

44871

T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji
Ana Bilim Dalı

**" HALK ARASINDA TEDAVİ AMACIYLA
KULLANILAN BİTKİSEL ÇAYLARIN
MUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI"**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECZACI NALAN ÖZMENTEŞE

DANIŞMAN
Doç. Dr. BUKET ALPERTUNGA

44871

1995 İSTANBUL

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Genetik Materyal.....	3
2.2. Mutasyon.....	5
2.2.1. Mutasyon tipleri.....	7
2.2.2. Mutasyon mekanizması.....	10
2.3. DNA Onarım Mekanizmaları.....	12
2.4. Mutajenite Testleri.....	16
2.5. Mutajen (Genotoksik) Maddeler.....	19
2.6. Bitkisel Kaynaklı Mutajen Maddeler.....	19
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözeltiler ve Aletler.....	21
3.2. S9 Fraksiyonunun Hazırlanması.....	28
3.3. UMU – Testi.....	29
3.3.1. Pozitif kontroller ile çalışma.....	29
3.3.2. Bitkisel çay ekstraktları ile çalışma.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. NQO ve NODP ile Çalışmalar.....	33
4.2. 2-AA ve DMBA ile Çalışmalar.....	34
4.3. Bitkisel Çaylar ile Yapılan Çalışmalar.....	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
6. ÖZET	44
7. SUMMARY	45
8. TEŞEKKÜR.....	46
9. KAYNAKLAR	47

I. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Çevrede, insan sağlığı için tehlike oluşturan kimyasal maddelere her yıl yenileri ilave olmaktadır. Çeşitli farmasötik ürünler, gıdalarda ve temizlik malzemelerinde bulunan kimyasallar ve petrol ürünleri bunlardan bazılarıdır. Ayrıca, mikotoksinler gibi bir çok kimyasal madde çevrede doğal olarak bulunmaktadır.

Kimyasal maddelerden bazılarının insanda kanser nedeni olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Kanserojen maddelerin yaklaşık %90'ı aynı zamanda mutajendir. Mutajen maddelerin genetik materyalde oluşturdukları hasar sonucunda ileriki kuşaklarda kalıtsal hastalıkların görülme sıklığı artmakta veya somatik hücrelere ait hastalıklar(kanser) oluşmaktadır (1,2).

Mutajenez mekanizmasının aydınlatılması ve mutajenlerin saptanması için çeşitli test sistemlerinin geliştirilmesi ve mutajenezin insanlar için oluşturduğu kalıtsal hastalık ve kanser riskinin azaltılması için yapılan çalışmalar Toksikolojinin en önemli çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır.

Çevresel mutajen ve kanserojenlerin taranabilmesi için çeşitli kısa süreli testler ("short-term tests") geliştirilmiştir (1,3-5). Bakteriyofajlardan memelilere çeşitli organizmaların kullanıldığı bu kısa süreli testlerde genel olarak, çoğu karsinojen ve mutajenin direkt veya indirekt, DNA' da oluşturdukları hasar ve kromozom anomalileri tespit edilir.

Bakteriler, genetik toksinler için en fazla tercih edilen indikatör organizmalardır (6,7).

Salmonella typhimurium TA 1535 /pSK 1002 suşunun kullanıldığı **umu-testi** çevresel karsinojen ve / veya mutajenlerin genotoksik etkilerinin araştırılması için son yıllarda geliştirilen bir test sistemidir (6-9).

Bünyelerinde çeşitli yapıda kimyasal maddeler bulunan bitkisel çaylar halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, **umu-test** sistemi yardımıyla bazı bitkisel çayların mutajenik (genotoksik) aktivitelerini araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genetik Materyal

DNA yapısı ve fonksiyonları

DNA molekülü (Deoksiribonükleik asit) , sarmal şekilde birbirine dolanmış, yapı taşları nükleotidler olan uzun bir çift zincirden oluşan birimdir. Nükleotidlerin yapısında fosforik asit, deoksiriboz, ve purin veya pirimidin bazı bulunur. Bir nükleotidin fosforik asit grubu yanındakinin deoksiriboza ile birleşerek DNA zincirini oluşturur. Baz molekülleri, çifti oluşturan zincirlerin birbirine bakan kısımlarına yerleşmişlerdir.

Purin bazları adenin (A) ve guanin (G) dir. Pirimidin bazları ise sitozin (C) ve timin (T) dir. Bir zincirdeki G, karşı zincirdeki C ile A ise T ile hidrojen bağları ile bağlanmıştır.

DNA molekülü üzerindeki genetik materyal " **operon** " adı verilen birimlerden oluşur. Her bir operon hücredeki biyokimyasal olayları yöneten enzimlerin sentezini sağlayacak çeşitli m- RNA moleküllerini sentezleyen birimdir. Belirli bir m-RNA'nın yapımı ile görevli operon bölgesi " **gen** " adını alır. m-RNA'ya aktarılan mesaj üç harfli sözcüklerden ibarettir. Sözcükleri oluşturan ise dört harftir; adenin (A), sitozin (C), guanin (G), ve timin (T). DNA zinciri üzerinde üç bazdan oluşan bu sözcük takımlarına " **kodon (triplet)** " denir. DNA çift zinciri hücrede bazik proteinler olan histonlarla sarılmış durumdadır ve kromatin iplikleri adını alır. Mitoz başlangıcında kromatin iplikleri daha iri olan kromozomlara dönüşürler (10-14).

Hücrede DNA molekülü ile ilgili iki olay vardır:

-Mitozla hücre bölünmesi ve yeni hücrelere genetik信息的 geçmesi (Replikasyon),

-Genetik bilgilere göre hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi (Transkripsiyon -Translasyon).

DNA Replikasyonu: Mitoz bölünmenin başlangıcında DNA çift zincirleri birbirlerinden ayrılırlar. Her bir zincir kalıp görevi yaparak tamamlayıcı nükleotidleri çeker ve yeni bir DNA zinciri oluşturur. Böylece bir çift zincirden iki yeni, birbirinin aynı DNA zinciri oluşur. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1.DNA molekülünün replikasyonu

Genetik bilgilerin Transkripsiyonu ve Translasyonu: DNA molekülündeki bir zincir kalıp görevi yaparak diğer makromolekülleri yapar. Bunlar m-RNA (messenger RNA) ve t-RNA (transfer RNA) molekülüdür (Transkripsiyon). RNA molekülünde şeker molekülü ribozdur. Timin yerine Urasil bulunur.

Genin transkripsiyonu ile oluşan özgül m-RNA molekülü ribozomlara giderek, orada t-RNA'ların yardımıyla gerekli proteinlerin ve enzimlerin sentezini sağlarlar (Translasyon).

Enzim sentezlerinin düzenlenmesinde yapısal genler, düzenleyici genler, operatör genler ve repressörler rol oynarlar. Operatör genler, operonda yapısal genlerin yanında yer alan ve repressör için reseptör noktayı teşkil eden genlerdir. Repressörün operatör üzerine etkisi ile yapısal genlerce başlatılan m-RNA sentezi engellenir. Hücre içi özel bir uyarı sonucunda repressör operatör bölgeden ayrılır ve protein sentezi ile ilgili şifre okunur. Düzenleyici genler, ortamdaki değişiklikleri tespit ederek, gerekli enzimlerin sentezi ile ilgili yapısal genleri düzenler ve repressör adı verilen maddelerin sentezini sağlarlar (10-14).

2.2. Mutasyon

DNA molekülünde meydana gelen kalıcı yapı değişikliklerine "**mutasyon**" denir. Mutasyona neden olan etkenler ise "**mutajen**" olarak adlandırılırlar.

Mutasyonlar fiziksel ve kimyasal etkenlerle veya spontan olarak meydana gelirler. Mutasyon sonucu oluşan yapıya (gen, kromozom, hücre) "**mutant**" adı verilir. Mutasyon sonucunda, DNA tarafından yapıları belirlenen ve hücre-

nin yapısı, gelişmesi ve fonksiyonları ile ilgili enzimlerin ve proteinlerin yapısında bozukluklar meydana gelir.

Genotoksik etki olarak da adlandırılan mutajenik etkinin araştırılması çalışmalarının başlangıcı, 1927'de H. J. Müllerin x-ışınlarının *Drosophila melanogaster*de resesif letal mutasyona neden olduğunu keşfetmesidir. Bir yıl kadar sonra L. R. Stadler x-ışınlarının bitkilerde de mutasyona neden olduğunu bildirmiştir. Kısa bir süre sonra UV-ışınlarının mutajenik etkisi saptanarak, kimyasal mutajenlerin araştırılmasına başlanmıştır. Kimyasal mutajenez ile ilgili çalışmaların ilk sonuçları 1940'lara dayanır. Bu tarihlerde Mustard gazının mutajen etkisi açıklanmış ve mutajenez ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (1).

İnsanlarda ve diğer çok hücreli canlılarda mutasyon, somatik hücrelerde veya üreme hücrelerinde (gametlerde) olabilir.

Somatik hücrelerdeki mutasyon sonucu genetik materyalde meydana gelen bozukluk ve bunun sonucunda ortaya çıkan fenotipik bozukluk o hücreye kısıtlı kalır, sonraki kuşaklara geçmesi söz konusu değildir. Ancak, somatik hücrelerdeki mutasyon kanserojeneze zemin hazırlar. Mutasyonun, kanserojenin özellikle başlama (initasyon) kademesinde etkili olduğu aşağıdaki nedenlerle kesin olarak kabul edilmiştir (1, 2).

- Bir çok karsinojen DNA'da mutasyona neden olmaktadır.
- Kromozom yapısının herhangi bir sebeple bozulduğu hücreler, selektif olarak anormal bir şekilde proliferasyon (çoğalma) gösterirler.
- Kromozom yapısı bozuk olan hücrelerin onkojenik faktörler tarafından etkilenmeleri kolaydır.
- DNA tamir mekanizmasındaki bozukluklar kanser riskini arttırır.

Gamet hücrelerindeki mutasyon sonucu meydana gelen genotipik bozukluklar yeni kuşaklara geçer; duruma göre bu bozukluk gizli kalır ya da fenotip-

te kendini belli eder. Trizomik Sendromlar bu tür mutasyonlar sonucu meydana gelen genetik hastalıklara tipik örneklerdir.

Belli bir mutant gen, kromozom çiftlerinden yalnız biri üzerinde bulunuyorsa heterozigottur, her ikisinde de bulunuyorsa, bu gen homozigot durumdadır. Bir mutant gen heterozigot durumda bulunduğu anda hastalık ortaya çıkıyorsa, bu tip gene "dominant gen" ve meydana gelen hastalığa da "dominant hastalık"denir.

Bir mutant gen ancak homolog kromozomların (allel) her ikisinde de bulunduğu yani homozigot olduğu zaman hastalık meydana getiriyorsa, bu gene "resesif gen" ve meydana gelen hastalığa da "resesif hastalık"denir (2, 6, 12).

