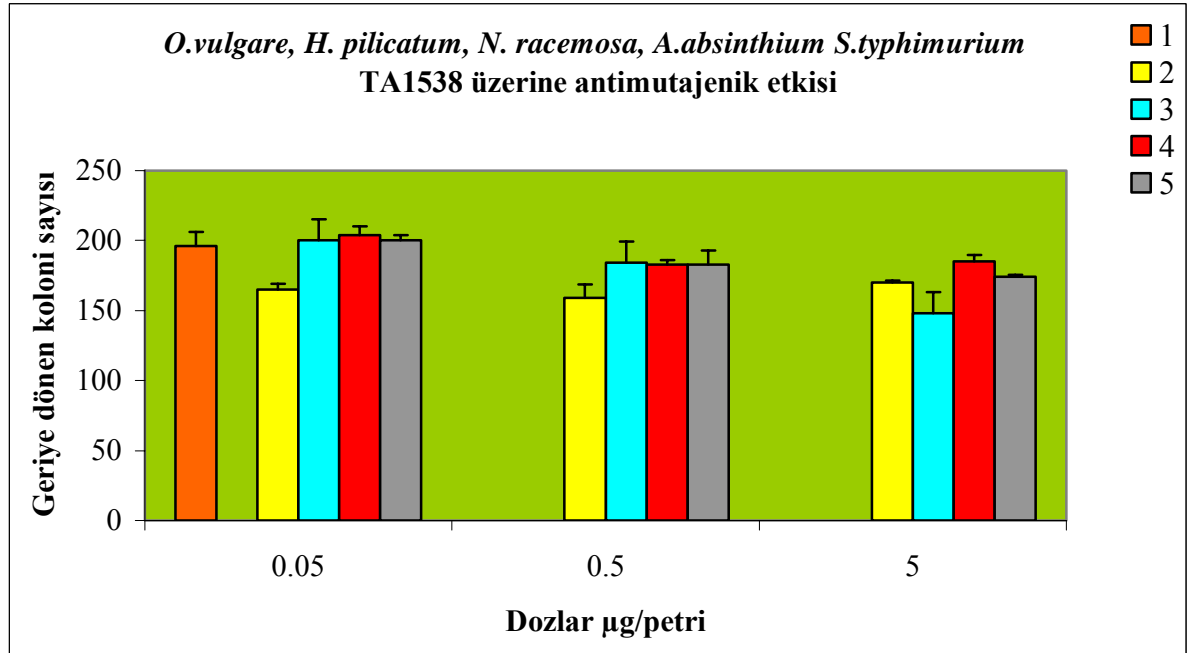
Şekil 4.8. *Salvia nemerosa* 'nın *S.typhimurium* 1535 suşu üzerine etkisi
 1→ *Salvia nemerosa* 'nın *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerine etkisi
 2→ *S.typhimurium* TA1535 suşu pozitif kontrol



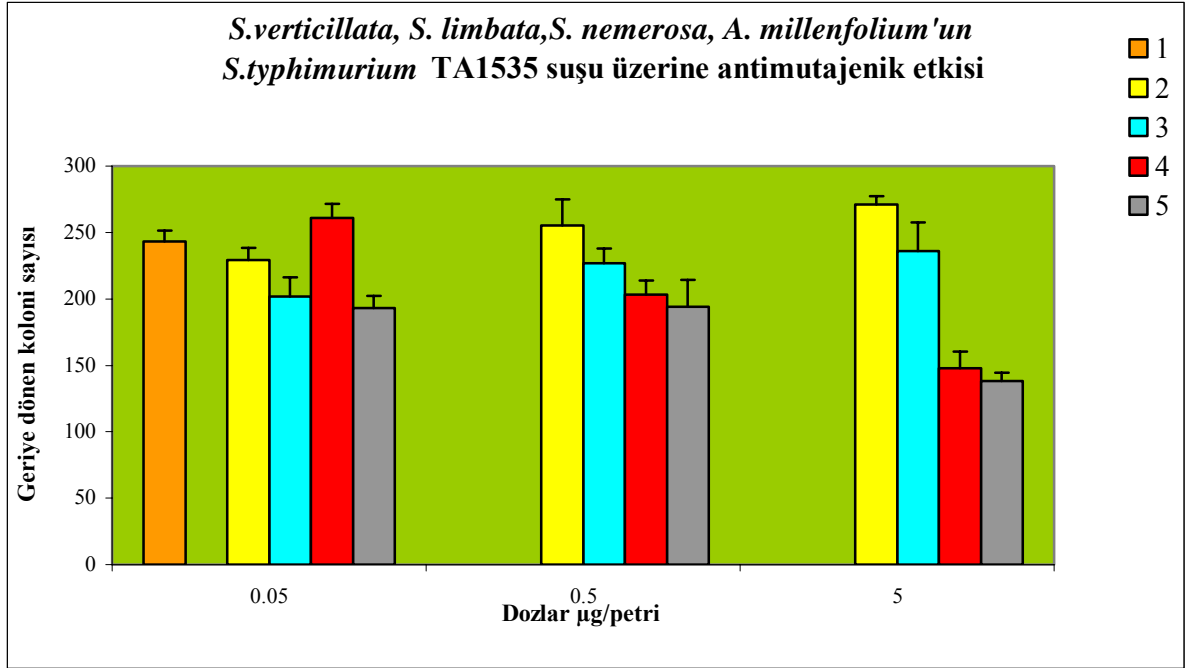
Şekil 4.9. *Achillea millenfolium* 'un *S.typhimurium* 1535 suşu üzerine etkisi
 1→ *Achillea millenfolium* 'un *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerine etkisi
 2→ *S.typhimurium* TA1535 suşu pozitif kontrol



