MENTHA LONGIFOLIA L. HUDSON SSP. *LONGIFOLI*'DAN ELDE EDİLEN BAZI ETKEN MADDELERİN AMES/*SALMONELLA* VE MAYA DELESYON TEST SİSTEMLERİ İLE MUTAJEN VE ANTİMUTAJEN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Furkan ORHAN

Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji AnaBilim Dalı
Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE
2010
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MENTHA LONGIFOLIA L. HUDSON SSP. *LONGIFOLI*'DAN ELDE EDİLEN BAZI ETKEN MADDELERİN AMES/*SALMONELLA* VE MAYA DELESYON TEST SİSTEMLERİ İLE MUTAJEN VE ANTİMUTAJEN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Furkan ORHAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2010
Her Hakkı Saklıdır

Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Furkan ORHAN tarafından hazırlanan bu çalışma 16 / 08 / 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE	*İmza*	:
Üye	: Doç. Dr. Güleray AĞAR	*İmza*	:
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL	*İmza*	:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MENTHA LONGİFOLIA L. HUDSON SSP. *LONGIFOLIA*'DAN ELDE EDİLEN BAZI ETKEN MADDELERİN AMES/*SALMONELLA* VE MAYA DELESYON TEST SİSTEMLERİ İLE MUTAJEN VE ANTİMUTAJEN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Furkan ORHAN

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada Ames/*Salmonella* test sistemi ve Maya delesyon test sistemi (Yeast DEL assay) kullanılarak Doğu Anadolu Bölgesinde yetişen ve tıbbi öneme sahip *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitki türünden izole edilen Luteolin-7-*O*-glukozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-glukuronit, Apigenin-7-*O*- glukozit, Apigenin-7-*O*-rutinozit ve Rozmarinik asit maddeleri etkenlerin mutajenik ve antimutajenik özellikleri araştırılmıştır.

Mentha longifolia ssp. *longifolia*'nın bazı etken maddelerinin Ames test sisteminde kullanılan *Salmonella typhimurium* TA 1535 ve TA 1537 suşlarında doza bağlı olarak %93'e varan antimutajenik aktivite gözlenirken, *Saccharomyces cerevisiae* RS112 suşunda ise doza bağlı olarak bazı etken maddelerin %75'e varan oranlarda antimutajenik, mutajenik, komutajenik aktivite gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmalarla; bir mutajen/karsinojen maddenin oluşturacağı gen mutasyonunun çeşidi; kromozom içi delesyonu ve kromozomlar arası rekombinasyonu gözlemleme fırsatı bulunmuştur. Benzer şekilde bir antimutajen/antikarsinojen maddenin bir mutajen/karsinojen maddeye vereceği cevap gen, kromozom içi ve kromozomlar arası etkileşimler düzeyinde belirlenebilmiştir.

2010, 132 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ames/*Salmonella* test sistemi, Maya delesyon test sistemi, *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*, mutajenite, antimutajenite

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF MUTAGENIC AND ATIMUTAGENIC PROPERTIES OF SOME AGENTS OBTAINED FROM *MENTHA LONGIFOLIA* L. HUDSON SSP. *LONGIFOLIA* BY USING AMES/*SALMONELLA* AND YEAST DEL ASSAY TEST SYSTEMS

Furkan ORHAN

Ataturk University

Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In the present study by using Ames/*Salmonella* and Yeast DEL assay test systems the mutagenic and antimutagenic properties of Luteolin-7-*O*-glucoside, Apigenin-7-*O*-glucoside, Luteolin-7-*O*-glucoside, Rosmarinic acid, Apigenin-7-*O*-rutinoside, Luteolin-7-*O*-rutinoside, Luteolin-7-*O*-glucuronide agents were investigated. It was obtained from *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* which has medical importance and grows in East Anatolia region of Turkey.

While some of these agents have been shown up to 90% antimutagenic activity on *Salmonella typhimurium* TA 1537 strain in Ames/*Salmonella* test system, in the Yeast DEL assay 75% antimutagenic activity was observed on *Saccharomyces cerevisiae* RS112 strain.
The findings of our investigation showed that a gene mutation, intrachromosomal deletion and interchromosomal recombination due to a mutagenic/carcinogenic agent can be detected by Ames/*Salmonella* and Yeast DEL assay combination.
Similarly it was determined that the reaction of anti-mutagenic/anti-carcinogenic agents against mutagenic/carcinogenic substance on gene mutation, intrachromosomal and interchromosomal recombination interaction level.

2010, 132 pages

Keywords: Ames/*Salmonella* test system, Yeast DEL assay, *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*, mutagenicity, antimutagenicity

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laburatuarında yürütülmüştür.

Bu araştırmanın yürütülmesinde büyük emeği geçen, her aşamasında ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen, danışmanım, Sayın Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye, Sayın Doç. Dr. Güleray AĞAR'a, Sayın. Yrd. Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, ayrıca Biyoloji Bölüm Başkanım Sayın Prof. Dr. Ö. Faruk ALGUR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın farklı aşamalarında bana yardımcı olan Sayın. Yrd. Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a, Sayın Arş. Gör. Derya YANMIŞ'a, Sayın Arş. Gör. Sedat BOZARI'ya, Sayın Biyolog Tuğba BAL'a, Sayın Arş. Gör. Mehmet KARADAYI'ya ve ayrıca Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü elemanlarının tümüne teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü desteklerinden dolayı aileme ve özellikle ablama sonsuz teşekkürler.

Bu araştırma TUBİTAK(proje no:107T203) tarafından desteklenmiştir.

Furkan ORHAN

Temuz 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT. ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER 5
2.1. Tıbbi bitkiler 5
2.2. Çalışılan bitki ve etken maddelerin aktiviteleri 6
2.3. Polifenoller 7
2.3.1. Flavonoidler 8
2.3.2. Fenolik asitler 11
2.4. Mutasyonlar ve Mutajenik ajanlar 12
2.4.1. Mutasyonlar 12
2.4.2. Mutajenik ajanlar 17
2.4.2.a. Kimyasal mutajenler 17
2.4.2.b. Fiziksel mutajenler 19
2.4.3. Deneysel mutasyonlar 20
2.5. Kısa zamanlı Mutajenite- Antimutajenite testleri 21
2.5.1. Maya delesyon test sistemi 21
2.5.1.a. Histidin gereksinimi 25
2.5.1.b. Lösin gereksinimi 27
2.5.1.c. Adenin gereksinimi 27
2.5.2. Ames/*Salmonella* test sistemi 29
2.5.2.a. Hitidin mutasyonu 30
2.5.2.b. *rfa* mutasyonu 32
2.5.2.c. *uvrB* mutasyonu 33
2.5.2.d. R faktörü 33

3. MATERYAL ve YÖNTEM 35
3.1. Materyal 35
3.1.1. Mutajenik ve antimutajenik özellikleri araştırılan etken maddelerin eldesi 35
3.1.1.a. Bitkilerin toplanması ve adlandırılması 35
3.1.1.b. Mutajenik ve antimutajenik özellikleri araştırılan etken maddeler 35
3.1.2. Çalışmada kullanılan mutant organizmalar 36
3.1.2.a. *S. cerevisiae* RS112 suşu 36
3.1.2.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537suşları 36
3.1.3. Pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler 36
3.1.4. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar 37
3.1.5. Stok çözeltiler ve besiortamları 37
3.1.5.a. Maya delesyon testinde kullanılan stok çözeltiler ve besi ortamları 37
3.1.5.b. Ames/*Salmonella* testinde kullanılan stok çözeltiler ve besi ortamları 43
3.2. Yöntem 48
3.2.1. Çalışmada kullanılan mutant organizmaların genetik özelliklerinin kontrolü 48
3.2.1.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS 112 suşunun genetik özelliklerinin kontrolü 48
3.2.1.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının genetik özelliklerinin kontrol 50
3.2.2. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi 52
3.2.2.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi 52
3.2.2.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi 52
3.2.3. Pozitif mutajenlerin ve test mataryellerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi 53