2.2.1. Mutasyon tipleri

Üç tip mutasyon vardır. Bunlar;

I) Gen mutasyonu (Nokta mutasyonu):

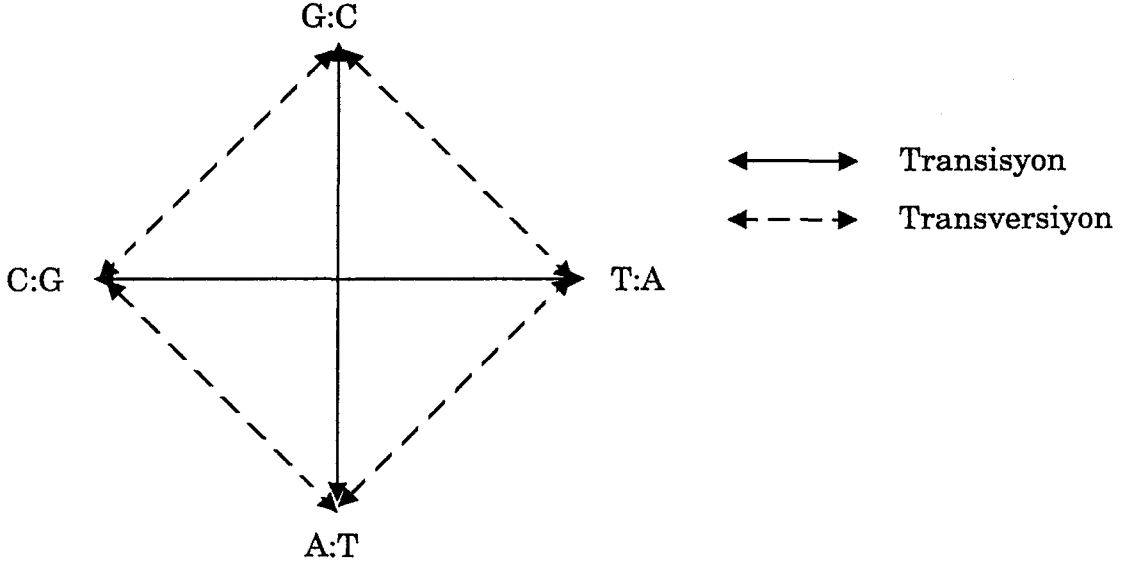
DNA dizilişinde (nükleotid sırasında) bir veya bir kaç kodonda meydana gelen değişikliklerdir (1, 4, 6, 7, 10, 13, 14).

Nokta mutasyonu iki şekilde ortaya çıkar;

a) Baz çifti değişimi (Baz süstitüsüyonu):

En basit mutasyon türünü oluşturur. DNA molekülünde bir baz çiftinin yerine diğer bir baz çifti geçer.

Bir baz çiftinde, bir purin bazının yerini diğer purin bazı aldığı anda buna düz geçiş (transisyon), bir purin bazının yerini bir pirimidin bazı aldığı anda veya tersi durumda, buna çapraz geçiş (transversiyon) denir. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. DNA baz çifti değişiminin şematik açıklanması

b) Kalıp kayması :

Gende bir veya iki baz çiftinin çıkması veya eklenmesi şeklinde ortaya çıkan mutasyon tipidir (1, 6, 7, 13, 14).

Gendeki bazların sıralanışı o gen tarafından şifrelenen proteinin aminoasit sırasını belirlemektedir. Bazların sıralanışında tek bir baz çiftini ilgilendiren bir değişme, genin o noktasındaki kodonun ve dolayısıyla bu gen tarafından şifrelenen proteinin söz konusu kodon tarafından belirlenen aminoasidin de değişmesine yol açacaktır. Baz çiftinin delesyonu veya eklenmesi sonucunda ise mutasyonun yer aldığı kodondan sonraki bütün kodonlar değişir. Sonuçta; proteinin mutasyonun olduğu noktadan sonraki gen kısmı tarafından şifrelenen bölümü tamamen yanlış aminoasitlerden oluşur. (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. Kalıp kayması mutasyonu

II) Kromozomal mutasyon (Kromozomal bozukluklar) :

Kromozomların yapısında meydana gelen ve genetik materyalde önemli değişikliklere neden olan mutasyon tipidir (6, 7, 12-14). DNA zinciri veya kromatid kırılabilir, meydana gelen parçalar diğer zincir veya kromatide geçerek onunla değişik şekillerde rekombine olur (Kaynama).

a) Bir kromozomdaki DNA parçası koparak başka bir kromozoma takılır (Translokasyon).

b) Kromozomun küçük bir parçası koparak eksilir (Delesyon).

c) Kromozomun bir bölümü koptuktan sonra 180° dönerek tekrar koptuğu yere yapışır (İnversiyon).

III) Genomik Mutasyon :

Genomda, kromozom sayısında meydana gelen değişikliklerdir (1, 6, 12)

İnsanda diploid ($2n = 46$), yani 46 kromozomdan fazla olan ve kromozomların haploid ($n=23$) sayısının tam katı şeklinde artmış olduğu duruma "poliploidi" adı verilir.

Kromozom sayısının, normal diploid sayıdan bir veya birkaç adet az veya fazla olması durumuna "aneploidi" denir.

Tek bir kromozomun artmış olduğu durum "trizomi", eksik olduğu durum ise "monozomi" dir.

Bu tip mutasyonlar esas olarak kromatid çiftlerinin veya homolog kromozom çiftlerinin birbirinden çözülmelerinin olmayışı ile karakterize olduğu için "çözülmesiz mutasyon" adını alır (13) .

2.2.2. Mutasyon mekanizması :

Nokta mutasyonu ve kromozomal mutasyonda hedef DNA molekülüdür. Aneploidi ve poliploidide ise asıl hedef mitoz ve meiozdaki hücresel komponentler, özellikle içcik lifleridir.

Birçok reaktif grup içermesi nedeniyle DNA molekülünün yapısı çeşitli yollardan değişikliğe uğrayabilir (6).

- Hidrolitik zarar :

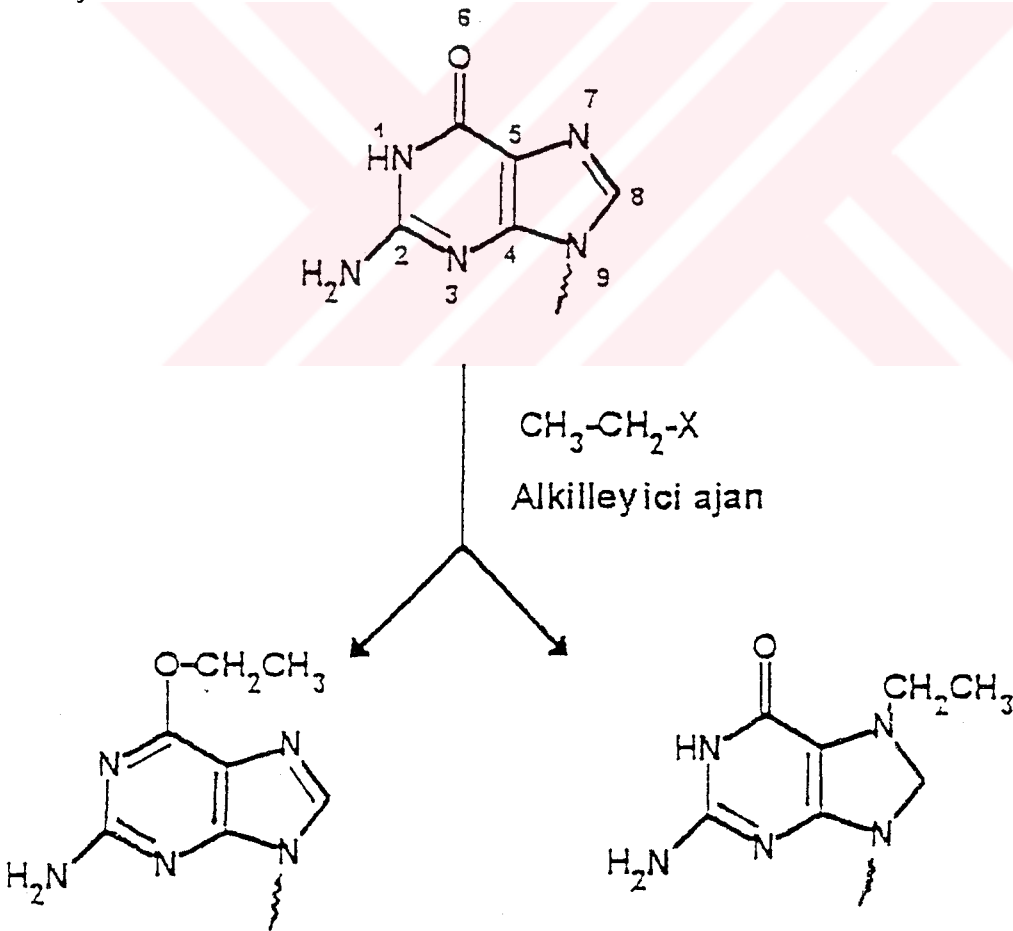
Spontan nokta mutasyonları, DNA daki hidrolitik zarar sonucu oluşmaktadır. Depurinizasyon, depirimidasyon, ekzosiklik amino grubunun deaminasyonu bu tür bir zarar sonucu meydana gelen değişikliklerdir.

- Adukt oluşumu :

Birçok elektrofilik bileşik DNA molekülüne bağlanarak "adukt" denilen stabil ürünler oluştururlar (1, 4, 6).

DNA bazları adukt oluşumunda başlıca hedeflerdir.

En fazla adukt oluşturan baz guanindir. (N^7 , O^6 , C^8 , ekzosiklik N^2)
(Şekil 2.4)



Şekil 2.4. Guaninin O^6 ve N^7 alkilasyonu

Adukt oluşumunun biyolojik neticeleri, aduktun karakterine ve DNA molekülündeki yerine bağlıdır. Örneğin: N⁷- Guanin'e bağlı bir metil grubu O⁶- Guanin'e bağlı bir metil grubuna göre daha zayıf mutajendir. Nokta mutasyonu veya kromozomal mutasyon adukt oluşumu neticesi ortaya çıkan mutasyonlardır.

- Zincir kırılması :

Adukt oluşumu ve fiziksel etkenler (X-ışınları) zincir kırılmasına ve buna bağlı olarak kromozomal mutasyona neden olur (6).

- Elektromanyetik radyasyon :

İyonize ışınlar (X-,Y-ışınları) serbest radikal oluşturarak DNA bazlarında kimyasal değişikliklere ve zincir kırılmalarına neden olur. UV-ışınları (254 nm de) dimer oluşturarak mutajen etki gösterir (6).

2.3 DNA Onarım Mekanizmaları :

DNA da oluşan zararlar ya hücrenin ölümüne neden olur veya genetik materyalde önemli değişiklikler meydana getirir.

Genetik bilgilerin sonraki kuşaklara değişmeden aktarılabilmesi için bütün organizmalar kendilerine özgü onarım mekanizmaları geliştirmişlerdir.