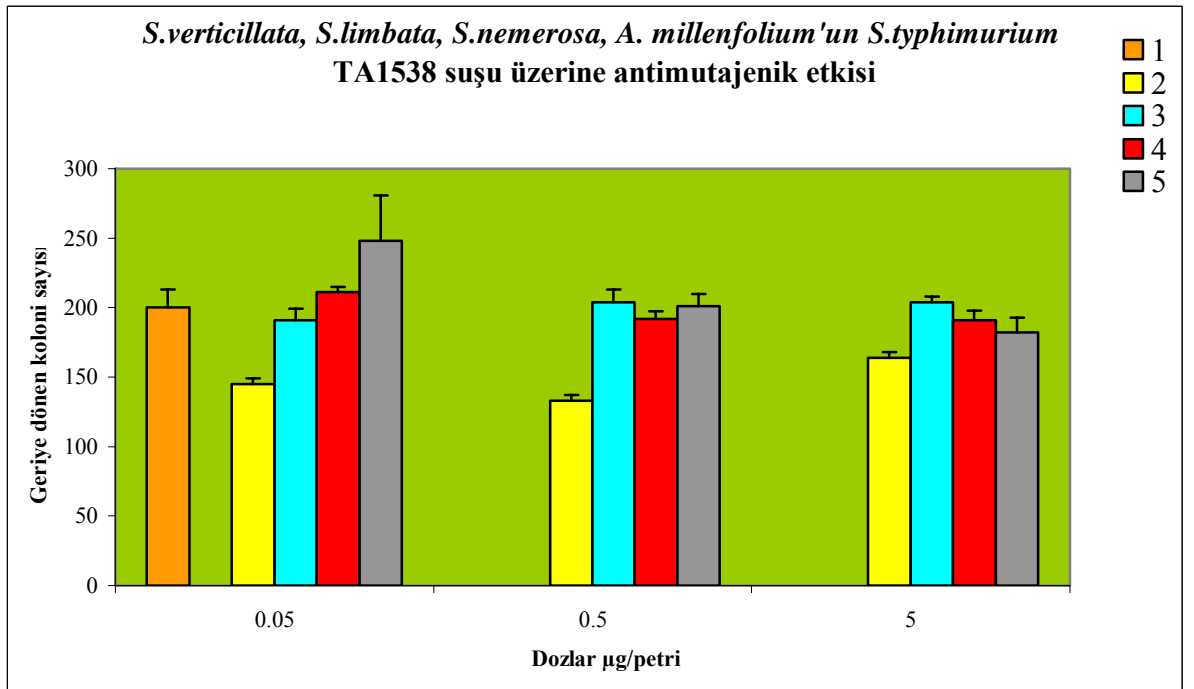
Şekil 4.10. *Salmonella typhimurium* TA1535 ile denenen bitki ekstraktların standart plate inkorporasyon test sonuçları histogramı (1; 1µg/petri sodyum azid uygulanmış pozitif kontrol grubu, 2; *Origanum vulgare*, 3; *Helychrysum pilicatum*, 4; *Nepeta racemosa*, 5; *Artemisia absinthium*) (ortalama± standart hata)



Şekil 4.11. *Salmonella typhimurium* TA1538 ile denenen bitki ekstraktların standart plate inkorporasyon test sonuçları histogramı (1; 0,2µg/petri 4NQO uygulanmış pozitif kontrol grubu, 2; *Origanum vulgare*, 3; *Helychrysum pilicatum*, 4; *Nepeta racemosa*, 5; *Artemisia absinthium*) (ortalama± standart hata)



Şekil 4.12. *Salmonella typhimurium* TA1535 ile denenen bitki ekstraktların standart plate inkorporasyon test sonuçları histogramı (1; $1\mu\text{g/petri}$ sodyum azid uygulanmış pozitif kontrol grubu, 2;*Salvia verticillata*, 3;*Salvia limbata*, 4; *Salvia nemerosa* 5;*Achillea millenfolium*) (ortalama \pm standart hata)