3.2.3.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşu pozitif mutajenlerinin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi 53
3.2.3.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşları pozitif mutajenlerinin ve test mataryellerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi 54
3.2.4. Test suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerinin hazırlanması 55
3.2.4.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun saklanması ve gecelik kültürlerinin hazırlanması 55
3.2.4.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerinin hazırlanması 55
3.2.5. Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılan mikroorganizmaların uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi 56
3.2.5.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi 56
3.2.5.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi 57
3.2.6. Mutajenite ve antimutajenite deneyleri ..... .57
3.2.6.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun mutajente ve antimutajenite deneyleri 57
3.2.5.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının mutajenite ve antimutajenite deneyleri 58
3.2.6. Sonuçların değerlendirilmesi 59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 60
4.1. Mutajenik ve antimutajenik potansiyeli araştırılan etken maddeler 60
4.2. Çalışmada kullanılan mutant organizmaların genetik özelliklerinin kontrolü 62
4.2.1. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun genetik özelliklerinin kontrolü 62
4.2.1.a. Histidin gereksinimi 62
4.2.1.b. Lösin gereksinimi 63
4.2.1.c. Adenin gereksinimi 63
4.2.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının genetik özelliklerinin kontrolü 64
4.2.2.a. Histidin/Biyotin gereksinimi 64

4.2.2.b. *rfa* mutasyonlarının kontrolü 65
4.2.2.c. *uvrB* mutasyonlarının kontrolü..... 66
4.3. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi 66
4.3.1. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi 66
4.3.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi 67
4.4. Pozitif mutajenlerin ve test mataryellerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi 67
4.4.1. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşu pozitif mutajenlerinin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi 67
4.4.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşları pozitif mutajenlerinin ve test mataryellerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi 68
4.5. Mutajenite ve antimutajenite deneyleri 68
4.5.1. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun mutajente ve antimutajenite deneyleri 68
4.5.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının mutajenite ve antimutajenite deneyleri 68
4.6. Mutajenite ve antimutajenite deney sonuçları..... 69
4.6.1. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşu mutajenite ve antimutajenite deney sonuçları 69
4.6.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşları mutajenite ve antimutajenite deney sonuçları 100
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 114
5.1. Öneriler 124
KAYNAKLAR 126
ÖZGEÇMİŞ 132

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2-AAF	2-Acetilaminofluoren
2-AF	2-aminofluoren
2-AP	2-amino pürin
4-NQO	4-Nitroquinolin 1-oxit
5-BU	5-bromourasil
ADE	Adenin
CYP450	Sitokrom P450 enzim ailesi
ddH_2O	Double distile su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EMS	Etil metansulfonat
His	Histidin
HMG-koA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA reduktaz
Leu	Lösin
LTC_4	Sistenil lökotrin
M	Molarite
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MMS	Metil metansulfonat
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
ROS	Reaktif oksijen türleri
Mg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Çok aşamalı karsinojenezi engelleyen veya baskılayan flavonoidlerin etki mekanizması 9
Şekil 2.2. Çerçeve kaymasını gösteren yapı 16
Şekil 2.3. *S. cerevisiae*'nin yaşam döngüsü 21
Şekil 2.4. Histidin protrofisine dönüşü gösteren dört olası mekanizma 26
Şekil 2.5. Histidin protrofisine dönüş 26
Şekil 2.6. Adenin protrofisine dönüşü gösteren yapı 28
Şekil 2.7. Adenin protrofisine dönüşü gösteren mekanizma 28
Şekil 2.8. Adenin bazı gen bölgesinde meydana gelen gen dönüşünü gösteren yapı ... 29
Şekil 2.9. Histidin operonunu gösteren gen yapısı 30
Şekil 2.10. Histidin biyosentezi 31
Şekil 4.1. Luteolin-7-*O*-glikozit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı 60
Şekil 4.2. Apigenin-7-*O*-glikozit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı 60
Şekil 4.3. Rosmarinik asit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı 61
Şekil 4.4. Apigenin-7-*O*-rutinozit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı 61
Şekil 4.5. Luteolin-7-*O*-rutinozit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı 61
Şekil 4.6. Luteolin-7-*O*-glukoronit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı 62
Şekil 4.7. *S. cerevisiae* RS112 suşunda histidin gereksinimin gösterilmesi 62
Şekil 4.8. *S. cerevisiae* RS112 suşunda lösin gereksinimin gösterilmesi 63
Şekil 4.9. *S. cerevisiae* RS112 suşunda adenin gereksinimin gösterilmesi 64
Şekil 4.10. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarında histidin gereksinimini gösterilmesi 65
Şekil 4.11. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarında rfa gereksinimini gösterilmesi 65
Şekil 4.12. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının ultraviyole duyarlılık testi 66
Şekil 4.13. Luteolin-7-*O*-glukozit'in *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları 91
Şekil 4.14. Luteolin-7-*O*-glukozit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 91

Şekil 4.15. Luteolin-7-*O*-glukozit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 92
Şekil 4.16. Apigenin-7-*O* glukozit'in *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları 92
Şekil 4.17. Apigenin-7-*O*-glukozit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 93
Şekil 4.18. Apigenin-7-*O*-glukozit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 93
Şekil 4.19. Rosmarinik asit'in *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları 94
Şekil 4.20. Rosmarinik asit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 94
Şekil 4.21. Rosmarinik asit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 95
Şekil 4.22. Apigenin-7-*O*-rutinozit'in *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları 95
Şekil 4.23. Apigenin-7-*O*-rutinozit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 96
Şekil 4.24. Apigenin-7-*O*-rutinozit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 96
Şekil 4.25. Luteolin-7-*O*-rutinozit'in *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları 97
Şekil 4.26. Luteolin-7-*O*-rutinozit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 97
Şekil 4.27. Luteolin-7-*O*-rutinozit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 98
Şekil 4.28. Luteolin-7-*O*-glukoronit'in *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları 98
Şekil 4.29. Luteolin-7-*O*-glukoronit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 99
Şekil 4.30. Luteolin-7-*O*-glukoronit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları 99

Şekil 4.31. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile mM konsantrasyonunda yapılan mutajenite testi sonuçları..... 110
Şekil 4.32. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile mM konsantrasyonunda yapılan mutajenite testi sonuçları..... 110
Şekil 4.33. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile µM konsantrasyonunda yapılan mutajenite testi sonuçları..... 111
Şekil 4.34. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile µM konsantrasyonunda yapılan mutajenite testi sonuçları..... 111
Şekil 4.35. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile mM konsantrasyonunda yapılan antimutajenite testi sonuçları..... 112
Şekil 4.36. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile mM konsantrasyonunda yapılan antimutajenite testi sonuçları..... 112
Şekil 4.37. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile µM konsantrasyonunda yapılan antimutajenite testi sonuçları..... 113
Şekil 4.38. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile µM konsantrasyonunda yapılan antimutajenite testi sonuçları..... 113

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. *S. cerevisiae* kendiliğinden geri dönene koloni sayıları..... 67
Çizelge 4.2. *S. typhimurium* suşların kendiliğinden geri dönen koloni sayıları..... 67
Çizelge 4.3. Luteolin-7-*O*-glukozit'in *S. cerevisiae* RS112 maya suşuyla yapılan mutajenite test sonuçları..... 73
Çizelge 4.4. Luteolin-7-*O*-glukozit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları..... 74
Çizelge 4.5. Luteolin-7-*O*-glukozit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları..... 75
Çizelge 4.6. Apigenin-7-*O*-glukozit'in *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları..... 76
Çizelge 4.7. Apigenin-7-*O*-glukozit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları..... 77
Çizelge 4.8. Apigenin-7-*O*-glukozit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları..... 78
Çizelge 4.9. Rosmarinik asit'in *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları..... 79
Çizelge 4.10. Rosmarinik asit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları..... 80
Çizelge 4.11. Rosmarinik asit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları..... 81
Çizelge 4.12. Apigenin-7-*O*-rutinozit'in *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları..... 82
Çizelge 4.13. Apigenin-7-*O*-rutinozit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları..... 83
Çizelge 4.14. Apigenin-7-*O*-rutinozit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları..... 84
Çizelge 4.15. Luteolin -7-*O*-rutinozit'in *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları..... 85
Çizelge 4.16. Luteolin -7-*O*-rutinozit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları..... 86

Çizelge 4.17. Luteolin-7-*O*-rutinozit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları. 87
Çizelge 4.18. Luteolin -7-*O*-glukuronit'in *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları. 88
Çizelge 4.19. Luteolin -7-*O*- glukuronit'in EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları. 89
Çizelge 4.20. Luteolin-7-*O*- glukuronit'in akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları. 90
Çizelge 4.21. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan mutajenite test sonuçları 102
Çizelge 4.22. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan mutajenite test sonuçları. 103
Çizelge 4.23. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan mutajenite test sonuçları 104
Çizelge 4.24. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan mutajenite test sonuçları 105
Çizelge 4.25. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium*TA1535 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan antimutajenite test sonuçları 106
Çizelge 4.26. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan antimutajenite test sonuçları 107
Çizelge 4.27. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan antimutajenite test sonuçları 108
Çizelge 4.28. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium*TA1537 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan antimutajenite test sonuçları 109