Hücre, DNA hasarlarına değişik şekillerde cevap verir (6, 15);

a) DNA hasarı onarılarak molekül eski haline dönüştürülür. Bu durumda bir mutasyon söz konusu değildir.

b) DNA aduktu olduğu taktirde, hücre DNA replikasyonunu engellemek suretiyle ölür veya m-RNA transkripsiyonunu bloke ederek esansiyel bir

proteinin sentezini engeller. Hücre öldüğü takdirde mutasyon olasılığı da elimine olur.

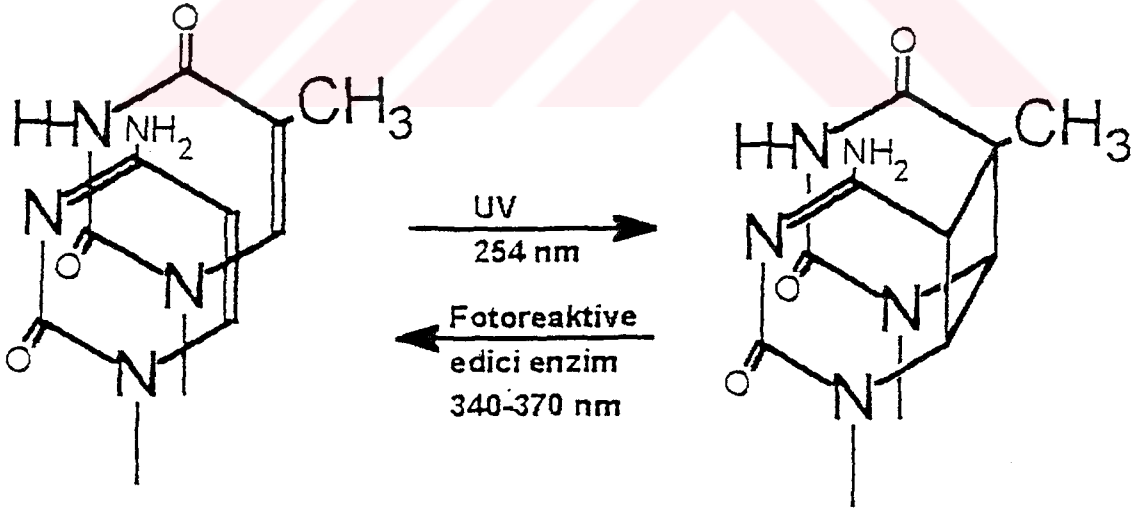
c) Hücre mutasyonel lezyonun varlığına rağmen bölünmeye devam eder.

DNA hasarının onarılması değişik şekillerde olur ;

I) UV-ışınları ile mutasyonun enzimatik fotoreaktivasyonu :

Bu mekanizmada, "Fotoreaktif edici enzim" adı verilen özel bir enzim 300-400 nm. dalga boyunda görülebilir ışıktaki aktif hale gelerek onarımı başlatmaktadır.

DNA molekülünde UV'nin oluşturduğu pirimidin dimerleri bu mekanizma ile giderilmektedir (1, 10, 16). (Şekil 2.5)

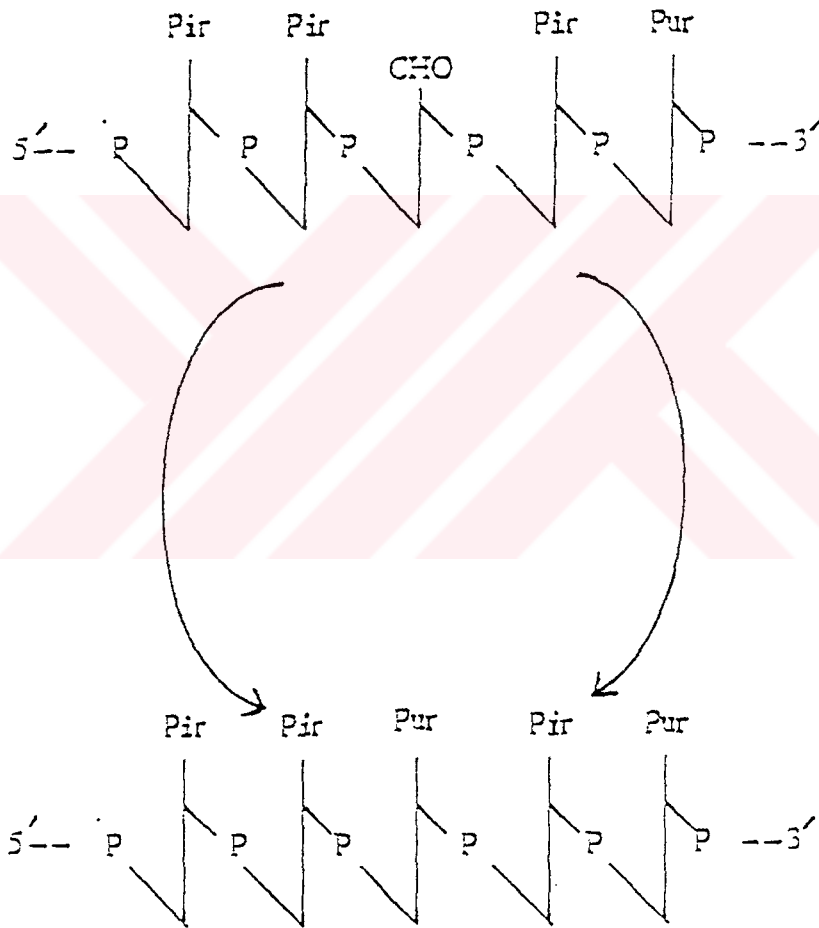


Şekil 2.5. UV - ışınları ile mutasyonun enzimatik fotoreaktivasyonu

II) O⁶ - Alkil guanin aduktunun metil transferaz enzimi ile onarımı (16, 17).

O⁶ - Metil guanin- DNA + Metil transferaz-SH → Guanin - DNA + Metil transferaz-S-metil

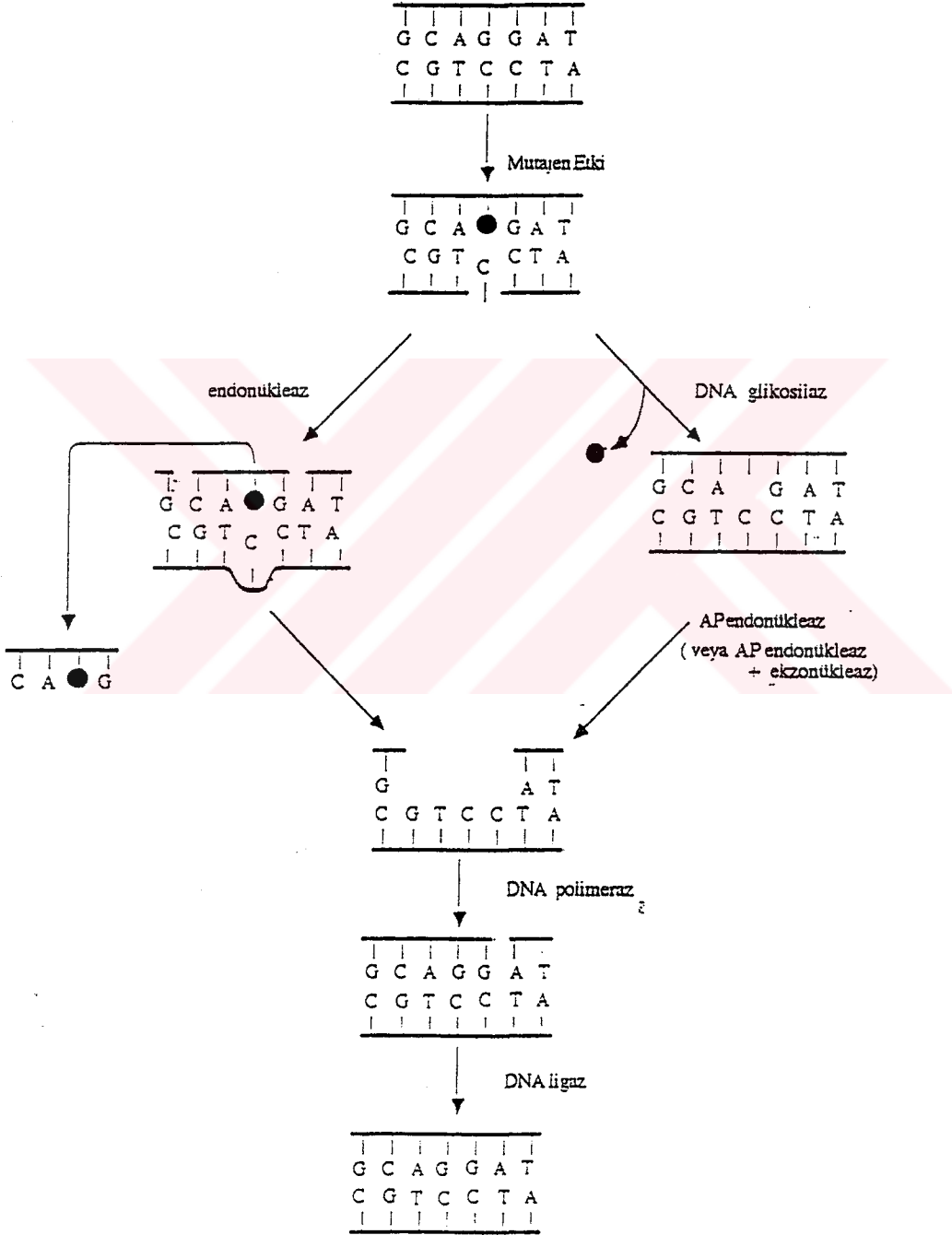
III) Purin bazı ilavesi : (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. DNA molekülüne purin bazı ilavesi

IV) Baz veya nükleotidin uzaklaştırılması (Nükleotid-, Baz - Ekzisyonu)

Genetik materyalde, mutasyona uğramış bölgedeki baz veya nükleotid-ler çeşitli enzim aktiviteleri ile uzaklaştırılırlar (1, 16, 17). (Şekil 2.7)



Şekil 2.7. Nükleotid -, Baz - Ekzisyonu

Bunlar, hem bakterilerde, hem de ökaryotik hücrelerde bulunan onarım mekanizmalarıdır.

Mismatch ve SOS-Onarımı gibi mekanizmalara ise sadece mikroorganizmalarda rastlanmıştır.

2.4. Mutajenite Testleri

Mutajenik etkilerin araştırılmasında, bakterilerden, virüsler, mantarlar, memeli hücre kültürleri, bitkiler, böcekler ve memelilere kadar çeşitli deney organizmaları kullanılır.

Bakteriler, genotoksik kimyasalların taranmasında en fazla kullanılan test sistemleridir.