Şekil 4.13. *Salmonella typhimurium* TA1535 ile denenen bitki ekstraktların standart plate inkorporasyon test sonuçları histogramı (1; $0,2\mu\text{g/petri}$ 4NQO uygulanmış pozitif kontrol grubu, 2;*Salvia verticillata*, 3;*Salvia limbata*, 4; *Salvia nemerosa* 5;*Achillea millenfolium*) (ortalama \pm standart hata)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

In vivo ve *in vitro* çalışmaları, bitkilerin yaprak, meyve, kök gibi kısımlarından elde edilen bazı doğal bileşiklerin ksenobiyotik etkiler üzerine düzenleyici rol oynadıklarını göstermiştir. Bu bileşiklerin karakterizasyonu, tanılanması, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin belirlenmesi, insanlarda kanser hastalığının gelişmesini azaltmak için önemli bir stratejiyi de beraberinde getirmiştir (Roncada *et al.* 2004). Özellikle makromolekülleri içine alan birçok doğal ürün, bireysel immun sisteminin modülasyonunu sağlamasından dolayı antitümör aktiviteye sahiptir. Bu makromoleküllerin, kimyasal antitümör ilaçlarla karşılaştırıldığında daha az yan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Tsukagoshi and Ohashi 1974).

Son yıllarda, geleneksel tıbbi bitkilerin mutajenik-antimutajenik özelliklerinin belirlenmesinde araştırmacılar, esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans and Zeiger 2000). *Salmonella* mutajenite test sistemi çeşitli mutajen ve kanserojenlerin aktiviteleri üzerinde antioksidantlar başta olmak üzere çeşitli ajanların inhibitör etkilerinin izlendiği, çok önemli kısa zamanlı test sistemidir (Rosin and Stich 1979; Alekperov *et al.* 1986). Bu sistem aynı zamanda, kimyasalların mutajen veya kanserojen etkilerini ortadan kaldıran, bu kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyen antimutajenlerin ve antikanserojenlerin tayininde de kullanılmaktadır (Petek 1999).

Çalışmamızda, Erzurum ve çevresinde halkın geleneksel olarak çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla kullandığı, *Artemisia absinthium*, *Achillea millefolium*, *Helycrysium pilicatum*, *Nepete racemosa*, *Origanum vulgare*, *Salvia limbata*, *Salvia nemerosa*, *Salvia verticillata* bitki ekstraktlarının antimutajenik etkileri, Ames-*Salmonella*/ mikrozoom test sistemi kullanılarak, tesbit edilmiştir. Bu bitkilerden, *A. absinthium*, *A. millenfolium*, *H. pilicatum*, *O. vulgare*, *S. nemerosa* *S. verticillata*,’da antimutajenik aktivite gözlenmiştir.

Antimutajenik aktiviteye sahip olan bitkiler içerisinde, *A. absinthium* sodyum azid mutajenine karşı 5 ve 0.5 µg/petri dozlarında sırasıyla %31-38 oranında inhibisyon etki göstermiştir. Bu bitkinin 4NQO mutajenine karşı etkisi ise sadece 5 µg/petri dozunda $p < 0.05$ önem aralığıyla sınırlı kalmıştır. Bu sonuçlarla bitkinin çerçeve kayması mutasyonu üzerine antimutajenite etkisinin oldukça zayıf, beraberinde baz değişimi mutasyonları üzerine güçlü antimutajenik etki gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.6, 4.10, 4.11). Aynı zamanda bitkiden izole edilen ve sesquiterpen lakton grubuna ait olan arteminolidlerin tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahip olduğu ve ilaveten mantar, bakteri, virus enfeksiyonlarında ve inflamasyon, kanser, hepatit, malarya gibi hastalıklarda sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Berlin and Smilkstein 1996).

Bu cinsin farklı bir türü olan, *A. argyi* üzerine TA98 ve TA100 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite araştırmasında ise; benzoaminopurin(B[a]P), 4-nitro-1-quinoline oksit(4NQO), 2-aminoflouren(2-AF), 2-nitroflouren(2-NF), *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoquanidin(MNNG), sodyum azid(NA) mutajenlerine karşı herhangi bir antimutajenik özellik gözlenmemiş fakat 2-aminoantracene, aflatoksin β_1 'in sebep olduğu mutajeniteyi her iki strainde de azalttıkları gözlemlenmiştir (Nakasugi *et al.* 2000). Literatürlerden elde edilen bilgiler değerlendirildiğinde, cins üyelerinin, hatta aynı türe ait, biyolojik aktivitelerin farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu farklılık bitkinin genetik yapısına, ekstraktın elde edildiği bitkisel organa, kimyasal kompozisyonuna ve çevresel etmenlerin değişimine (yükseklik, sıcaklık, toprak yapısı, nem toplama zamanı, v.b.) bağlanabilmektedir. (Tepe 2002)