1.GİRİŞ

Bitkilerin, hastalıkların tedavisinde kullanılmaları insanlık tarihi kadar eskidir. Dünya nüfusunun doğal yaşamı günümüzde de bitkisel ilaç kullanımına bağlıdır (Ramawat *et al.* 2009). Antibiyotiklerin ve kimyasal içerikli gıdaların kullanımından kaynaklanan sağlık problemlerinin ortaya çıkmasıyla birlikte bitkilerin, gıda katkı maddesi olarak kullanımı için araştırmalar yapılmaya başlanmıştır (Wallace 2004). Yapılan araştırmalar sonucunda, bitki kaynaklı ürünlerin sağlık açısından birçok faydası olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle son zamanlarda tüketicilerin, bitki ve bitki bileşiklerine olan ilgilerinin artmasıyla dünya genelinde bitki kaynaklı ürünlerin tüketimi hızla artmıştır. Artan ilgi ile birlikte bitkilerin hangi özelliklerinden dolayı koruyucu veya tedavi edici oldukları sorusunu gündeme getirmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bitkilerin ilaç olarak kullanılmasının yararlarının, bitkide bulunan sekonder metabolitlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bitkilerin ürettiği sayısız sekonder metabolitler rastlantı sonucu oluşmamıştır. Stres ortamında seviyeleri oldukça artan bu bitki sekonder metabolitleri; herbivorlara, patolojik saldırılara karşı ve bitkiler arası rekabette savunma amaçlı; bitkiye yararlı organizmalarda (tozlaştırıcı ve simbiyotikler) ise cezbedici olarak kullanmaktadırlar. Bitkilerdeki sekonder metabolitlerin; ışığa, UV ışınlarına maruz kalma, su durumu, sıcaklık gibi abiyotik streslere karşı koruyucu aktivitelerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise bitki sekonder metabolitlerinin; bitki büyüme regülasyonunda, gen ekspresyonunun düzenleme ve sinyal transdüksiyonunda da rollerinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, çiçek ve tohum hücre pigmentlerin oluşumundaki etkisinden dolayı bu metabolitlerin bitkinin çoğalmasıyla da ilgili oldukları ifade edilmiştir (Briskin 2000; Rispail *et al.* 2005). Tüm bitkilerde bulunan ve bitki hücrelerinin yapımına katılıp metabolik süreçleri devam ettiren primer (lipid, karbonhidrat, protein, klorofil, nükleik asit vb) metabolitlerin aksine sekonder metabolitlerin içerikleri ve bulunduğu bitkiler genelde taksonomik olarak birbirinden farklıdırlar. Bu farklılık bitkilerin biyotik ve abiyotik strese karşı ekolojik rolüyle bağlantılıdır. Bu nedenle bilim adamları yıllardır sistematik olarak yeni tür bulduklarında aynı zamanda yeni sekonder metabolit kaynakları keşfetmiş olurlar.

Bitki sekonder metabolitlerinin ekolojik ve endüstriyel amaçlı kullanımının sayısız örnekleri mevcuttur. Özellikle bu metabolitlerin hayvanların ve insanların beslenmesinde ve tedavilerinde ilaç olarak kullanılmaları çok yaygındır (Acamovic and Brooker 2005). Farmakolojik olarak önemli bitki sekonder metabolitlerinden bazıları; alkaloidler, askorbik asit, tokoferoller, isoflavonlar, terpenoidler, glikozitler, flavonoidler, uçucu yağlar, askorbik asit, taninler, polifenolik bileşiklerdir (Briskin 2000).

Yapılan birçok çalışmada bitkisel sekonder metabolitlerin antiameboik, antioksidan, antihemoroid, antidiabetik, antihipertansif, antipiretik, antihepatotoksik, anti-inflamatuar, analjezik, antitümör ve antikanser biyoaktivitelerinin olduğu ifade edilmiştir (Kim *et al*.2000; Cimanga *et al.* 2006; Rahimuddin *et al.* 2007; Backhouse *et al*. 2008; Srivastava and Gupta 2007).

Günlük besinlerimizden olan sebze, meyve, bakliyat, zeytin, çay ve kahve gibi meşrubatlarda bol miktarda bulunan sekonder metabolitler (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 2008; Archivio *et al.* 2007). Bu besinlerin, mutajen veya karsinojen maddelerle etkileşerek bunları etkisiz hale getirmede, mutajen veya karsinojen maddelerin hücreye girişini azaltmada ve serbest oksijen radikallerine karşı hücreyi korumada etkili oldukları belirtilmiştir (Ferguson *et al.* 2004).

Sekonder metabolitlerin önemli bir grubunu oluşturan flavonidler bitkiler aleminde en yaygın bulunan metabolitlerdir (Jhoo *et al.* 2007). Flavonoidlerin birçok biyolojik aktiviteyi düzenlediği belirlenmiştir. Flavonoidler, mitokondrial suksinooksidazı engelleyerek ve biyotransformasyon enzimlerini düzenleyerek antitümör ajan olarak davranırlar. Lipit sistemlerinde antioksidant olarak görev alırlar, dolayısıyla düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu engelleme, ROS'un giderilmesi, demir şelatlama özelliklerine sahiptirler. Prekarsinojenlerin biyotransformasyonunda gerekli olan enzimleri inhibe eder (Özbek 2006).

Yapılan bir çalışmada çay bitkisindeki sekonder bileşiklerden kateşin (catechin ,epicatechin) ve bioflavonoidlerin (quercetin, fisetin ve mirisetin) doza bağlı olarak DNA metilasyonunu önlediği ve metil transferaz enzimini engellendiği gösterilmiştir (Lee *et al*. 2008).

Flavonoid grubu bileşiklerden biri olan Apigenin maddesinin akciğer kanserindeki anjiyogenezi ihhibe ettiği gösterilmiştir (Liu *et al*. 2005). Apigenin flavonoidinin farelerde yapılan bir çalışmasıyla bu bileşiğin aortta kalsiyum akışını engelleyerek damar genişletme aktivitesi gösterilmiştir (Ko *et al*. 1991). Kansere yol açan serbest radikalleri ve serbest radikal reaksiyonunu antioksidan özelliğiyle bertaraf eden devedikeni bitkisinden elde edilen flavonoidlerin Ames/*Salmonella* testiyle yapılan çalışmalarda bu bitkideki flavonoidlerin 2-amino fluoren (2-AF) ve 4-nitroquinolin 1-oksit (4-NQO) mutajenlerine karşı güçlü antimutajenik etki gösterdikleri belirtilmiştir (Kaleeswaran *et al.* 2009).

Sumak bitkisinin metanol ve etil asetat ekstraksiyonlarının Ames/*Salmonella* testiyle yapılan çalışmada flavonoid içerikli etkstarktların alfatoksinB_1 mutajen maddesinin aktivitesini engellediği gösterilmiştir (Park *et al.* 2003). Çoğunlıkla flavonoid grubu (apigenin ve luteolin) bileşikler içeren yabani enginar bitkisinin ekstrakları ile yapılan çalışmalarda bu bitki ekstraklarının *Saccharomyces cerevisiae* D7 suşunda 4-Nitroquinoline 1-oxit (4-NQO) mutajeninne karşı güçlü bir antimutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiş, tek başına mutajen olmayan bu ekstraktın *Salmonella typhimurium* TA98 suşunda 2-acetilaminofluoren (2-AAF) mutajen madesinin etkisini artırdığı ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikalleri süpürücü testiyle de güçlü antioksidan etki gösterdiği belirtilmiştir (Miadokova *et al*. 2008).

Kasımpatı bitkisinin çoğunlukla apigenin, quersin, asesetin ve luteolin içeren ekstraklarının Ames testinde kullanılan *S. typhimurium* TA1535 ve *S. typhimurium* TA100 suşlarındaki 2-AF, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ve 4-NQO mutajen maddeleri tarafından oluşturulan mutajenik etkiyi önemli derecede düşürdüğü,

bu mutajenler tafafından indüklenen SOS tamir mekanizmasını baskıladığı belirtilmiştir (Miyazawa and Hisama 2003).