Ames tarafından geliştirilen ve Ames testi veya *Salmonella* / mikrozom testi (Muta test) de denilen test, bakteriyel testlerin gelişmesinde öncülük etmiştir ve en yaygın kullanılan testtir (18-33). *Salmonella typhimurium* bir mutasyon nedeniyle histidin sentezleyemeyen (his^- mutantı) mutantlarının kullanıldığı bu test, ayrıca kimyasal maddelerin karsinojenik etki potansiyellerini tespit etmek için de tarama testi olarak kullanılır. Mutajen etkinin varlığında, bakterideki defekt ortadan kalkar ($his^- \rightarrow his^+$ mutant). Bakteriler histidin sentezleme yeteneğini tekrar kazanırlar ve histidin içermeyen özel besi yerinde (Minimal - Glukoz Agar) üreyebilirler. Koloni sayısı, maddenin mutajenik aktivitesi için bir ölçüdür.

Ames testinde kullanılan *Salmonella typhimurium* bakteri suşlarından TA 1535 ve TA 100, TA104 ve TA102 baz çifti değişimine neden olan mutajenlerin, TA 1537, TA 1538 ve TA 97, TA 98 ise kalıp kaymasına neden olan mutajenlerin tespitinde kullanılır.

Nestmann ve arkadaşları, Ames testinde kullanılan *Salmonella* suşlarının aynı anda kullanıldığı yeni bir test (Simul Test) geliştirmişlerdir (34).

SOS genlerinin onarım mekanizmalarından yararlanmak suretiyle genotoksik aktivite tayini yönünde yapılan çalışmalar sonucunda Quillardet ve arkadaşları (1982) SOS-Kromotest denilen ve genotoksik maddelerin bir *Escherichia coli* suşunda meydana getirdikleri SOS cevabına dayanan kısa süreli bir tarama testi geliştirmişlerdir (35-39).

SOS-Fonksiyonları bakteri hücre DNA'sında meydana gelen bir hasar sonucunda hücre bölünmesinin inhibe edilmesi gibi çeşitli onarım mekanizmalarını içeren kompleks reaksiyonlardır.

E. coli PQ 37 suşunda β -galaktosidaz aktivitesinden sorumlu yapısal gen olan lac Z'in kontrolü SOS-Onarım genleri olan sfi A genlerinin kontrolüne verilmiştir.

DNA'da meydana gelen bir hasar sonucunda SOS-Fonksiyonları indüklenerek sfi A genlerinin ifadesine ve sonucunda da β -galaktosidaz aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. β -galaktosidaz aktivitesi ise kolorimetrik bir yöntem ile ölçülmektedir.

SOS-Onarım genlerinden yararlanılarak geliştirilen diğer bir kısa süreli tarama testi de çalışmamızda kullandığımız **UMU testi**dir.

Oda ve arkadaşları umu C'-lac Z segmentlerini içeren bir plazmidin (pSK 1002) *Salmonella typhimurium* TA 1535'e transferini gerçekleştirdiler. Testin esası, *Salmonella typhimurium* TA 1535 / pSK 1002 suşunda genotoksik bir etki sonucu indüklenen umu gen ifadesine bağlı olarak artan β -galaktosidaz aktivitesinin kolorimetrik olarak ölçülmesidir (40-46).

"Host-mediated" test sisteminde ise bir mikroorganizma (*Bacillus subtilis*, *Neurospora crassa*) indikatör organizma olarak, bir memeli de (fare, sıçan) test sistemi olarak kullanılır (47). İndikatör organizma İ.P. yoldan test sistemi

memeliye enjekte edilir. Mutajenik etkisi araştırılacak kimyasal madde başka bir yolla hayvana tatbik edilir. Belirli bir süre sonra mikroorganizmalar peritoneal bölgeden çıkarılır ve kontrol ile karşılaştırılarak mutasyon sıklığı hesaplanır. Bu yöntemle direkt mutajenler yanında, memelide biyotransformasyon sonucu mutajenik aktivite kazanan metabolitlerin de mutajenik etkisi araştırılabilir.

İnvivo test sistemlerinden en yaygın kullanılanı *Drosophila melanogaster* türü meyva sinekleridir. Toksik maddeleri memelilere benzer şekilde metabolize ettiği için tercih edilmektedir. Gerek gamet hücrelerindeki mutasyonların, gerekse somatik hücrelerdeki mutasyonların tespitinde kullanılır (48-50).

Sitogenetik testlerde ise genotoksik etki mikroskobik olarak direkt tespit edilebilir. Yeterli sayıda ve stabil hücreler, kısa gelişme dönemi, düzgün karyotip, az sayıda ve iri kromozomlar sitogenetik çalışmalar için idealdir. İnvivo ve invitro sitogenetik çalışmalarında periferik kan -T- lenfosit kültürleri en uygun hücre kültürleridir. Bu testlerde genotoksik etkiler sonucu meydana gelen yapısal ve sayısal kromozom anomalileri ve kardeş kromatid değişikliği (SCE = Sister chromatid exchange) mikroskobik olarak teşhis edilebilir (1, 51-55).

Kromozom kırılmalarına neden olan maddelerin tespiti için tercih edilen invivo yöntemlerden biri de fare eritrositleri ile yapılan Mikronukleus testidir (4, 8).

Gamet hücrelerinde mutasyonların araştırılmasında kullanılan invivo testlerden biri de kemiricilerle yapılan "Dominant Letal Testtir" (2, 4, 8).

2.5. Mutajen (Genotoksik) Maddeler

Genotoksik kimyasal maddelerin bir kısmı direkt etkili ajanlardır. Alkil sülfonik asit esterleri, epoksitler, aromatik N-oksitler, aromatik nitro bileşikleri, laktonlar, alkilnitrozoüreler, alkilnitrozamidler direkt etkili mutajen maddelerdir. Bu maddeler elektrofilik özellikte olup, DNA'daki nükleofilik merkezlere bağlanarak adukt oluştururlar.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, alkil ve arilnitrozaminler, aromatik azo bileşikleri, alifatik vinil bileşikleri, aflatoksinler, safrol ise indirekt etkili yani promutajen maddelerdir.

Bu maddeler, endoplazmik retikulumda yerleşmiş olan karma fonksiyonlu oksijenazlar ile aktive olarak elektrofilik bileşiklerine dönüşürler.

Promutajenlerin kısa süreli testler ile araştırılması sırasında test ortamında memeli metabolizmasını sağlamak gerekmektedir. Mutajenite testlerinde kullanılan standart karaciğer metabolik aktivasyon sistemi, "S9 karışımı" olarak adlandırılır. S9 karışımı, S9 fraksiyonunu, gerekli tamponları ve kofaktörleri içerir. S9 fraksiyonunun hazırlanmasında doku homojenizatı (karaciğer) kullanılır. Doku homojenizatları 9000 g'de santrifüj edildikten sonra ayrılan supernatant (S9 fraksiyonu) endoplazmik retikulum, ribozomlar, çözülmüş enzimler ve endojen kofaktörleri içerir.

Metabolik aktivasyonu arttırmak için sıçanlara fenobarbital, 3-metil kolantrén veya Araclor 1254 verilerek enzim indüksiyonu sağlanır (6).

2.6. Bitkisel Kaynaklı Mutajen Maddeler :

Bitkisel kökenli droglar çok eski devirlerden beri hastalıklara karşı kullanılmakla beraber, aktif bileşikleri ve etki mekanizmaları hakkındaki bilgile-

re ancak, 19. y.y'n ortalarından itibaren yani yaklaşık 150 seneden beri sahip olunmaya başlanmıştır. Dünya üzerinde bulunan bitkilerden yaklaşık 20000 türün tıbbi maksatlar için kullanıldığı bilinmektedir. Türkiyede yetişmekte olan 8500 türden ise ancak 500 kadarı tedavide kullanılmaktadır.

Bitkisel droglarda, etkili saf bileşiklere oranla, efektif doz ile letal doz arasındaki mesafe oldukça geniştir. Bu nedenle, bitkisel droglar ile zehirlenerek ölüm ihtimali saf etkili maddelere oranla daha azdır. Bu da, halk arasında, etkili madde yerine bitkisel drogların kullanılmasının tercih edilmesine neden olmaktadır.

Bünyelerinde çok değişik yapıda kimyasal maddelerin bulunduğu bitkisel drogların insan sağlığı açısından oluşturabileceği risklerin araştırılması gerekmektedir. Bu konuda yapılan çalışmaların önemli bir bölümünü de bitkisel drogların mutajenik (genotoksik) aktivitelerinin araştırılması teşkil etmektedir (56-59).

Kersetin, bitkisel kökenli mutajenlerden en aktif olanıdır. Bir çok bitki ekstresinin genotoksik aktivitesinin içerdiği kersetinden ileri geldiği çeşitli araştırma gruplarınca saptanmıştır (60).

Ramnetin ve kamferol, kersetine oranla daha zayıf aktivite gösteren flavonoidlerdir (60, 61).

Ruta Herba bitkisinin tentüründe Ames testi ile yapılan mutajenite testinde *Salmonella typhimurium* TA 98 suşuna karşı metabolik aktivasyonsuz kuvvetli bir mutajenik etki gözlenmiştir. Ekstrenin G.C ve G.C / M.S. ile incelenmesi sonucunda furokinolin alkaloidlerini içerdiği ve mutajenik aktiviteden de bu maddelerin sorumlu olduğu saptanmıştır (62).

Westendorf ve arkadaşları, hidroksi antrakınonların değişik test sistemlerinde mutajenik aktivitelerini araştırmış ve bunlar arasında lusidin ve aloemodin'in genotoksik aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir (63).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözeltiler ve Aletler

Kimyasal Maddeler

Sodyumdihidrojen fosfatdihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)

Disodyumhidrojenfosfatheptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck)

Sodyumklorür (NaCl) (Merck)

Magnezyumsülfatheptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck)

β -merkapttoetanol (Merck)

Glukoz (Merck)

o-Nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG) (Sigma)

Bactotripton (Difco)

Maya özeti (Difco)

Ampisilin-Na (Fako İlaç Fabrikası)

4- Nitrokinolin - 1- oksid (NQO) (Sigma)

4- Nitro-o-fenilendiamin (NODP) (Sigma)

Dipotasyumhidrojenfosfat (K_2HPO_4) (Merck)

Potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4) (Merck)

Dodesilhidrojensülfat sodyumtuzu (SDS) (Merck)

Kloroform (CHCl_3) (Merck)

Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck)

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck)

2- Aminoantrasen (2-AA) (Sigma)

Dimetilbenzantrasen (DMBA) (Sigma)

Potasyumklorür (KCl) (Riedel)

Magnezyumklorürhexahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck).

Glukoz-6-fosfat (Merck)

β -nikotinamidadenindinükleotidfosfat (NADP) (Sigma)

Distile su.

Çözeltiler

Z - tamponu :

0.04M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.06 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.01 M NaCl

0.001M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.05 M β -merkapttoetanol

6.24 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 16.08g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.584 g NaCl, 0.246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ birmiktar distile suda çözüldü. 2.7 ml β -merkapttoetanol ilave edildikten sonra 1l'ye tamamlandı.

% 0.2 Glukoz çözeltisi :

2g Glukoz 1000 ml distile suda çözöldü. Otoklavda 109°C'de 1 saat sterilize edildi.

ONPG çözeltisi :

4 mg ONPG, 1ml 0.1 M Na-fosfat tamponunda çözöldü.