Artemisia cinsine ait türler arasındaki antioksidant aktivitenin karşılaştırılması amacıyla Şaban vd (2005) yapmış oldukları çalışmada *A. absinthium*'un güçlü antioksidant aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçların *A. absinthiumun* güçlü antioksidant aktivitesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

A. millenfolium sadece *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerine ve 5 µg/petri dozunda %37 inhibisyon etkiyle orta derecede antimutajenik etki göstermiştir (Tablo 4.1, Çizelge

4.7, 4.10,4.11). Bu da bitkinin baz değişimi mutasyonlarına karşı antimutajenik aktivitesinin olduğunu göstermektedir. Adı geçen bitkiden elde edilen drug, insan karaciğerinden alınan beş farklı hücre hattından hepatoblastoma hücre hattında güçlü sitotoksik etki gösterirken, adenokarsinoma hücre hattında %40.7 oranında (2000µ/ml), hepatocellular karsinoma hücre hattında ise %21.8 oranında (2000µ/ml) önemli sayılacak ölçüde inhibitör etki göstermiştir (Lin vd 2002). Ancak Rovado ve arkadaşları (2004) yılında yaptıkları çalışmada insan lenfositlerinde mitomisin-c ve sitosin-β-arabin-furaniside meydana getirdiği kromozomal kırıklar üzerinde *Achillea millenfolium*'un etkisinin olmadığını gözlemişlerdir. Sökmen ve ark. ise 2005 yılında bu bitkinin antioksidant aktivitesini belirlemek için yaptıkları çalışmada bitkinin askorbik asite göre daha kuvvetli antioksidant aktiviteye sahip olduğunu, ancak bu aktivitenin yapısındaki tek bir kimyasal bileşene değil bileşenlerin sinerjik etkisine bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Literatürler dikkate alındığında bitkinin var olan antimutajenik aktivitesinin de bitki ekstresindeki kimyasalların sinerjik etkisiyle oluşan antioksidant aktivitesine bağlayabiliriz.

H. pilicatum her iki bakteri suşunda sadece 5 µg/petri dozunda sırasıyla %36 ve %22 inhibisyonla orta dereceli antimutajenik etki gösterirken uygulanan diğer dozlarda herhangi bir etki göstermemiştir. Reid *et al.* (2005) bu cinsin farklı türleri üzerine yapmış oldukları çalışmada (*H. herbaceum*, *H. smillimum*, *H. rugulosum*); bitkilerin *S. typhimurium* TA98- TA100 suşları üzerinde herhangi antimutajenik aktivite göstermezken, 5 µg/petri ve 0.5µg/petri dozlarında mutajenik etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Gerek tür gerekse de ekolojik farklılıkların bitkinin kimyasal kompozisyon içeriğini değiştirebileceği, bu farklılığın da bundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Tepe 2000). Ayrıca bu bitkiyle ilgili herhangi antioksidant, antitümör v.b. çalışmalar yapılmadığı için antimutajenik mekanizmasının bu aşamada nereden kaynaklandığı bilinmemektedir.

O. vulgare her üç dozda önemli antimutajenik aktivite gösterirken, inhibisyon etki, doza bağımlı olarak değişmiştir. (Çizelge 4.2; Şekil 4.4, 4.10, 4.11). Elde ettiğimiz sonuçlara göre bitki ekstraktı özellikle sodyum azid tarafından indüklenmiş *S.typhimurium*

TA1535 suşu üzerinde; 0.5 µg/petri dozu % 40 inhibisyonla güçlü antimutajenik etki göstermiştir. Böylelikle sodyum azidin histidin operonunda meydana getirdiği transversiyonu bitki ekstresinin geri çevirdiği belirlenmiştir (Keleş vd 2001). Aynı bitkinin uçucu yağı ile İpek vd (2003) tarafından yapılan Ames *Salmonella*/microzom testinde ise; *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde 4-nitro-o-phenylenediamine and 2-aminofluorene mutajenlerine karşı, antimutajenik etkisinin olduğu bildirilmiştir. Uçucu yağın yapısındaki karvakrol maddesinin genotoksik ve antigenotoksik çalışmasında da MMC (mitomisin C) ile indüklenen SCE (sister chromatid Exchange) oranını azalttığı bulunmuştur. Bu da karvakrolun memeli hücrelerinde önemli antigenotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (İpek 2003). Araştırmacılar bu sonucu maddenin güçlü antioksidant etkisine bağlamışlardır. Nitekim Şahin vd (2003) bitki ekstraktıyla yaptığı çalışmada ekstraktın güçlü ROS temizleyicisi olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar ışığında biz de bitkinin antimutajenik aktivitesinin antioksidant özelliğinden kaynaklandığı düşünmekteyiz.