Vattem ve arkadaşları (2005), kızılçık bitkisinin meyve suyu ekstresinin içeriği olan fenolik bileşiklerin (rosmarinik asit ve ellagik asit) AMES *Salmonella typhimuriumun* TA 100 suşunu kullanarak sodyum azid (NaN_3) ve MNNG mutajenlerine karşı antimutajenik aktivite gösterdikleri ve oksidatif hasara karşı DNA'ı korudukları belirtilmiştir.

Bu çalışmada *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarıyla *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilmiş aktif bileşiklerin mutajenik ve antimutajenik etkileri değerlendirilmistir. Karsinojen maddelerin tespitinde kullanılan, hassasiyeti ve güvenirliği mevcut diğer kısa süreli mutajenite test sistemlerinden daha iyi olduğu belirlenen *S. cerevisiae* RS112 ile yapılan maya delesyon test sisteminin antimutajen maddelerin tespitinde aynı hasasiyeti ve güvenirliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında maya delesyon test sistemiyle yapılacak antimutajenik maddelerin değerlendirilmesi orijinal bir çalışma konusu olarak görülebilir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Tıbbi Bitkiler

Binlerce yıldır tüketilmekte olan tıbbi bitkilerin kullanımına ait ilk kayıtlardan biri M.Ö. 2600 yıllarında Mezopotamya'da çömlekler üzerine yazılan çivi yazılarıdır. Bu çivi yazılarındaki bitkilerin tamamı günümüzde soğuk algınlığı, öksürük, parazitik enfeksiyonlar ve iltihabi rahatsızlıklara kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Tıbbi bitki kullanımına ilişkin ilk kayıtlardan bir diğeri M.Ö yaklaşık 2600 yıllarında Mısır'da ortaya çıkarılmıştır. Bunun yanı sıra Mısır'ın bilinen en iyi farmasotik madde kaydı M.Ö 1500'lü yıllarda yazıldığı sanılan ve çoğunluğunu bitkilerin oluşturduğu 700 civarında reçete içeren Ebers papirüsüdür (Baytop 1984).

Antik Batı Dünyası'nda tıbbi bitki kullanımını ilk gerçekleştiren Yunanlılardır. Bitkisel ilaç kullanımının gelişmesine önemli katkılar sağlayan Yunanlı filozof ve doğa bilimcisi THEOPHRAST M.Ö yaklaşık 300 yıllarında '' History of Plants''adlı kitapta bitkilerin tıbbi özelliklerini ele almış ve bu özelliklerin yetiştirme esnasında karakteristik özelliklerinin değişme kabiliyetlerini kaydetmiştir (Cragg and Newman 2005).

M.S 20-79 yılları arasında özellikle tıbbi bitkiler ile ilgili eserler yazan Dioscorides'in; bitkisel tedavi yöntemleriyle ilgili yazılan birçok eserde uzun bir süre temel kaynak olarak gösterilmiştir. Bunun yanı sıra İslam dünyasının tabii ilimler bilgini olan Ebu Reyhan Biruni ''Kitab al-Saydala fi al Tıb'' adlı kitabında eczacılık, draglar ve dragların muhtelif dillerdeki isimleri hakkında bilgiler vermiştir. Yine İslam dünyasının büyük filozofu ve hekimi olan İbni Sina'nın ''Kanun fit Tıb'' adlı kitabında 785 kadar bitkisel, hayvansal ve madensel dragın tarifi ve tıbbi kullanımları verilmiştir. 12.yüzyılda Latince'ye çevrilmiş, 15. ve 16. yüzyıllarda ise 36 kez basılmış, 17. yüzyıl ortalarına kadar tıp okullarında ders kitabı olarak okutulmuştur (Baytop 1984).

Tıbbi bitkilerin toplanması ve kültüre alınmasının tarihi tam olarak bilinmemekle birlikte büyük olasılıkla sağlık problemlerinin ortaya çıkmasıyla başlamıştır. Bitkilerin

farklı yapılarının çiğnenmesi, koklanması veya yenilmesiyle; mide bulantısını giderdiği, ağrı dindirdiği ve diğer hastalıklarda iyileştirici etki yaptığı fark edilmiştir. Bu bitkiler, günümüzde tıbbi ve aromatik bitkiler olarak bilinip özütleri; ilaç, baharat ve renklendirici başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır (Craker 2007).

2.2. Çalışılan bitki ve etken maddelerin biyolojik aktiviteleri

Mentha longifolia. L. ssp. *longifolia* (Nane)

Genellikle salgı tüylü ve kokulu, otsu veya çalımsı bitkileri içeren Lamiaceae familyası; sınırları son zamanlarda tekrar tanımlanmış, bünyesinde 200 cins ve 3500 tür bulunduran bir familyadır. Türkiye'de de doğal olarak yetişen ve 43 cins ihtiva eden, terpenoit bileşikler yönünden zengin ayrıca flavonoitler, uçucu yağlar, az da olsa kinoit yapıda maddeler içeren önemli bir familyadır. *Mentha* cinsi bu familyanın önemli üyelerinden biridir (Lawrence 2007).

Mentha'nın yayılışı ve tür sayısı hakkında farklı bilgiler mevcuttur. Bu türe ait 90 civarında türün olduğunu bildirilmiştir. *Mentha* cinsi Türkiye florasında 7 tür ve 12 taksonun bulunduğu bildirilmiştir (Kaya 2009).

Nane Dünya nüfusunun %80'den fazlasının temel sağlığı için kullanılabilecek olan tıbbi ve aromatik bitkilerin en erişilebilir, satın alınabilir ve kültürünün kolaylıkla yapılabileceği bir bitkidir. Bitki sekonder metabolitleri; hem yeni sentetik reaksiyonların metodolojileri için hem de analitik kimya gelişmelerinin sürdürülmesi için gerekli kimyasal incelemelerin yapılması açısından yıllardır verimli bir kaynak oluşturmuşlardır. Bu bitkilerin çoğu nemli ve rutubetli çevrelerde yetişip; 10-120 cm kadar boylanabilir ve sınırsız bir alana yayılabilirler. Farklı doğa şartlarına uyum sağlayabilen ve hatta tam güneşli ortamlarda bile gelişebilen bu cinsin kontrolsüz yayılım eğilimi, istilacı olarak değerlendirilmesine neden olmuştur. Nanelerin her ortama uyum sağlayabilen özelliklerinden dolayı çok az bir ilgiyle istenen nane türü çok

kolay bir biçimde yetiştirilebilir. Nane türleriyle yapılan birçok çalışma bu bitkilerin farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin faydalı böcekleri cezbedici özelliklerinin bulunduğu; beyazsinekler ve yaprak bitleri gibi zararlı böcekleri uzaklaştırıcı özellikleri olduğu bildirilmiştir (Abbaszadeh *et al*. 2009).

Nanenin özellikle sindirim sistemi hastalıklarında etkili olduğu bilinmektedir. Halk arasında ishal ve dizanteri gibi hastalıklarda, bağırsak kurdu ya da solucanlarını düşürmede kullanılmaktadır (Kaya 2009). Nane yağının; mide krampını, gazı, sancıyı, bulantıyı giderici, tembelleşmiş safrayı, karaciğeri uyarıcı ve bronşları yumuşatıcı sekretolitik, sedatif ve antidepresan etkisi vardır (Kaya 2009). *Mentha* türleri diğer uçucu yağ içeren bitkiler gibi kuvvetli aromatiktir. Nane esansı (*Oleum menthae*) antiseptik, karminatif ve serinletici etki gösterir. Bu nedenle, hem ilaç sanayinde (gaz, safra kesesi iltihabı, derideki kaşıntıları giderici ve taş düşürücü, ilaçların yapımında) hem de çeşitli endüstri kollarında (gıda, kozmetik ve diş macunlarının vb. yapımında) geniş çapta kullanılır. Ayrıca nanenin antiviral, antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri ortaya konulmuştur (Kaya 2009). Nane yapraklarında bulunan mono terpenlerin komposizyonları diğer bitki sekonder metabolitleri gibi bitkinin hayat periyodu boyunca değişiklik göstermektedir. Doğal ortamda yetişen bitkilerin genç yapraklarında yüksek oranda menthon, biraz daha yaşlı orta yapraklarında menthol, en olgun orta yapraklarında ise metil asetat bakımından zengin yağların bulunduğu belirlenmiştir (Moreno *et al*. 2002; Güllüce *et al.* 2007; Kaya 2009). *Mentha* cinsi içerisinde önemli türlerden biri olan *M. longifolia* uçucu yağ içeriğiyle beraber özellikle flavonoidler olmak üzere polifenolik bileşikler ve fenolik asitlerce de zengin bir bitkidir (Dukic *et al*. 1996; Kanatt *et al.* 2005).