0.1 M Na-fosfat tamponu :

Çözelti A : (0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 1.56g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 ml distile suda çözöldü.

Çözelti B: (0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 2.68 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 ml distile suda çözöldü.

39 ml A-çözeltisi ile 61 ml B-çözeltisi karıştırıldı.

LB-medium :

Bactotripton % 1

NaCl % 0.5

Maya özeti % 0.5

10 g Bactotripton, 5g NaCl, 5g Maya özeti, 1000 ml distile suda çözöldü. Otoklavda 121°C'de 20 dak. sterilize edildi.

TGA - medium :

Bactotripton % 1

NaCl % 0.5

Glukoz % 0.2

0.75 g Bactotripton, 0.375 g NaCl, 75 ml distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C'de 20 dak. sterilize edildi. Steril % 0.2 Glukoz çözeltisinden 25 ml ilave edildi.

K-fosfat tamponu :

Çözelti A: 17.42g K_2HPO_4 1 l distile suda çözüldü.

Çözelti B: 13.61 g KH_2PO_4 1l distile suda çözüldü.

100 ml A-çözeltisi ile 32 ml B-çözeltisi karıştırıldı.

Stok Ampisilin çözeltisi :

0.5 g Ampisilin-Na, 2 ml steril distile suda çözüldü.

Seyreltik Ampisilin çözeltisi :

40 µl stok ampisilin çözeltisi ile 960 µl steril distile su karıştırıldı.

% 0.1 SDS çözeltisi :

100 mg SDS, 100 ml distile suda çözüldü.

1M Na_2CO_3 çözeltisi :

1.06 g Na_2CO_3 , 10 ml distile suda çözüldü.

1M KCl çözeltisi :

3.728g KCl, 50 ml distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C'de 15 dak. sterilize edildi.

0.25 M $MgCl_2.6H_2O$ çözeltisi :

2.541 g $MgCl_2.6H_2O$, 50 ml distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C'de 15 dak. sterilize edildi.

0.2 M Glukoz -6-fosfat çözeltisi :

0.564 g Glukoz -6- fosfat 10 ml steril distile suda çözöldü. 0.45µm por büyüklüğü olan Whatman filtreden süzülererek sterilize edildi.

0.04 M NADP çözeltisi :

30.6 mg NADP, 1 ml steril distile suda çözöldü. 0.45µm por büyüklüğü olan Whatman filtreden süzülererek sterilize edildi.

0.2 M NaHPO₄ tamponu :

3.12 g NaH₂PO₄. 2H₂O, 75 ml distile suda çözöldü. 1 N NaOH ile pH 7.0'ye ayarlandı. Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dak. sterilize edildi.

Pozitif kontrollerin stok çözeltileri :

NQO Stok çözeltisi :

1mg NQO, 1 ml DMSO içinde çözöldü. Gerekli seyreltmeler DMSO ile yapıldı.

NODP Stok çözeltisi :

10 mg NODP, 1 ml DMSO içinde çözöldü. Gerekli seyreltmeler DMSO ile yapıldı.

2-AA Stok çözeltisi :

2 mg 2-AA tartıldı ve 1 ml DMSO'de çözöldü. Gerekli seyreltmeler DMSO ile yapıldı.

DMBA Stok çözeltisi :

2 mg DMBA tartıldı ve 1.5 ml DMSO'de çözöldü. Gerekli seyreltmeler DMSO ile yapıldı.

Bitkisel çay ekstralarının hazırlanması :

I- Barsak kurtları ve parazitler için çay (% 0.5):

0.5 g çay tartıldı ve 100 ml distile su içinde 5 dak. kaynatılıp 10 dak. demlendikten sonra süzülerek kullanıldı. Gerekli seyreltmeler distile su ile yapıldı.

II- Hücre yenileyici olarak kullanılan çay (% 1.5):

1.5 g çay tartıldı ve 100 ml distile su içinde 5 dak. kaynatıldı ve süzüldü. Gerekli seyreltmeler distile su ile yapıldı.

III- Zayıflama çayı (% 20) :

20 g çay tartıldı, 100 ml distile su içinde 5 dak. kaynatıldı ve süzüldü. Gerekli seyreltmeler distile su ile yapıldı.

IV- Öksürük çayı (% 10) :

10 g çay tartıldı ve 100 ml distile suda 5 dak. kaynatıldı ve süzüldü. Seyreltmeler için distile su kullanıldı.

V- Böbrek taş, kum, iltihap, idrar sıkıntısı rahatsızlıkları için çay (%0.2):

0.2 g çay tartıldı. 100 ml distile suda 5 dak. kaynatıldı, 10 dak. demlendikten sonra süzüldü. Gerekli seyreltmeler distile su ile yapıldı.

VI- Kaşıntı çayı (% 0.4):

0.4 g çay tartıldı ve 100 ml distile suda 5 dak. kaynatıldı. 10 dak. demlendikten sonra süzüldü. Gerekli seyreltmeler distile su ile yapıldı.

VII- Damar tıkanıklığı, migren, sinüzit için çay (% 0.2):

0.2 g çay tartıldı ve 100 ml distile suda 5 dak. kaynatıldı. 10 dak. demlendi ve süzüldü. Seyreltmeler için distile su kullanıldı.

VIII- Nefes darlığı, astım, bronşit için çay (% 0.5):

0.5 g çay tartıldı. 100 ml distile suda 5 dak. kaynatıldı, 10 dak. demlendi ve süzüldü. Seyreltmeler distile su ile yapıldı.

IX- Yüksek tansiyon ve altını ıslatan çocuklar için çay (% 0.2):

0.2 g çay tartıldı. 100 ml distile suda 5 dak. kaynatıldı ve süzüldü. Gerekli seyreltmeler distile su ile yapıldı.

X- Şeker hastalığı için çay (% 1) :

1 g çay tartıldı, 100 ml distile su içinde 5 dak. kaynatıldı ve süzüldü. Gerekli seyreltmeler distile su ile yapıldı.

Aletler

pH metre : Nel Elektronik

Spektrofotometre : Bausch-Lomb

Çalkalayıcı etüv : Lab-Line

Çalkalayıcı su banyosu : BM 102 - Nüve

Etüv : Dedeoğlu

Pastör Fırını : Elektro-Mag

Otoklav : Kelmanlar

- 80°C Soğutucu : So-Low Environmental Equip. Co.

Hassas terazi : Mettler AE 50

Soğutuculu Santrifüj : Hettich.

Manyetik karıştırıcı : Elektro-Mag

0.45 µm por büyüklüğü olan Whatman filtre

3.2. S9 Fraksiyonunun hazırlanması

S9 fraksiyonu hazırlanması için Fenobarbital ile indüklenmiş sıçandan elde edilen karaciğer homojenizatı kullanıldı.

196 g ağırlığında Sprague Dawley erkek sıçana kesilmeden 5 gün önce başlanarak, üç gün İ.P. yoldan Fenobarbitalin, Propilen Glikoldeki çözeltisi günlük doz 16 mg/ml olacak şekilde uygulandı. Dördüncü gün enjeksiyon yapılmadı ve sıçan kesilmeden 12 saat önce aç bırakıldı. Beşinci gün servikal dislokasyon ile öldürüldü ve karaciğeri steril şartlarda 0.15 M KCl içerisine alındı. Bu işlemler sırasında soğuk ve steril aletler ile çözeltiler kullanıldı.

Karaciğer , Sitokrom P-450'nin aktivitesini inhibe edebilen hemoglobinin uzaklaştırılması için bir kaç kez 0.15 M KCl çözeltisi ile yıkandı ve 0.15 M KCl içine alınarak homojenize edildi. Bu şekilde elde edilen homojenizat, 10 dak. 9000 g (8700 rpm) santrifüj edildi. Supernatant (S9 fraksiyonu) ayrıldı ve daha sonra kullanılmak üzere -80°C de muhafaza edildi.

% 10 S9 karışımının hazırlanması

	<u>10ml</u>
1M KCl	0.33
0.25 M MgCl ₂ .6H ₂ O	0.32
0.2 M Glukoz-6-fosfat	0.25
0.04 M NADP	1.00
0.2 M NaHPO ₄	5.00
Distile su	2.10
S9 fraksiyonu	1.00

Kullanılmadan hemen önce karıştırılarak hazırlandı.

3.3. UMU -Testi

3.3.1. Pozitif kontroller ile çalışma

Salmonella typhimurium TA 1535 / pSK 1002 suşu 50 µg/ml ampicilin içeren 5 ml LB besiyerine ekildi. 16 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin bitiminde bakteri kültürü 50 µg/ml ampicilin içeren TGA besiyeri ile 20 kez seyreltildi ve bakteri dansitesi 600 nm de 0.25-0.35'e ulaşınca ya kadar sürekli çalkalanmak suretiyle 37°C'de tekrar inkübasyona bırakıldı.

Bakteri kültüründen 2.4 ml lik kısımlar deney tüplerine alındı, her bir tübe 0.1 ml test (pozitif kontrol) çözeltisi ve 0.5 ml 0.1 M K-Fosfat tampon çözeltisi ilave edildi. Pozitif kontrol çözeltisi olarak 2-AA ve DMBA kullanıldığında 0.1 M K-Fosfat tamponu yerine 0.5 ml S9 karışımı ilave edildi. 2 saat 37°C'de sürekli çalkalanmak suretiyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin bitiminde β-galaktosidaz aktivitesi Miller metoduna göre hesaplandı (64).

Miller Metoduna göre β-galaktosidaz aktivitesi tayini

Bölüm 3.3.1'e göre hazırlanan inkübasyon çözeltisinden 0.1 ml deney tüplerine alındı. 0.9 ml Z-tamponu, 25 µl % 0.1 SDS çözeltisi ve 5 µl Kloroform ilave edilerek karıştırıldı. 0.2 ml ONPG çözeltisi ilave edildikten sonra 28°C'de 15 dak. inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 0.5 ml 1 M Na₂CO₃ ilavesi ile durduruldu. Çözeltinin absorbansı 420 nm ve 550 nm de ölçüldü. İnkübasyon çözeltisinden kalan kısmın (2.9 ml) absorbansı 600 nm de ölçüldü.

β-galaktosidaz aktivitesinin hesaplanması :

β-galaktosidaz aktivitesi Millerin geliştirdiği aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\beta\text{-galaktosidaz aktivitesi (Ünite)} = \frac{1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550})}{t \times V \times \text{OD}_{600}}$$

OD₄₂₀ = 420 nm deki absorbands

OD₅₅₀ = 550 nm deki absorbands

OD₆₀₀ = 600 nm deki absorbands

t = Reaksiyon süresi (15 dak.)