S. nemerosa sadece sodyum azidle indüklenmiş *S.typhimurium* TA1535 suşu üzerinde 5 µg/petri dozunda %27 inhibisyonla orta derecede antimutajenik etki göstermiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.8, 4.12, 4.13). *Salvia verticillata* ise TA1538 suşunda mutasyonu indükleyen 4NQO üzerinde ise 0.5 ve 0.05 µg/petri dozlarında sırasıyla %33 – 27 oranında inhibisyon etki göstermiştir (Çizelge 4.3, 4.7, 4.12, 4.13). Buradan da *S.verticillata*'nın çerçeve kayması mutasyonlarına, *S. nemerosa*'nın ise baz değişimi mutasyonlarına karşı antimutajenik etkisi olduğu anlaşılmıştır. Bu farklılığın aynı cinsin farklı türleri arasında farklı kimyasal kompozisyondan kaynaklı olabileceği buna bağlı olarak da antimutajenite mekanizmasının farklı olacağı düşünülmektedir. Bu bitkilerin kimyasal kompozisyonu ilgili herhangi literatüre rastlanmadığı için antimutajenik aktivitesinin hangi mekanizmaya bağlı olduğu bu aşamada açıklanamamaktadır. Ancak *S. miltiorrhizae* üzerine yapılan araştırma da bitkiden elde edilen salvinal fenolik bileşiğinin çeşitli kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi olduğu ve apoptozisi indüklediği belirlenmiştir. Aynı zaman da bölünme periyoduna girmiş hücreleri tıpkı kolsişin gibi mitozda durdurma özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Chang *et al.* 2004).

Yapılan çalışma sonucunda, antimitojenik aktiviteden sorumlu olduğu tesbit edilen bitki ekstraktlarının, kimyasal bileşenleri aydınlatılarak, etken maddenin izole edilip, fonksiyonel grupların ilave edilmesiyle, bu bileşenlerin aktivitelerinin hangi derecede olduğunun araştırılması yapılabilir. Ekstraktların antimitojenik aktivitesi, enzimatik aktivasyon prosesini etkileyebilme yetenekleri kadar, serbest radikalleri toplayabilme özelliğine sahip olmalarından da kaynaklanır. Yapısal olarak birbirinden çok farklı bileşiklerin koruyucu mekanizması, multifaktöriyel olabilir. Bu sebeple, antimitojenik etkiye sahip bitkisel kökenli doğal bileşiklerin, *in vivo* çalışması yapılarak, insanlar üzerindeki etki mekanizması aydınlatılabilir. Bunlarla bağlantılı olarak, bitkisel kökenli bileşiklerin, gerçekleştirilecek daha ayrıntılı çalışmalar sonucunda, insanlar için, kullanılabilirliği daha yüksek ürünler haline dönüştürülmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdulaev, F.I., Riveron-Negrete, L., Caballero-Orgeta, H., Hernandez, J.M., Perez-Lopez, I., Pereda-Miranda, R., Espinosa-Aguirre, J.J., 2003. Use of in vitro assay to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology in Vitro*, 17, 731-736.
- Aboolenein, A.A., 1982. Back to medicinal plants therapy. In the history of medicinal and aromatic plants; Proceedings of the second international congress, Hamdard.
- Akın, A., 1990. Bazı gıda katkı maddelerinin *Salmonella*/ mikrozoom test sistemi ile mutajenik etkilerinin saptanması. Bilim Uzmanlığı Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Alekperov, U.K., Ames, B.N., Kada, T. and Wattenberg, L.W., 1986. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutation Research*, 168, 47-65.
- Ancos, B., Gonzalez, E.M., Cano, M.P., 2000. Ellagic Acid, Vitamin C and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4565-4570.
- Aydın, S., Demir, T., Öztürk, Y., Hüsnu, K., Başer, C., 1999. Analgesic activity of *Nepeta italica* L. *Phytotherapy Research*, 13, 20-2
- Asımgil, A., 1997. Şifalı Bitkiler. Timaş Yayınları, 352 s, İstanbul.
- Bağcı, H., Şimşek, M., 1983. Moleküler Biyoloji Lisansüstü Yaz Okulu Ders Notları. Tübitak, Ankara.
- Bahçeci, Z., 2002. Moleküler Biyoloji. Öğrenci Kitabevi Yayınları, 323 s, Kırşehir.
- Baranauskienė, R., Venskutonis, P.R., Demyttenaere, J.C.R., 2003. Sensory and instrumental evaluation of Catnip (*Nepeta cataria*) aroma. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 51, 3840-3848.
- Barış, Ö., 2004. Doğu Anadolu Bölgesinde yetişen bazı *Salvia* türlerinin biyolojik aktivite ve genetik profillerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Başer, K.H.C., Kirimer, N., Kürkçüoğlu, M., Demirci, B., 2000. Essential oils of *Nepeta* species growing in Turkey. *Chemistry of Natural compounds*, 36(4), 356-359.
- Başer, K.H.C., 2002. The Turkish Origanum Species, In: *Oregano. The Genera Origanum and Lippia*, Ed.: Kintzios, S.E., Taylor and Francis, UK, 332-350.
- Baytop, T., 1984. Türkiye de bitkiler ile tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3255 Eczacılık Fakültesi No: 40, İstanbul. 156-157; 356.
- Benzi, G. and Ceci, A., 1997. Herbal medicines in european regulation. *Pharmalogical Research*, 35(5), 355-62.
- Berlin, R. and Smilkstein, M., 1996. Wormwood. *Journal Toxicology-Clinical Toxicology*, 34, 583.
- Beudot, C., De Meo, M.P., Dauzonne, D., Elias, R., Laget, M., Guiraud, H., Balansard, G., Dumenil, G., 1998. Evaluation of the mutagenity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames test. *Mutation Research*, 417, 141-153.