2.3. Polifenoller

Polifenoller bitki orijinli gıdaların yaygın bileşenleri olup çok geniş molekül çeşitliliğine sahip bir gruptur. Polifenoller aromatik halkalar üzerinde birkaç hidroksil grup taşıyan polifenil bir yapıya sahip olabileceği gibi fenolik asit ve fenolik alkoldeki gibi moleküle bağlı sadece bir fenil halkasından da oluşabilirler. Kimyasal yapıları

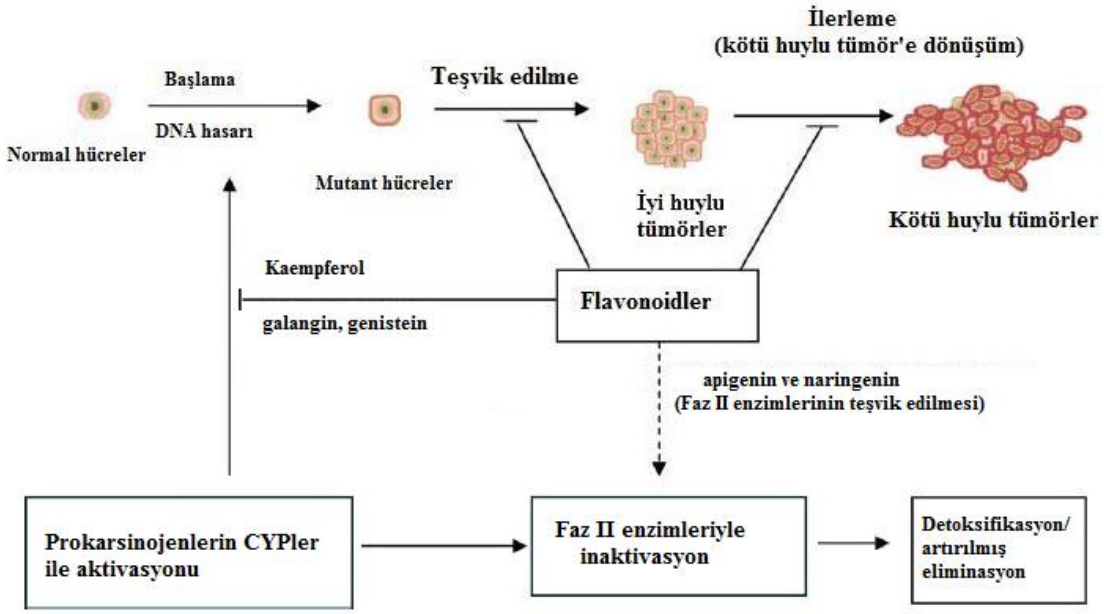
nedeniyle polifenoller tıbbi açıdan oldukça önemli etkilere sahiptirler. Polifenollerin özellikle antikarsinojen aktiviteleri dikkat çekicidir. Polifenoller kanserojenik kimyasal maddelerin yan etkilerini; karsinojenleri detoksifiye ederek, karsinojenlerin alınımını inhibe ederek, aktivasyonlarını ve yapılarını bozarak, DNA'ya bağlanmasını önleyerek ve DNA tamir mekanizmasının doğruluğunun artırarak önlerler. Ayrıca araşidonik asit metabolizmasını inhibe ederek ve oksijen radikalleriyle reaktif elekrofilleri gidererek aktivite gösterirler. Fenolik bileşiklerin sahip olduğu antioksidan aktivite esas olarak metal şelatlama, singlet oksijen giderme, hidrojen verici ve indirgeyici ajan olarak davranmalarını sağlayan redoks özelliklerinden kaynaklanır. Ayrıca fenollerin ROS (radikal oksijen süpürücü) özelliği, fenolik molekülün aromatik halkası üzerindeki hidrojen verici hidroksil grupların pozisyonuna ve sayısına, fenolik hidrojenlerin mevcudiyetine ve hidrojen vererek oluşan fenoksi radikallerinin kararlı hale geçebilmesine bağlıdır (Özbek 2006; Nicenametlia and Taruscio 2006; Nichols and Katiyar 2010).

Polifenoller içerdikleri fenil halkalarına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elementlere göre beş gruba ayrılırlar. Polifenollerin bu grupları; Flavonoidler, Fenolik asitler, Fenolik alkoller, Stilbenler ve Lignanlar şeklinde sıralanabilir (Archivio *et al.* 2007).

2.3.1. Flavonoidler

Flavonoidler sebze ve meyvelerde bol bulunan bitki sekonder metabolitlerinin bir sınıfıdır ve günümüze kadar 4000'den fazla flavonoid üyesi izole edilmiştir. Flavonoidlerin genel yapıları C6-C3-C6 şeklindedir ve aşağıda belirtildiği gibi A, B ve C harfleriyle gösterilmektedir. Flavonoidlerin C6-C3-C6 yapısı; difenil diye adlandırılan iki benzen halkasının (A halkası ve B halkası) bir propan halkasıyla (C halkası) birleşmesinden oluşmuştur. Flavonoidlerde C6-C3-C6 yapısının ortasında bulunan propan halkasının oksidasyon durumuna göre beş alt gruba ayrılmıştır. Bunlar; Flavonol, Flavon, Flavonon, İzoflavon ve Antosiyaninlerdir (Archivio *et al*. 2007). Bazı fenolik bileşiklerin yanı sıra flavonoidler de karsinojenleri metabolik olarak aktive

veya deaktive eden sitokrom p450 enzim sistemini (CYP450) düzenlerler. Sitokrom p450 enzimleri (fazI monooksijenaz enzimleri), ilaçların ve diğer yabancı bileşiklerin metabolizmalarındaki rolleri nedeniyle çok iyi araştırılmışlardır. Bu enzim sisteminin düzenlenmesi farmakolojik ve toksikolojik etkiler üreten ksenobiyotiklerin metabolizmasını etkileyebilir. Doğada bulunan birçok flavonoidin, CYP450 sistemini, CYP450 izoenzimlerini indükleyerek ve bu enzimleri aktive veya inhibe ederek CYP450 sistemini düzenlediği tespit edilmiştir. Son zamanlarda flavonoidlerin CYP450 sistemi üzerine olan düzenleyici etkisi hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. DNA'ya kovalent olarak bağlanarak karsinojen etki gösteren biyolojik olarak inaktif metabolitler ve kimyasal reaktif elekrofilik metabolitler CYP450 enzimleri ile metabolize edilirler (Şekil 2.1) (Lee *et al.* 2003). CYP450 enzimleri farklı metabolitik yolları indükleyerek kimyasal maddelerin karsinojenik özelliklerini CYP450 enzimleriyle baskılar. Yapılan *in vivo* çalışmalarda CYP450 enzim aktivitelerinin artışına bağlı olarak kimyasal kanserojenlerin kanser oluşturma etkisinde bir azalma olduğu ifade edilmiştir (Moon *et al*. 2006).



Şekil 2.1. Çok aşamalı karsinojenezizi engeleyen veya baskılayan flavonoidlerin etki mekanizması (Moon *et al.* 2006).

Çalışılan etken maddeler

Luteolin 7-*O*-glukozitin antiameboik, antioksidan, antiviral, antitümör, antiinflamatuar ve analjik aktivitelerinin olduğu, fare ciğerlerindeki prostaglandi üretimini inhibe ettiği ve kemik kaynaklı mast hücrelerinin LTC_4 üretimini engellediği, UVA radyasyonun oluşturduğu zararlı etkilerine karşı genellikle koruyucu olduğu, maltoz şekerini iki glikoz molekülüne çeviren maltaz enzimini ve alfa amilaz enzimlerini inhibe ettiği, kolesterol sentezinde anahtar bir enzim olan HMG-koA enzimini engellediği ve ayrıca DNA'ya bağlandığı tespit edilmiştir (Kim *et al*. 2000; Fritsche *et al.* 2002; Cimanga *et al.* 2006; Backhouse *et al*. 2008; Rahimuddin *et al.* 2007; Zhou *et al*. 2008; Jın *et al.* 2009).

Luteolin 7-*O*-rutinositin *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* ve *Candida albicans,* gibi bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, fakat *Pseudomonas aeruginosa'*ya karşı etkisiz kaldığı literatürde mevcuttur. Toz halindeki DPPH boyalı serbest radikaline karşı koruyucu olduğu, antioksidant aktivitesinin de L- askorbik asitle karşılaştırılabilir olduğu belirtilmiştir. Luteolin 7-*O*-rutinositin antialerjik bir etki gösterdiği ayrıca histamin salınımını engellediği gösterilmiştir (Kim *et al.* 2000; Inoue *et al.* 2001; Tomić *et al*. 2008; Fecka and Turek 2007).