V = Tayinde kullanılan inkübasyon çözeltisinin hacmi (0.1 ml)

$$\text{İndüksiyon faktörü (I)} = \frac{\text{Çalışılan konsantrasyonların } \beta\text{-galaktosidaz aktivitesi}}{\text{Kontrol seviyesinin } \beta\text{-galaktosidaz aktivitesi}}$$

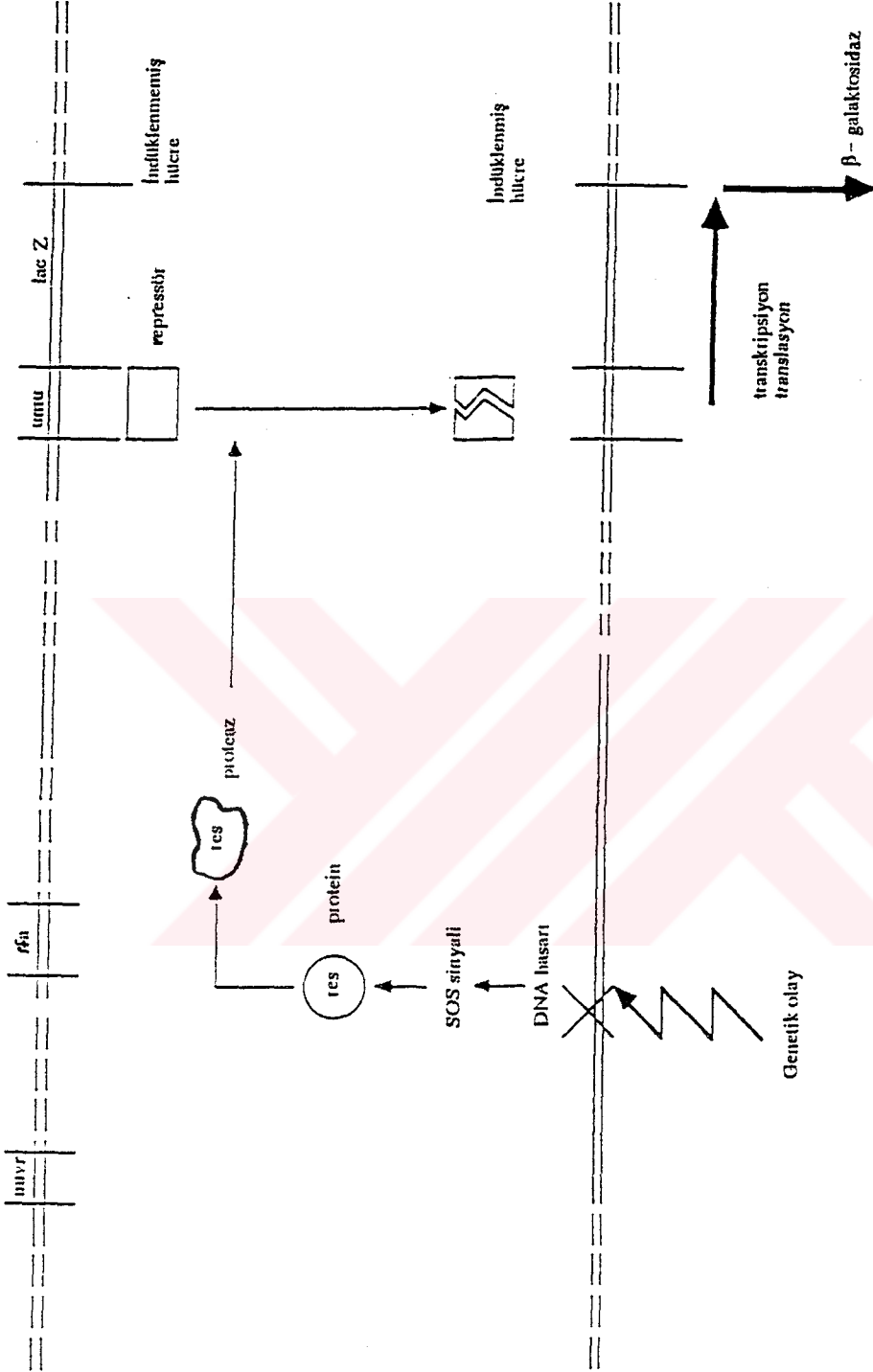
3.3.2. Bitkisel çay ekstreleri ile çalışma

Bitkisel çayların ekstreleri aktar tarafından belirlenen oranlarda, distile su ile kaynatılıp 10 dakika bekletildi ve süzülerek taze hazırlandı. Bölüm 3.3.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri kültüründen 2.4 ml'lik kısımlar deney tüplerine alındı. Her bir tübe çay ekstreleri (0.1 ml) ve 0.5 ml 0.1 M K-Fosfat tamponu veya 0.5 ml S9 karışımı ilave edildi. 2 saat 37°C'de sürekli çalkalanmak suretiyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bitiminde β -galaktosidaz aktivitesi Miller Metoduna göre tayin edildi. Yapılan her bir çalışmaya paralel olarak S9 karışımsız denemelerde NQO (0.5 µg/ml) ile, S9 karışımı ilave edilerek yapılan denemelerde 2-AA (4 µg/ml) ile çalışıldı.

4. BULGULAR

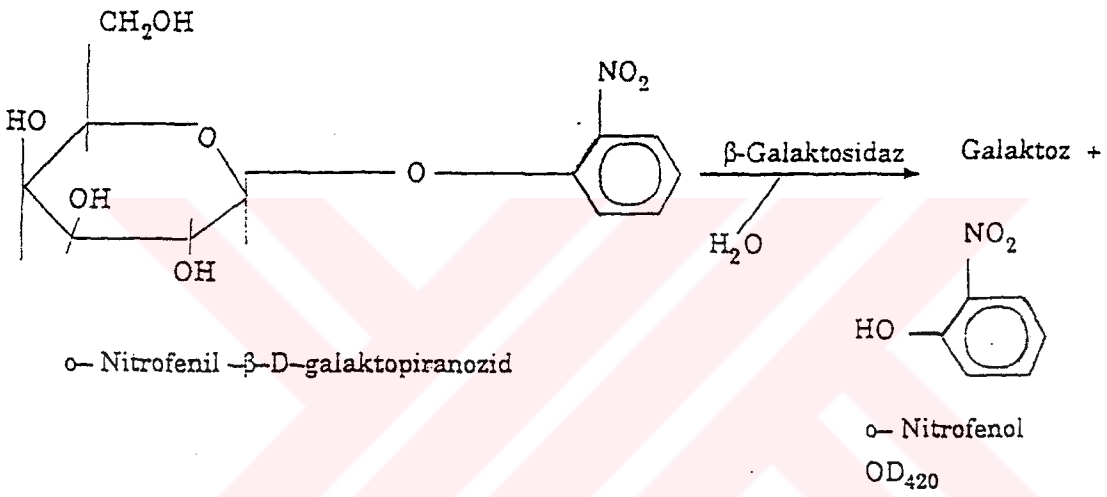
S. Typhimurium TA 1535/pSK 1002 suşu içerdği umu C'-lac Z genleri ile mutajen ve karsinojen kimyasal maddelere karşı hassas bir özellik kazanmıştır. Mutajen bir etken tarafından meydana gelen DNA hasarına karşı hücrede oluşan SOS sinyali umu operonunu indükleyerek β -galaktosidaz aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. (Şekil 4.1.)





Şekil 4.1. UMU- Testi'nin prensibi

β galaktosidaz, β -D-galaktozidlerini hidroliz eden bir enzimdir. Renksiz bir substrat ortamda bulunduğunda, β -galaktosidaz tarafından renkli ürünlere hidroliz olur. o-Nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG) bu özellikte bir substrattır. β -galaktosidaz tarafından galaktoz ve o-nitrofenole hidroliz olur. Sarı renkli o-nitrofenolün absorbanansı 420 nm de ölçülür. Ortamda kâfi miktarda ONPG bulunduğunda, oluşan o-nitrofenolün miktarı β -galaktosidaz miktarı ile orantılıdır. (Şekil 4.2)



Şekil 4.2. ONPG'nin β -galaktosidaz tarafından Galaktoz ve o-Nitrofenole hidrolizi

4.1. NQO ve NODP ile Çalışmalar

Umu testi. metabolik aktivasyona ihtiyaç göstermeyen, direkt etkili iki pozitif kontrole uygulandı. Çözücü kontrol olarak DMSO kullanıldı. NQO ile 0.1-1.0 μ g/ml, NODP ile 5.0-40.0 μ g/ml konsantrasyon aralığında yapılan testler sonucunda hesaplanan β -galaktosidaz aktiviteleri ve indüksiyon faktörleri Tablo 4.1'de verilmektedir.

Tablo 4.1. Umu-Test sisteminde NQO ve NODP ile elde edilen sonuçlar

Madde (µg/ml)	β-galaktosidaz aktivitesi ^a (ünite)	İndüksiyon faktörü
NQO		
0 ^b	278 ± 26	1
0.1	559 ± 14	2.0
0.25	689 ± 30	2.5
0.5	953 ± 19	3.4
0.75	1041 ± 57	3.7
1.0	1261 ± 24	4.5
NODP		
0 ^b	255 ± 26	1
5	541 ± 27	2.1
10	671 ± 30	2.6
20	836 ± 25	3.3
30	940 ± 17	3.7
40	1203 ± 31	4.7

^a Ortalama ± SD (n=4)

^b Çözücü kontrol, DMSO (100 µl)

4.2. 2-AA ve DMBA ile Çalışmalar

İndirekt mutajen etki gösteren (promutajen) pozitif kontrollerden 2-AA ile 0.5 - 4.0 µg/ml, DMBA ile 2.0-12.0µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. İnkübasyon karışımına metabolik aktivasyonu sağlamak amacıyla S9 karışımı ilave edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de verilmektedir.

Tablo 4.2.Umu Test sisteminde 2-AA ve DMBA ile elde edilen sonuçlar

Madde (µg/ml)	β-galaktosidaz aktivitesi ^a (Ünite)	İndüksiyon faktörü
2-AA		
0 ^b	247 ± 5	1
0.5	301 ± 5	1.2
1	508 ± 9	2.1
2	734 ± 11	2.9
3	869 ± 9	3.5
4	972 ± 12	3.9
DMBA		
0 ^b	234 ± 11	1
2	391 ± 7	1.7
4	453 ± 9	1.9
8	548 ± 11	2.3
10	661 ± 12	2.8
12	746 ± 4	3.2

^a Ortalama ± SD (n=4)

^b Çözücü kontrol, DMSO (100 µl)

4.3 . Bitkisel Çaylar ile Yapılan Çalışmalar

Halk arasında tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılan 10 bitkisel çay örneği değişik aktarlardan temin edildi. Çay örneklerinden 3 tanesi tek bir drog içermektedir. Diğerleri ise değişik droglardan hazırlanmış karışımlardır.

Çalışmada kullanılan bitkisel çay örnekleri, içerikleri ve halk arasındaki kullanılışları Tablo 4.3'de belirtilmiştir.