- Bhattacharya, R. K., Francis, A.R. and Shetty, T.K., 1987. Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1: In vitro effect of vitamins. *Mutation Research*, 188, 121-128.
- Cameron, I.L., Munoz, J., Barnes, J.C., Hardman, E.W., 2003. High dietary level of synthetic vitamin E on lipid peroxidation, membrane fatty acid composition and cytotoxicity in breast cancer xenograft and in mouse host tissue. *Cancer Cell Int.*, 3, 3.
- Ceylan, A., 1995. Tıbbi Bitkiler I. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:312. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atelyesi, Bornova-İzmir.
- Chai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004. Antioksidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, 74, 2157-2184.
- Chang JY, Chang CY, Kuo CC, Chen LT, Wein YS, Kuo YH., 2004. Salvinal, a novel microtubule inhibitor isolated from *Salvia miltiorrhizae* Bunge (Danshen), with antimetabolic activity in multidrug-sensitive and -resistant human tumor cells. *Mol. Pharmacol*, 65(1):77-84.
- Chandler, R.F., Hooper, S.N., Harvey, M.J., 1982. Ethnobotany, and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae. *Econ. Bot.*, 36 (2), 203.
- Chuang, S.E., Cheng, A.L., Lin, J.K., Kuo, M.L., 2000. Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 38(11), 991-995.
- Duke, J.A., 1985. *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. CRC press, 66 p, Boca Raton, Florida.
- Farnsworth, N.R., 1990. The role of the ethnopharmacology in drug development. In *Bioactive Compounds from Plants*. CIBA Foundation Symposium. Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore.
- Fenech, M., 2001. Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability. *Mutation Research*, 480-481, 51-54.
- Fowler, M. W., 1982. Substrate utilisation by plant cell cultures. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32, 338-346.
- Fremont L., 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Science*, 66, 663-73.
- Galati, G., O'Brien, J.P., 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology ve Medicine*, 37(3), 287-303.
- Gentile, M.J., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, J.G., Ferguson, L.R., 1998. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutation Research*, 402, 289-298.
- Grieve, M., 1931. *A Modern herbal*, reprint 1974, Hafner Pres, 916 s, New York.
- Hartman, P.E., Shankel, D.M., 1990. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ. Mol. Mutagen.*, 15, 145-182.
- Huang, L. E., Zhang, H., Bae, S. W. and Liu, A. Y. C., 1994. Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response: Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 269, 30718-30725.
- IARC, 1980. *Monographs on the carcinogenic risks of chemicals to humans*. supp. z. Long Term Screening Assays For Carcinogens. A Critical Appraisal, IARC

Monographs Supplement 2. IARC Lyon, International Agency For Research on Cancer.