Apigenin bir karsinojen olan pirenle mutasyona uğratılmış Çin hamster ovaryum hücrelerinde antimutajen özellik gösterdiği, detoksifikasyon faz II enzimini stimüle ettiği, UV sonucu oluşmuş kanser yatkınlığını azalttığı, Na^{+}/Ca^{++} pompasını düzenlediği belirtilmiştir (Patel *et al.* 2006) .

Glukozitlenmiş Apigenin olan Apigenin-7-*O*-glukozit'in kuvvetli bir antioksidan aktivitesinin olduğu (Jeong *et al.* 2010) ve kanserli hücre büyümesini engellediği belirtilmiştir (Srivastava and Gupta 2007).

Bu çalışmamızda Apigenin-7-*O*-rutinozit ve Luteolin-7-O-glukoronit olarak isimlendirilmiş iki sekonder metabolitlerle ilgili olarak literatürde herhangi bir çalışmaya raslanılmamıştır.

2.3.2. Fenolik asitler

Fenolik asit terimi genelde bir karboksil asit fonksiyonuna sahip fenolleri tanımlar. Bununla birlikte bitki metabolitleri olarak tanımlandıklarında ayrı ve belirgin organik asit grupları olarak tanımlanırlar. Doğada kendiliğinden oluşan fenolik asitler iki ayırt edici karbon iskeletine sahiptirler, bunlar hidrosinamik asit (Xa), hidrobenzoik asit (Xb) ve aldehit analoğu (Xc) yapılarıdır. Temel yapı aynı aromatik halka üzerindeki hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu değiştiği için çeşitlilik yaratır. Kafeik, P-kumarik, vanilik, ferulik ve protokateşik asitler gibi hidrosinammik asitler ve hidrobenzoik asit türevleri hemen hemen bütün bitkilerde bulunurlar. Fenolik asitler, gıdaların renkleri, duyusal kaliteleri, beslenme ve antioksidan özellikleriyle ilişkilidirler (Robbins 2003). Fenolik asitler bitkilerde farklı konsantrasyonlarda bulunurlar. Her bitki farklı fenolik asitleri ve türevlerini diğer gruplarla kombinasyon halinde bulundur. Fenolik asitlerin genel yapısı (C6-C1) şeklindedir.

Fenolik asitler gallik asit, vanilik asit, sirincik asit protokateşik asit gibi benzoik asitleri ve benzer şekilde kafeik asit, P-kumarik, ferulik asit, sinapik asit gibi hidrosinnamik asitleri (C6-C3) ve rosmarinik asit, litospermik asit gibi hidrosinamik asit türevlerini içerir (Brandsteterova and Caniova 2005).

Rosmarinik asit, Lamiacae bitki familyasında bulunan doğal bir fenolik asittir (Baba *et al*. 2005). Rosmarinik asitin; anti-hidrojen peroksit aktiviteye sahip olduğu (Sroka *et al.* 2005), serbest radikalleri uzaklaştırdığı ve lipid oksidasyonunu engellediği (Alamed *et al.* 2009; Gu *et al*. 2008; Slusarczyk *et al.* 2009), cilde zararlı ışıkların etkisini azalttığı (Campillo *et al*. 2009), Alzheimer hastalığıyla ilgili nörolojik özellikler taşıdığı (Dastmalchi *et al.* 2009), bir alerjik deri hastalığı olan atopik dermatite karşı

kullanılabileceği (Lee *et al.* 2008), etkili bir antiviral ajan olduğu (Saxena and Dhole 2008; Swarup *et al.* 2007), antioksidan aktiviteye sahip olduğu (Chizzola *et al.* 2008; Erkan *et al.* 2008; Hossain *et al*. 2008), oksidatif stres şartlarında dopamin üreten hücrelerin apoptozis sürecini düzenleyerek bu hücrelerin ölümünü engellediği belirtilmiş ve nörolojik hastalıkların tedavisinde değerlendirilmesi gerektiği tavsiye edilmiştir (Lee *et al.* 2008). Reaktif oksijen uzaklaştırma etkisinden çok hücre içi DNA tamir mekanizmasından sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Silva *et al.* 2008; Romano *et al*. 2008). Ayrıca damar genişletici aktivite gösterdiği (Ersoy vd 2008), Gram pozitif, Gram negatif ve mayalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Moreno *et al.* 2006; Askun *et al.* 2009). Gonado tropinlerin salınımını engellediği, ksantin ve hipoksantinin ürik asite metabolize edildiği pürin katabolizmasının anahtar enzimi olan ksantin oksidaz enzimini ve adenilat siklaz enzimlerini inhibe ettiği ayrıca lipid peroksidasyonu ve trombosit toplanmasını önlediği belirtilmiştir (Fecka and Turek 2007). Bununla birlikte rosmarinik asitle yapılan başka bir çalışmada; rosmarinik asitin değişik konsantrasyonlarının kromozomlar üzerine mutajenik etkiye sahip olup olmadığı mikronükleus testiyle denenmiş olup rosmarinik asite ait bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır. Hatta bir kimyasal ajan olan doxorubicin ile beraber rosmarinik asitin kullanılmasıyla doxorubicinin tek başına kullanımından daha az mikronukleus olduğu tespit edilmiş ve bu sonuç rosmarinik asitin antioksidan aktivitesine dayandırılmıştır (Furtado *et al.* 2008).

2.4. Mutasyonlar ve Mutajenik Ajanlar

2.4.1. Mutasyonlar

Canlıların genetik materyallerinde meydana gelen programlanmamış değişimlere mutasyon adı verilir. Mutasyonlar; incelemede kolaylık sağlanması amacıyla yapısal ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak (a) kromozom ve (b) gen mutasyonları şeklinde iki temel gruba ayrılırlar.

Gen mutasyonlarına oranla daha geniş ölçekli genetik materyal hasarlarını ortaya çıkaran (a) kromozom mutasyonları; (I) kromozom sayısı ve (II) kromozom yapısı mutasyonları olmak üzere iki alt grupta sınıflandırılmaktadır (Kadıoğlu 2005).

Kromozom sayısı mutasyonları; mutasyonun meydana geldiği organizmada, kromozom sayısının takımlar halinde değiştiği **öploidi** ya da kromozom takımındaki bir veya birkaç kromozomun sayısında değişmelerin olduğu **anöploidi** tipi mutasyonlardan oluşur. Buna karşın; meydana gelen mutasyonun ardından organizmadaki kromozom sayılarının sabit kaldığı, fakat kromozom yapılarında değişimlerin olduğu kromozom yapısı mutasyonları; **delesyonlar**, **duplikasyonlar**, **inversiyonlar** ve **translokasyonlardan** oluşmaktadır.

Delesyonlar, kromozomların yapılarında meydana gelen kırılmalar sonucunda belirli bölgelerinden parça kaybetmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu mutasyonların ardından genomun yapısında meydana gelen gen kaybı, organizmalarda çeşitli değişikliklere neden olabilir (Dilsiz 2004).
Kromozom yapısı mutasyonlarının ikinci grubunu oluşturan **duplikasyonlar**, bir kromozomun belirli bir bölgesinin aynı kromozom üzerinde birden fazla tekrarı olması şeklinde tanımlanır. Bu mutasyonlar sonucunda; bir fragmenti birden fazla kopyalar halinde taşıyan gen sıraları meydana gelir ve gen ifadesi değişir.

Kromozom yapısı mutasyonlarından bir diğeri, kromozomun iki yerinden kırılması ve kırılan fragmentin 180º dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması şeklinde tanımlanan **inversiyon** mutasyonlarıdır (Konuk 2004).

Translokasyon ise bir kromozomun bir parçası ile homolog olmayan bir başka kromozomunun bir parçasının yer değiştirmesi şeklinde tanımlanır.