Tablo 4.3. *Umu-Test Sisteminde genotoksik aktiviteleri incelenen bitkisel çaylar*

Örnek	İçerdiği Droglar	Kullanılışı
I	Lavanta (Lavandula sp.) Papatya (Anthemis sp.) Kantaron (Hypericum sp.) Pelin otu (Artemisia sp.)	Barsak kurtları ve parazitlere karşı
II	Isırgan otu (Urtica sp.)	Hücre yenileyici
III	Kuşburnu (Rosa canina) Sinameki (Cassia sp.) Funda (Erica sp.) Ardıç (Juniperus sp.)	Zayıflatıcı
IV	Hatmi (Althaea sp.) Kuşburnu (Rosa canina) Ardıç (Juniperus sp.) Tarçın (Cinnamomum sp.) Anason (Pimpinella anisum) Papatya (Anthemis sp.)	Öksürük çayı
V	At kuyruğu (Equisetum sp.) Altın otu (Helichrysum sp.) Rezene (Foeniculum vulgare) Maydanoz (Petroselinum crispum)	Böbrek, taş, kum iltihap, idrar sıkıntısı rahatsızlıklarına karşı

VI	At kuyruğu (<i>Equisetum</i> sp.) Kantaron (<i>Hypericum</i> sp.) Hayıt (<i>Vitex</i> sp.) Hevhulma (<i>Lythrum</i> sp.)	Kaşıntıya karşı
VII	Karabaş otu (<i>Lavandula</i> sp.)	Damar tıkanıklığı, migren, sinüzite karşı
VIII	Ökalyptus (<i>Eucalyptus</i> <i>camaldulensis</i>) Kuşburnu (<i>Rosa canina</i>) Papatya (<i>Anthemis</i> sp.) İhlamur (<i>Tilia</i> sp.) Hatmi (<i>Althaea</i> sp.)	Nefes darlığı, astım, bronşit rahatsızlıklarına karşı.
IX	Ökse otu (<i>Viscum</i> sp.)	Yüksek tansiyon ve altını ıslatan çocuklar için
X	Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>) Kuşburnu (<i>Rosa canina</i>) Ardıç (<i>Juniperus</i> sp.)	Şeker hastalığına karşı

Çay örnekleri aktarlar tarafından önerilen konsantrasyonlarda, distile su ile kaynatılıp 10 dak. bekletilerek hazırlandı. Gerekli seyreltmeler distile su ile yapıldı.

Her bir örnek ile 10.0-100.0 µl/ml konsantrasyon aralığında metabolik aktivasyon olmaksızın (-S9), 75 µl/ml ve 100 µl/ml konsantrasyonlarında metabolik aktivasyon (+S9) ile çalışıldı.

Çözücü kontrol olarak distile su kullanıldı. Çalışmaların sonucunda hesaplanan β -galaktosidaz aktiviteleri ve indüksiyon faktörleri Tablo 4.4'de verilmektedir.

Tablo 4.4. Bitkisel çay ekstraları ile yapılan Umu-Test sonuçları :

ÖRNEK	Konsant-rasyon (μ l/ml)	β -galaktosidaz aktivitesi ^a (ünite)		İndüksiyon faktörü	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
I	0 ^b	107 $\pm$ 4	127 $\pm$ 4	1	1
	10	109 $\pm$ 5		1	
	25	101 $\pm$ 11		< 1	
	50	107 $\pm$ 12		1	
	75	116 $\pm$ 10	223 $\pm$ 8	1.1	1.8
	100	106 $\pm$ 6	240 $\pm$ 9	< 1	1.9
II	0 ^b	107 $\pm$ 4	127 $\pm$ 4	1	1
	10	102 $\pm$ 4		< 1	
	25	100 $\pm$ 5		< 1	
	50	99 $\pm$ 5		< 1	
	75	107 $\pm$ 7	242 $\pm$ 4	1	1.9
	100	105 $\pm$ 9	259 $\pm$ 8	< 1	2.0
III	0 ^b	116 $\pm$ 5	142 $\pm$ 8	1	1
	10	118 $\pm$ 9		1	
	25	138 $\pm$ 7		1.2	
	50	169 $\pm$ 2		1.5	
	75	267 $\pm$ 9	304 $\pm$ 11	2.3	2.1
	100	208 $\pm$ 3	293 $\pm$ 9	1.8	2.0

^a Ortalama $\pm$ SD (n = 4)

^b Çözücü kontrol, distile su (100 μ l)

ÖRNEK	Konsant- rasyon (μ l/ml)	β -galaktosidaz aktivitesi ^a (ünite)		İndüksiyon faktörü	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
IV	0 ^b	116 $\pm$ 5	134 $\pm$ 3	1	1
	10	206 $\pm$ 11		1.8	
	25	260 $\pm$ 17		1.2	
	50	328 $\pm$ 9		2.8	
	75	396 $\pm$ 12	417 $\pm$ 4	3.4	3.1
	100	429 $\pm$ 11	441 $\pm$ 6	3.7	3.3
V	0 ^b	125 $\pm$ 6	246 $\pm$ 8	1	1
	10	122 $\pm$ 4		< 1	
	25	120 $\pm$ 11		< 1	
	50	125 $\pm$ 7		1	
	75	123 $\pm$ 7	328 $\pm$ 9	< 1	1.3
	100	111 $\pm$ 6	250 $\pm$ 6	< 1	1
VI	0 ^b	156 $\pm$ 8	134 $\pm$ 3	1	1
	10	138 $\pm$ 12		< 1	
	25	148 $\pm$ 10		< 1	
	50	145 $\pm$ 8		< 1	
	75	151 $\pm$ 13	213 $\pm$ 4	< 1	1.6
	100	143 $\pm$ 10	242 $\pm$ 4	< 1	1.8
VII	0 ^b	156 $\pm$ 8	257 $\pm$ 9	1	1
	10	164 $\pm$ 7		1.1	
	25	157 $\pm$ 8		1	
	50	154 $\pm$ 11		< 1	
	75	152 $\pm$ 13	239 $\pm$ 3	< 1	< 1
	100	155 $\pm$ 11	247 $\pm$ 4	< 1	< 1

^a Ortalama $\pm$ SD (n = 4)

^b Çözücü kontrol, distile su (100 μ l)

ÖRNEK	Konsant- rasyon (μ l/ml)	β -galaktosidaz aktivitesi ^a (ünite)		İndüksiyon faktörü	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
VIII	0 ^b	89 $\pm$ 3	141 $\pm$ 3	1	1
	10	86 $\pm$ 2		< 1	
	25	88 $\pm$ 3		< 1	
	50	87 $\pm$ 2		< 1	
	75	92 $\pm$ 2	164 $\pm$ 4	1	1.2
	100	88 $\pm$ 3	187 $\pm$ 5	< 1	1.3
IX	0 ^b	89 $\pm$ 3	246 $\pm$ 8	1	1
	10	91 $\pm$ 3		1	
	25	98 $\pm$ 2		1.1	
	50	96 $\pm$ 2		1.1	
	75	93 $\pm$ 2	265 $\pm$ 7	1	1.1
	100	94 $\pm$ 2	281 $\pm$ 8	1.1	1.1
X	0 ^b	134 $\pm$ 11	257 $\pm$ 9	1	1
	10	123 $\pm$ 7		< 1	
	25	134 $\pm$ 9		1	
	50	132 $\pm$ 5		< 1	
	75	136 $\pm$ 5	266 $\pm$ 5	1	1
	100	134 $\pm$ 7	293 $\pm$ 7	1	1.1

^a Ortalama $\pm$ SD (n = 4)

^b Çözücü kontrol, distile su (100 μ l)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Umu-testi ile, genotoksik maddelerin aktiviteleri, *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002 suşunda, umu operonda meydana getirdikleri indüksiyonun kolorimetrik olarak ölçülmesi suretiyle oldukça çabuk ve hassas bir şekilde tayin edilmektedir. Umu-testi ile bir çok çevresel mutajen ve karsinogen maddenin genotoksik aktiviteleri incelenmiş ve sonuçlar Ames testi sonuçları ile uyum göstermiştir (40, 41).

Bu çalışmada umu-test sistemi ile halk arasında tedavi amacıyla kullanılan bazı bitkisel çayların genotoksik (mutajenik) aktiviteleri araştırılmıştır.

Çalışmamızda, önce kendi laboratuvar koşullarımızda yaptığımız umu-testi ile elde edilen sonuçları literatürde verilen sonuçlarla karşılaştırmak amacıyla dört pozitif kontrole çalışılmıştır. NQO ve NODP ile metabolik aktivasyonsuz ortamda yapılan umu-testi sonucunda, çalışılan en yüksek konsantrasyonlarda elde edilen indüksiyon faktörleri NQO (1µg/ml) için 4.5, NODP (40 µg/ml) için 4.7 dir. Literatürde aynı konsantrasyonlar için verilen değerler sırasıyla 5.3 ve 4.2 dir.

Birer promutajen olan 2-AA ve DMBA ile yapılan çalışmalar sonucunda çalışılan en yüksek konsantrasyonlarda elde edilen indüksiyon faktörleri 2-AA (4 µg/ml) için 3.9 ve DMBA (12 µg/ml) için 3.2 dir. Literatürde aynı konsantrasyonlar için belirtilen değerler 4.4 ve 2.8 dir.

Literatür verilerinde kontrol düzeyine göre β-galaktosidaz aktivitesinde 2 kat artış (İndüksiyon faktörü (I) = 2), umu-test sonucunun pozitif olduğunu ifade etmektedir.

Kuvvetli mutajenler, β -galaktosidaz aktivitesinde 6 kat ($I=6$), orta derecede mutajenler 3 kat ($I=3$), zayıf mutajenler ise 2 kat ($I=2$) artış meydana getirirler.

Deneylerimizde , kontrol düzeyi β -galaktosidaz aktivitesi DMSO için 234-278 ünite, distile su için ise 80-257 ünite olarak bulunmuştur.

Pozitif kontrollerden elde edilen değerlerin literatürde verilenlerle uyum göstermesinden sonra 10 adet bitkisel çay örneğinin aktar tarafından öngörülen şekilde hazırlanan ekstreleri ile öncelikle metabolik aktivasyonsuz ortamda çalışılmıştır.

III ve IV nolu örneklerde metabolik aktivasyon ile ve metabolik aktivasyonsuz, zayıf bir β -galaktosidaz aktivitesi görülmüştür.

III nolu örnek ile 75 $\mu\text{l/ml}$ konsantrasyonda S9 karışımı olmaksızın elde edilen β -galaktosidaz aktivitesi 267 ± 9 dur. İndüksiyon faktörü ise 2.3 dür. Metabolik aktivasyon sonucu, 75 $\mu\text{l/ml}$ ve 100 $\mu\text{l/ml}$ 'lik konsantrasyonlar için hesaplanan β -galaktosidaz aktiviteleri sırasıyla 304 ± 11 ve 293 ± 9 , indüksiyon faktörleri ise 2.1 ve 2.0 dir.