- Isono, K. and Yourna, J., 1974. Chemical carcinogens as frame shift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 71, 1612-1617.
- Ivanova, D., Gerova, D., Cervenkov, T., Yankova, T., 2005, Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 96,145-150
- İpek, E., Tüylü, B.A., Zeytinoğlu, H., 2003 . Effects of Carvacrol on Sister Chromatid Exchanges in Human Lymphocyte Cultures. Cytotechnology , 43(1-3), 145 – 148.
- Jorgensen, K.V. Clayton, J.W. and Price, R.L., 1987. Evaluation of aflatoxin B mutagenesis: Glutathione-S-transferase to the *Salmonella* mutagenicity assay. Environ. Mutagen., 9, 411-419.
- Josefina, C.E., Sandra, G.A., Rafael, V.P., Jesus, J.E.A., 2004. Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by plant metabolites of aromatic amines. Toxicology letters, 153, 283-292.
- Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mentis, A., Mitaku, S., Charvala, C., 2001. Composition of the essential oil two *Nepeta* species and in vitro evaluation of their activity against *Helicobacter pylori*. Planta Med, 67, 880-883.
- Karamenderes, C., Kesercioğlu, T., 2002. Türkiye’de yayılış gösteren *Achillea* l. cinsine ait bazı taksonların kromozom sayıları. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- Karaker, V., Joshi, S., Shinde, S.L., 2000. Antimutagenic profile of three antioksidants in the Ames assay and the Drosophila wing spot test. Mutation Research, 468, 183-194.
- Kaur, S., Arora, S., Kaur, K., Kumar, S., 2002. The in vitro antimutagenic activity of Triphala- an Indian herbal drug. Food and Chemical Toxicology, 40, 527-534.
- Keleş, O., Ak, S., Bakirel, T., Alpınar, K., 2001. Türkiye’de yetişen bazı bitkilerin antimikrobiyal etkisinin incelenmesi. Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 25, 559-565.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A-dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 53(24), 9452-9458.
- Lee, B.M. and Park, K.K., 2003. Beneficial and adverse effects of chemo preventive agents, Review, 523-524, 265-278.
- Lien, E.J., and Li, W.Y., 1985. Structure Activity Relationship Analysis of Anti-Cancer Chinese Drugs and Related Plants. Long Beach, CA: Oriental Healing Arts Institute.
- Lin, L.Z., Liu, L.T., Chiang, L.C., Lin, C.C., 2002. *In vitro* Anti-hepatoma Activity of Fifteen Natural Medicines from Canada. Phytotherapy Research, 16, 440–444.
- Lodge, J.K., 2005. Vitamin E bioavailability in humans. Journal of Plant Physiology, 162, 790-796.

- Miller, E.C., and Miller, J.A., 1976. The metabolism of chemical carcinogens to reactive electrophiles and their possible mechanism of action in carcinogenesis, in Searle, C. S., Ed: Am. Chem. Soc., Washington, 773-762.
- Moghaddam, F.M., ve Hosseini, M., 1996. Composition of essential oil from *Nepeta crassifolia* Boiss & Buhse. Flavour and Fragrance Journal, 11, 113-115.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/mikrosome mutagenicity assay. Mutation Research, 455, 29-60.
- Moss, G.P., Harborne, J.B., and Baxter, H., 1993. Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Taylor & Francis Ltd, 755 p, London.
- Murray, R. K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2004. Xenobiyotiklerin Metabolizması, Harper Biokimya, Ed: Dikmen, N., Özgünen, T., Nobel yayınları, İstanbul, 780-786.
- Nakasugi, T., Nakashima, M., Komait, K., 2000. Antimutagens in Gaiyou (*Artemisia argyi* Levl. et Vant.). J. Agric. Food Chem., 48, 3256-3266.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S., 2003. Antioxidant ve antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. Food Chemistry, 80, 393-397.
- Olas, B., Wachowicz, B., 2001. Biological activity of resveratrol. Postepy Hig Med Dosw., 55(1), 71-9.
- Park, K.Y., Jung, G.O., Lee, K.T., Choi, J., Choi, M.Y., Kim, G.T., Jung, H.J., Park, H.J., 2004. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. Journal of Ethnopharmacology, 90, 73-79.
- Petek, M., 1999. İstanbul Boğazındaki toplam kirliliğin canlılardaki mutajenik etkilerinin, *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile araştırılması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, İstanbul.
- Principe, P.P., 1991. Valuing the biodiversity of medicinal plants. In Conservation of Medicinal Plants, Ed: Akerele, O., Heywood, V. & Synge, H. Cambridge University Press., Cambridge, 79-124.
- Ramanathan, K., Anusuyadevi, M., Shimila, S., Pannerseelvam, C., 2005. Ascorbic acid and α -tokoferol as potent modulators apoptosis on arsenic induced toxicity in rats. Toxicology Letters, 156, 297-306.
- Raucher, R., Edenharder, R., Platt, K.L., 1998. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. Mutation Research, 413, 129-142.
- Reid, K.A., Maes, J., Maes, A., van Staden, J., De Kimpe, N., Mulholland, D.A., Verschaeve, L., 2006. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. Journal of Ethnopharmacology, xxx, xxx-xxx.
- Roncada, T., Vicentini, V.E.P., Mantovani, M.S., 2004. Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and in human lymphocytes in vitro. Toxicology in Vitro, 18, 617-622.
- Rosin, M.P., and Stich, H.F., 1978. The inhibitory effect of cysteine on the mutagenic activities of several carcinogens. Mutation Research, 54, 73-81.
- Rosin, M.P. and Stich, H.F., 1979. Assessment of the use of the *Salmonella* mutagenesis assay to determine the influence of antioxidants on carcinogen-induced mutagenesis. Int. J. Cancer, 23, 722-727.