(b) Gen mutasyonu: Bir genin nükleotid sekansındaki herhangi bir değişim olup bir lokusunda normal baz yerine, yeni bir baz çiftinin yanlışlıkla girmesi sonucu meydana

gelen bir olgudur. İncelemede kolaylık sağlanması amacıyla gen mutasyonlarını **ileri, geri** ve **baskılayıcı** mutasyonlar şeklinde üç temel gruba ayrılır;

İleri mutasyon; Bir genin birçok allellik formunun mutasyon sonucu meydana gelmesi nedeniyle, esas gen yani yabanıl tip allel, standart (referans) alleli temsil eder. Referans olarak esas genin yani yabanıl tip allelin kullanıldığı bir durumda; bu standarttan herhangi bir şekilde uzaklaşan herhangi bir değişim (örneğin, thr^+'nın thr^-'ye dönüşümü) ileri mutasyon olarak tanımlanır (Önder 2009).

a) DNA seviyesinde mutasyonlar

i) Karşılıklı geçiş (transisyon): Bir pürin çiftinin diğer bir pürin çiftiyle veya primidin çiftinin diğer bir primidin çiftiyle yer değiştirmesi şeklinde tanımlanır. Örneğin; AT→GC, GC→ AT veya CG→TA, TA→CG

ii) Çaprazlama geçiş (transversiyon): Bir pürin-primidin çiftinin, primidin-pürin baz çiftiyle yer değiştirmesi şeklinde tanımlanır. Örneğin; AT→CG; AT→TA; GC→CG; GC→CG; TA→GC; TA→AT; CG→AT; CG→GC

b) Protein seviyesinde mutasyon;

i) Sessiz mutasyon: Aynı aminoasidin farklı kodonlarla şifrelenmesi şeklinde tanımlanır. Örneğin; UCA ve UCG'nin ikisi de serin aminoasidini şifreler.
Sonuç olarak UCA → UCG dönüşmesi proteinin yapısında bir değişikliğe sebep olmaz.

ii) Anlamsız mutasyon (nonsense mutasyon): Bu mutasyon tipinde anlamlı bir kodon stop kodonuna dönüşür ve protein oluşumu daha tamamlanmadan sentezi durdurulur. Bu şekilde sonlandırılan protein fonksiyonel değildir. GAG→UAG değişimi, yani

Glutamini sentezleyen kodonun stop kodununa dönüşümü buna örnek verilebilir (Bahçeci 2007)

iii) Anlamlı mutasyon (missense mutasyon): Bir baz sekansında meydana gelen bir değişim mRNA kodununda da değişiklik meydana getirir ve sonuçta farklı bir amino asidin proteinde yer almasına neden olur. AAA→ AGA değişimi Lisin yerine Arginin amino asidinin şifrelenmesi buna örnektir.

iv) Çerçeve kayması (Frameshift): DNA molekülüne fazladan bir veya daha fazla baz çiftinin girmesi (insersiyon) veya çıkmasıyla (delesyon) oluşan mutasyon şeklidir (Şekil 2.2). Bu değişiklikler sonucu okuma esnasında üçlü kodonların kayması meydana gelir (Dilsiz 2004).

DNA baz dizisi	mRNA dizisi	Aminoasit dizisi
Mutasyon türü		
CTA TTC CGA ACA	GAU AAG GCU UGU	Asp-Lys-Ala-Cys
Normal dizi		
CTA TT**T** CGA ACA	GAU AA**A** GCU UGU	Asp-**Lys**-Ala-Cys
Silent		
CTA TTC CGA ACA	GAU AAG GCU UGU	Asp-Lys-Ala-Cys
Normal dizi		
CTA **C**TC CGA ACA	GAU **G**AG GCU UGU	Asp-**Glu**-Ala-Cys
Missense		
CTA TTC CGA ACA	GAU AAG GCU UGU	Asp-Lys-Ala-Cys
Normal dizi		

CTA **A**TC CGA ACA	GAU **UAG** GCU UGU	Asp-**Stop**
Nonsense		
CTA TTC CGA ACA	GAU AAG GCU UGU	Asp-Lys-Ala-Cys
Normal dizi		
CTA TT**T** CCG ACA A	GAU AA**A** GGC UGU	Asp-Lys-**Gly**-Cys
Frameshift		

Şekil 2.2. Çerçeve kaymasını gösteren yapı

2. Geri mutasyonlar: Referans olarak esas genin yani yabanıl tip allelin kullanıldığı bir durumda; bu standarttan herhangi bir şekilde uzaklaşan herhangi bir değişim (örneğin, thr^+'nın thr^-'ye dönüşümü) ileri mutasyon olarak tanımlandığı daha önce belirtilmişti. İleri mutasyona uğramış herhangi bir allelin yeniden standart yani yabanıl tipe dönüşmesine ise (örneğin, thr^-'nin thr^+' ya dönüşümü) geri mutasyon olarak adlandırılır.

3. Baskılayıcı Mutasyonlar: Bir mutasyonun neden olduğu değişiklik sonucu, organizmada bulunan mutant allelin yabanıl allele baskın gelerek, mutant allelin fenotipte kendini göstermesine baskılayıcı mutasyon (örneğin: poky mitokondrilerinin yabanıl tip mitokondrileri engellemesi) denir. Baskılayıcı mutasyonu açıklamak için iki ana hipotez öne sürülmüştür. Bunlardan birine göre, poky mitokondri diye adlandırılan mutant ya da delesyonu olan mitokondri DNA daha hızlı replike olur ve mutant mitokondri sayıca üstün hale gelerek fenotipte baskın olarak görülür. İkinci hipoteze göre, mutant ve yabanıl tip mitokondri DNA'sı arasında rekombinasyon olur ve sonuçta normal mtDNA'sında hata oluşumu ya da yapısının bozulması gerçekleşir. Bazen de, bir gende mutasyon meydana geldiğinde ikinci bir gendeki farklı bir mutasyon ilk mutasyonun baskılanmasına neden olur. Bu durumda, ilk mutasyonun etkisini baskılayan ikinci mutasyona da baskılayıcı mutasyon denir.

i) Gen içi supresyon: Baskılayıcı tipteki bir mutasyonun etkisiyle aynı gende daha önce meydana gelmiş olan ilk mutasyon etkisinin kalkması şeklinde tanımlanır. Örneğin; insersiyon tipi mutasyonu izleyen delesyon tipi mutasyonun gerçekleşen ilk mutasyonun etkisini baskılaması.

ii) Gen dışı supresyon: DNA molekülünde mutasyona uğramış genden başka bir gende meydana gelen mutasyonun ilk mutasyonun etkisini ortadan kaldırması şeklinde tanımlanır. 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 (Önder 2009).

2.4.2. Mutajenik ajanlar

DNA yapısını veya dizisini değiştirebilen, doğal veya insan yapımı (fiziksel ya da kimyasal) bir etkendir. DNA onarımındaki hatalar da DNA'ya hasar veren etkenlere karşı duyarlılığı artırır. Bu ajanlar kimyasal mutajenler ve fiziksel mutajenler olmak üzere iki grupta incelenir.

2.4.2.a. Kimyasal mutajenler

Tarımda, tıpta, sanayide ve birçok farklı alanda kullanılan bazı kimyasal maddenin birikimi ve doğrudan etkisi ile DNA'da mutasyonlara neden olan bileşimlere kimyasal mutajenler denir. Çoğu endüstriyel aktivitelerin yan ürünleri olarak doğal ortama verilen, mutasyona sebep olduğu bilinen genotoksik kimyasal maddelerin belli başlı grupları aşağıdakilerden oluşmaktadır (Dilsiz 2004).

i) Alkilleyici ajanlar: II. Dünya Savaşı'nda keşfedilen kükürt içeren hardal gazları, kimyasal silah araştırmalarında tanımlanan ilk kimyasal gruplardan birisiydi. Hardal

gazları alkillleyici ajanlardan biridir. Yani nükleotitlerdeki amino veya keto gruplarına –CH_3 ya da –CH_3-CH_2 gibi bir alkil grubunu eklerler. Hardal gazının yanı sıra polivinil klorid, aynı etki mekanizmasına sahip kükürt ve nitrojen mustard, etilenoksitler ve daha az toksik olan etil metan sulfonat (EMS), metil metan osülfonat (MMS), nitroguanidin (NG) bu gruba girer. Etilmetan sülfonat, guaninin 6 numaralı ve timinin 4 numaralı pozisyonundaki keto gruplarını alkiller. Bunu sonucu alkillenen bazların baz eşleşme yatkınlıkları değişmiştir ve transisyon mutasyonları oluşur. Örneğin: EMS'nin etkisiyle oluşan 6-etil guanin durumundaki baz, adeninin baz analoğu gibi davranır ve timinle eşleşir. Dolayısıyla bu etkenler; depürinasyon, zincir kırılması, transisyon ve transversiyon tipinde nokta mutasyonlarına neden olabilmektedirler.