IV nolu örneğin β -galaktosidaz aktivitesinde, uygulanan ekstre miktarına bağlı olarak artış görülmektedir. Metabolik aktivasyonsuz 50-100 $\mu\text{l/ml}$ konsantrasyon aralıkları için hesaplanan β -galaktosidaz aktiviteleri sırasıyla 328 ± 9 , 396 ± 12 ve 429 ± 11 , indüksiyon faktörleri ise 2.8, 3.4 ve 3.7 dir. Metabolik aktivasyon uygulandığında indüksiyon faktöründe bir azalma görülmektedir. 75 $\mu\text{l/ml}$ konsantrasyon için hesaplanan β -galaktosidaz aktivitesi 417 ± 4 , indüksiyon faktörü 3.1, 100 $\mu\text{l/ml}$ için ise sırasıyla 441 ± 6 ve 3.3 dür.

Diğer 8 bitkisel çay örneği **umu test** sisteminde metabolik aktivasyonsuz ve metabolik aktivasyonlu aktivite göstermemişlerdir.

Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin çok farklı yapılarda birçok kimyasal madde içermeleri nedeniyle yapılan invitro mutajenite testleri, bu kimya-

sal maddelerin genotoksik aktivitelerinin değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Gerek alışmamızda kullanılan bitkisel çay ekstrelerinin gerekse diğer tıbbi amaçla kullanılan bitki ekstrelerinin, insan sağlığı açısından tehlikesizce kullanılabilmesi için daha fazla araştırmaya gerek vardır.



6. ÖZET

Bu çalışmada halk arasında tedavi amacıyla kullanılan bazı bitkisel çayların genotoksik (mutajenik) aktiviteleri umu-test sistemi ile incelendi.

Bitkisel çayların, umu C'-' lac Z segmentlerini içeren bir plazmid (pSK 1002) transfer edilmiş olan ve *Salmonella typhimurium* TA 1535 / pSK 1002 olarak bilinen yeni bir test suşundaki umu gen ifadesini indüklemeye yeteneğine bağlı olan β -galaktosidaz aktivitesi kolorimetrik bir yöntemle ölçüldü. Test hem metabolik aktivasyonsuz (-S9) hem de metabolik aktivasyon ilave edilerek (+S9) uygulandı.

Sonuç olarak; kullanılan 10 bitkisel çaydan iki tanesi zayıf mutajenik aktivite gösterdi.

7. SUMMARY

In this research the genotoxic (mutagenic) activities of some herbal teas used as folk medicines were investigated by the **umu-test** system.

The β -galactosidase activities were found to be dependent on the ability of herbal teas to induce umu gene expression in a new tester strain, *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002. A plasmid-borne umu C'-lac Z fused gene was introduced into this strain. The β -galactosidase activities were measured by a colorimetric assay. The tests were performed without and with the addition of activation system (S9).

Consequently, from 10 herbal teas used in this research, only two of them showed weak genotoxicity.

8. TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren ve her aşamasında sınırsız anlayış, destek ve yardımlarını gördüğüm, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Buket Alpertunga'ya, her zaman engin tecrübesi ve bilgisiyle yol gösterici olan Sayın Hocam Prof. Dr. F. Ömer Ersoy'a, çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımlarından dolayı Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Z. Gülden Omurtag'a ve değerli vaktini ayırarak yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Ertan Tuzlacı'ya, çalışmamı yürütebilmem için bana laboratuvarını açan Sayın Hocam Prof. Dr. Adile Çevikbaş'a ve de her zaman destek gördüğüm Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

9. KAYNAKLAR

- 1- Amdur, M.O., Dull, J., Klaassen, C.D.: Toxicology, 4 th ed., Pergamon Press, 1991.
- 2- Williams, P.L., Burson, J.L.: Industrial Toxicology, New York, Van Nostrand Reinhold, 1985.
- 3- World Health Organization : Environmental Health Criteria, 51: 11-23, 1985.
- 4- Hodgson, E., Levi, P.E.: Modern Toxicology, pp. 154-158, 268- 276, New York, Elsevier Science Publishing Co., 1987.
- 5- France, L. : IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplementum 4, 1982.
- 6- Venitt, S., Parry, J.M.: Mutagenicity Testing, Oxford, IRL Press, 1984.
- 7- Lu, F.C.: Basic Toxicology, 2 nd ed., U.S.A., Hemisphere Publishing Co., 1991.
- 8- Poole, A., Leslie, G.B. : A Practical Approach to Toxicological Investigations, 1st ed., pp. 137, 146, Cambridge, Cambridge University Press, 1989.
- 9- Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutation Research, 113:173-215, 1983.
- 10- Akman, M.: Bakteri Genetiği, 1. baskı, ss. 111-115, 134, Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, 1977.
- 11- Derman, H. : Moleküler Biyoloji, ss. 24, 57, İstanbul, Baha Matbaası, 1970.
- 12- Tayşi, K., Say, B. : Tıbbi Genetik, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayını, 1975.
- 13- Kayaalp, O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 1., 5. baskı, s. 304-312, Ankara, Feryal Matbaacılık, 1989.
- 14- Timbrell, J.A. : Principles of Biochemical Toxicology, 1st ed., p. 161, London, Taylor and Francis L.T.D., 1982.

- 15- Hodgson, E., Guthrie, F.E.: Introduction to Biochemical Toxicology, p. 322, New York, Elsevier Science Publishing Co., 1980.
- 16- Sancar, A., Sancar, G.B. : Ann. Rev. Biochem., 57: 29-67, 1988.
- 17- Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y.: Ann. Rev. Biochem., 57:133-57, 1988
- 18- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 2281-2285, 1973.
- 19- Durston, W.E., Ames, B.N. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 737-741, 1974.
- 20- Ames, B.N., Mc Cann, J., Yamasaki, E.: Mutation Research, 31: 347-364, 1975.
- 21- Ames, B.N., Kammen, H.O., Yamasaki, E.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 : 2423-2427, 1975.
- 22- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 : 5135-5139, 1975.
- 23- Mc Cann, J., Ames, B.N. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 950-954, 1976.
- 24- Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T., Okada, M.: Mutation Research, 48: 121-130, 1977.
- 25- Yamasaki, E., Ames, B.N. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 3555-3559, 1977.
- 26- Summer, K.H., Göggelmann, W., Greim, H.: Mutation Research, 70:269-278, 1980.
- 27- Rosenkranz, H.S., Mc Coy, E.C. et al: Science, 209: 1039-1043, 1980
- 28- Zeiger, E., Pagano, D.A., Robertson, I.G.C.: Environmental Mutagenesis, 3:205-209, 1981.
- 29- Yamaguchi, T.: Mutation Research, 224:493-502, 1989.
- 30- Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A., Ames, B.N.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 7445-7449, 1982.
- 31- Levin, D.E., Yamasaki, E., Ames, B.N. : Mutation Research, 94: 315-330, 1982.

- 32- Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Ames, B.N.: *Methods in Enzymology*, 105: 249-254, 1984.
- 33- Marnett, L.J., Hurd, H.K., Hollstein, M.C., Levin, D.E., Esterbauer, H., Ames, B.N.: *Mutation Research*, 148: 25-34, 1985.
- 34- Nestmann, E.R., Brillinger, R.L., Mc Pherson, M.F., Maus, K.L.: *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 10: 169-181, 1987.
- 35- Quillardet, P., Huisman, O., D'ari, R., Hofnung, M.: *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 79: 5971-5975, 1982.
- 36- Quillardet, P., Hofnung, M.: *Mutation Research*, 147: 65-78, 1985.
- 37- Quillardet, P., Bellecombe, C., Hofnung, M.: *Mutation Research*, 147: 79-95, 1985.
- 38- Eder, E., Favre, A., Stichtmann, C., Deininger, C.: *Toxicology Letters*, 48:225-234, 1989.
- 39- Eder, E., Deininger, C., Kütt, W.: *Mutation Research*, 211: 51-64, 1989.
- 40- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H. : *Mutation Research*, 147 : 219-229, 1985
- 41- Nakamura, S., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I., Sugimoto, K.: *Mutation Research*, 192 : 239-246, 1987.
- 42- Shimada, T., Nakamura, S.: *Biochemical Pharmacology*, 36:1979-1987, 1987.
- 43- Sakagami, Y., Yamazaki, H., Ogasawara, N., Yokoyama, H., Ose, Y., Sato, T. : *Mutation Research*, 209: 155-160, 1988.
- 44- Nakamura, S., Oda, Y., Ugawa, M.: *Mutation Research*, 229: 11-15, 1990.
- 45- Oda, Y., Shimada, T., Watanabe, M., Ishidate, Jr. M., Nohmi, T.: *Mutation Research*, 272: 91-99, 1992.
- 46- Oda, Y., Yamazaki, H., Watanabe, M., Nohmi, T., Shimada, T.: *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 21: 357-364, 1993.
- 47- Kada, T., Tutikawa, K., Sadaie, Y.: *Mutation Research*, 16: 165-174, 1972.
- 48- Graf, U., Moraga, A.A., Castro, R., Carrillo, E.D.: *Fd Chem. Toxic.*, 32:423-430, 1994.

- 49- Graf, U.: *Experientia* 51: 168-173, 1995.
- 50- Delgado - Rodriguez, A., Ortiz - Marttelo, R., Graf, U., Villalobos-Pietrini, R., Gomez-Arroyo, S.: *Mutation Research*, 341: 235-247, 1995.
- 51- Bauchinger, M., Dresch, J., Schmid, E., Hauf, R.: *Mutation Research*, 102: 83-88, 1982.
- 52- Bauchinger, M., Schmid, E., Dresch, J., Kolin-Gerresheim, J., Hauf, R., Suhr, E.: *Mutation Research*, 102 : 439-445, 1982.
- 53- Bauchinger, M., Dresch, J., Schmid, E., Berdel, W.E.: *Mutation Research*, 121: 225-231, 1983.
- 54- Schmid, E., Bauchinger, M., Hauf, R.: *Mutation Research*, 142: 37-39, 1985.
- 55- Göggelmann, W., Bauchinger, M., Kulka, U., Schmid, E.: *Mutagenesis*, 3:137-140, 1988.
- 56- Robisch, G., Schimmer, O., Göggelmann, W.: *Mutation Research*, 105: 201-4, 1982.
- 57- Göggelmann, W., Schimmer, O.: *Mutation Research*, 121:191-194, 1983.
- 58- Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Leitão, A.C., Henriques, J.A.P.: *Mutation Research*, 240: 13-18, 1990.
- 59- Schimmer, O., Krüger, A., Paulini, H., Häfele, F.: *Pharmazie*, 49: 448-451, 1994.
- 60- Schimmer, O., Häfele, F., Krüger, A.: *Mutation Research*, 206: 201-208, 1988.
- 61- Czeczot, H., Tudek, B., Kusztelak, J., Szymczyk, T., Dobrowolska, B., Glinkowska, G., Malinowski, J., Strzelecka, H.: *Mutation Research*, 240: 209-216, 1990.
- 62- Paulini, H., Eilert, U., Schimmer, O.: *Mutagenesis* 2: 271-273, 1987.
- 63- Westendorf, J., Marquardt, H., Poginsky, B., Dominiak, M., Schmidt, J.: *Mutation Research*, 240: 1-12, 1990.
- 64- Miller, J.H.: *Experiments in Molecular Genetics* Cold Spring Harbor Laboratory, 352-355, 1972