- Rovado, T., Vicentini, V.E.P., Mantovani, M.S., 2004. Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 18(5),617-22.
- Santhosh, K.T., Swarnam, J., Ramadasan, K., 2005. Potent suppressive effect of green tea polyphenols on tobacco-induced mutagenicity. *Phytomedicine*, 12, 216-220.
- Shamberger, J.R., Cynthia, L., Beaman, K.D. and Kasten, B.L., 1979. Antioksidants reduce the mutagenic effect of Malonaldehyde and β -propiolactone. *Mutation Research*, 66, 349-355.
- Shoji, T., Akazome, Y., Kanda, T., Ikeda, M., 2004. The toxicology and safety of polyphenol extract. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 959-967.
- Silva, F.A.M., Borges, F., Guimaraes, C., Lima Jose.L.F.C., Matos, C., Reis, S., 2000. Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radikal scavenging activity, and physicochemical parameters. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2122-2126.
- Silva, D., I., Gaspar, J., Gomes da Costa, G., Rodrigues, A.S., Laires, A., Rueff, J., 2000. Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. *Chemigo-Biological Interaction*, 124, 29-51.
- Skaltsa, H.D., Lazari, D.M., Loukis, A.E., Constantinidis, T., 2000. Essential oil analysis of *Nepeta argolica* Bory& Chaub.subs. *argolica* (Lamiaceae) growing wild in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 96-99.
- Solak, M., Şengil, A.Z., Öztaş, S., 1997. Rekombinant DNA teknolojisi temel ilkeleri ve uygulama alanları ,1.basım. Bilim Teknik Yayınevi, Manisa, 68-73.
- Sökmen, A., Jones, B.M., Ertürk, M., 1999. The *in-vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 79-86.
- Sökmen, A. ve Gürel, E. 2001. Bitki Biyoteknolojisi (eds Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S.). Bölüm 7, Sekonder metabolit üretimi, 211-261. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları. 374 s, Konya.
- Sokmen, M., Angelova, M., Krumova, E., Pashova, D., Ivancheva, S., Sokmen, A., Serkedjieva, J., 2005. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sciences*, 76(25), 2981-2993.
- Sreeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., Heber, D., 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 360-367.
- Stephen, A.M., 1998. Regulatory aspects of functional products. In: *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*. Ed: Mazza, G., Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, USA., 403-437.
- Şahin, F., Karaman, İ., Güllüce, M., Öğütçü, H., Şengül M., Adıgüzel, A., Öztürk, S., Kotan, R., 2003. Evaluation of antimicrobial activities *Satureja hortensis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 61-65.

- Tabata, M.,1993. A report on Traditional Medicine and Medicinal Plants in Turkey (1990,1991) Faculty of Pharmaceutical Sciences Kyoto University,.111-144 s.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., 1998. Farmasötik Botanik. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No; 78; 345.
- Tepe, B., 2002. Lamiaceae familyasına ait bazı bitki türlerinin [*Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. et Scheng., *Origanum syriacum* (L.) var. *bevanii* (Holmes), *Salvia tomentosa* (Miller), *Thymus eigii* (M. Zohary et P.H. Davis) Jalas] antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. Y. Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F.,1974. Protein- bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against Mouse sarcoma- 180 and rat ascites hepatoma Ah-13 by oral use. *Gann*, 65(6),563.
- Tyler, V.E., 1999. The Honest Herbal- A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies, The Haworth Herbal Pres, 387 p, New York, London.
- Verschaeve, L., Kestens, V., Taylor, J.L.S., 2004. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicology in Vitro*, 18(1),29-35.
- Victorin, K., Busk, L. and Ahlborg, U.G., 1987. Retinol (Vitamin A) inhibits the mutagenicity of o-aminoazotoluene activated by liver microsomes from several species in the Ames test. *Mutation Research*, 179,41-48.
- Yamagishi, M., Natsume, M.,Nagaki, A., Adachi, T., Osakabe, N., Takizawa, T., Kumon, H., Osawa, T., 2000, Antimutagenic activity of cacao: Inhibitory effects of cacao liquor polyphenols on the mutagenic actionof heterocyclic amines. *J. Agric. Food Chem.*,48, 5074-5078.
- Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M. D. ve Daniel, H., 2000.Dietary flavone selectively induces apoptosis in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 60,3823-3831.
- Wenzel, U., Nickel,A., Kuntz, S., Daniel, H., 2004, Ascorbic asid suppresses drug-induced apoptozis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis*, 25,703-712.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Muş merkezde doğdu. İlk ve ortaöğrenimini bu ilde tamamladıktan sonra 1994 yılında Sağlık Meslek Lisesi Hemşirelik Bölümünde lise eğitimine Artvin'de başladı. 1998 yılında Elazığ'da hemşirelik eğitimini tamamladı. Aynı yıl girdiği Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünün'den bölüm birincisi olarak mezun oldu. 2002 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans eğitimine başladı.

2001 yılında hemşire olarak göreve başladığı Erzurum Numune Hastanesi'nde 2003 yılından itibaren biyolog olarak çalışmaktadır.