ii) Baz analogları: Nükleit asit biyosentezi sırasında pürin ve pirimidinler yerine geçebilen moleküllere baz analogları denir. Örneğin, urasilin bir türevi olan 5-bromourasil (5-BU), timin analoğu olarak davranır ve pirimidin halkasının 5 numaralı pozisyonunda halojenlenir. Eğer 5-BU timin yerine DNA'ya girerse ve enol formuna neden olan tautomerik bir kayma olursa, 5-BU guanin ile eşleşir. Bir replikasyon döngüsünden sonra, A=T yerine G=C şeklinde bir transisyon oluşur. 5-BU'nun DNA'da bulunuşu, mutajenik bir ajan olan UV'ye karşı duyarlılığı da arttırır. Diğer bir baz analoğu olan 2-amino pürin (2-AP)'de hem adenin analoğu olarak davranabilir hem de sitozin ile eşleşebilir (Önder 2009).

iii) İnterkalasyon yapan ajanlar: Bu gruba dâhil olan mutajenler, geniş hidrofobik yüzeylere sahiptirler. Kendileri gibi hidrofobik olan bazlar arasına girerek komşu bazların birbirinden uzaklaşmasına neden olurlar. İki baz arasında açılmış olan mesafeye bir veya daha fazla baz ilavesi veya delesyonu olabilir. Sonuçta çerçeve kayması mutasyonu meydana gelir. Akridin oranj, proflavin, akriflavin, fenantridin, azakuinakrin, benzakridin, kuinakrin, etidiyum bromür ve propidiyum diiyodür gibi mutajenler interkalasyon yapan mutajenlere örnektirler (Konuk 2004).

iv) Deaminasyon yapan ajanlar: "Amino" grubu içeren bazlarla reaksiyona girerek, DNA bazlarının, "amino" gruplarını deamine eden ve baz sıralamalarında bozukluğa

neden olan mutajenik ajanlar bu gruba dahildir. Örneğin, Nitröz asit, oksidatif deaminasyon yolu ile öncelikle amino grupları enol ve keto gruplarına dönüştürür. Böylece sitozin, adenin ve guanin sırasıyla urasil, hipoksantin ve ksantine dönüştürülür. Sonuçta urasil adenin ile baz çifti yaparak GC → AT transisyonu, hipoksantin sitozinle baz çifti yaparak AT → GC transisyonu, ksantinde adenin ile baz çifti yaparak AT → GC transisyonu oluşur (Önder 2009).

v) Aromatik Aminler: Arilaminler olarak da adlandırılan bu maddeler lastik ve petrokimya endüstrisinde kullanılan boyalar içerisinde bol miktarda bulunurlar (Murray 2004) ve karsinojenik-mutajenik özelliğe sahip çevresel ve endüstriyel kimyasalların en önemli sınıfından birini oluştururlar. Bu maddeler DNA ile bağlanamazlar, N-hidroksil gruplarının sülfatlanmasına ve asetilasyonuna sebep olurlar. Örneğin, bu ürünler DNA'nın guanin bazları ile reaksiyona girerek guaninin yanlış eşleşmesine sebep olurlar (Özbek 2006).

vi) Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAHs): PAH'lar orijinal olarak yağların ve biyolojik materyallerin piroliziyle ortaya çıkan bileşiklerdir. Tütünde, viskide, ızgara ette 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 alırlar (Özbek 2006).

2.4.2.b. Fiziksel mutajenler

i) Sıcaklık derecesi: Yüksek sıcaklık, moleküllerin kinetik enerjilerini artırmak suretiyle mutasyonlara sebep olur. Özellikle pürin bazlarının uzaklaşması ile depürinasyona neden olurlar.

ii) pH: DNA'nın pH3.0'da zayıf asitlerle muamele edilmesi, pirimidin-deoksiriboz arasındaki glikozidik bağları veya fosfodiester bağları etkilemeksizin, onun tüm pürin

bazlarını seçici olarak uzaklaştırır. Bu olay sonucu pürin bazlarından yoksun olan bir DNA yapısının meydana gelmesine depürinasyon denir. Ortamın pH derecesi de moleküller arası etkileşmelerde ve özellikle tautomerik dönüşümlerde rol oynar (Konuk 2004).

iii) Işınlar: α-, β- ve γ- ışınları gibi yüksek enerjili **iyonize radyasyonun** absorbsiyonu hedef moleküllerde elektron kaybına neden olur. Bu elektronlarda DNA'da çeşitli kimyasal değişimlere (zincir koparma, baz ve şeker yıkımı gibi) yol açar. **İyonize olmayan radyasyon,** moleküler titreşime veya hedef moleküldeki elektronların yüksek enerji seviyesine çıkmasına neden olur. Bu durum da yeni kimyasal bağların oluşmasına neden olabilir. Fiziksel mutajenler arasında etki mekanizması en iyi çalışılmış olan ultraviyole (UV) ışınlarıdır. UV radyasyonun zararlı etkisi, özellikle iki timin bazı arasında dimerlerin oluştuğu pirimidinler üzerindedir. Sitozin-sitozin dimerleri de oluşabilir, fakat sayıları daha azdır. Bu dimerler DNA konformasyonunu bozar ve normal replikasyonu durdurur. Replikasyonun durması, UV radyasyonunun mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisinin sorumlusu olarak görülmektedir (Önder 2009).

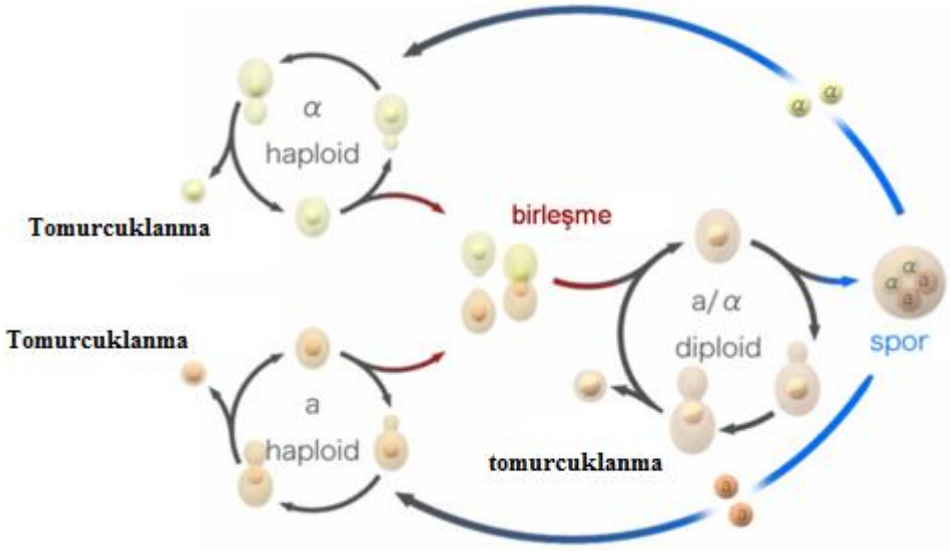
2.4.3. Deneysel mutasyonlar

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 (Özbek 2006).

2.5. Kısa zamanlı Mutajenite - Antimutajenite testleri

2.5.1. Maya delesyon test sistemi

Funguslar; mayalar ve küfler olmak üzere iki temel morfolojik formda ürerler. Maya ve maya benzeri funguslar katı besiyerlerinde düz, nemli, opak, kremsi, pembe, sarı, sürküler, sınırlı, yapışkan veya mukoid koloniler oluştururlar. Seksüel veya aseksüel ya da tomurcuklanma ile oluşan, seferik, elipsoidal hücreler içeren 3-15 µm çapında küflerin aksine tek hücreli mikroorganizmalardır (Gönlüm 1994). *S. cerevisiae*'nın da dâhil olduğu maya hücreleri, haploit ve diploit biçimde varlıklarını sürdürebilirler. Haploit hücreler mitoz bölünme ve mitoz bölünmeyi takiben büyümeyi içeren basit bir yaşam döngüsüne sahiptirler ve yüksek stresli ortamda genelde ölürler. Diploit hücreler de haploit hücreler gibi bir yaşam döngüsüne sahip olmakla beraber stres halinde sporlanıp mayoz bölünmeye girerek çeşitli haploit sporlar oluştururlar ve bu sporlar çiftleşip yeniden bir diploit hücre oluştururlar. Mayanın a ve α olarak adlandırılan iki eşey tipi vardır. Haploit hücrelerin eşleşebilmek için farklı eşey tiplerine sahip olmaları gerekir (Şekil 2.3).



Şekil. 2.3. *S. cerevisae'*nın yaşam döngüsü

S. cerevisiae, aerobik ve anaerobik metabolizmaya sahip örnek organizmalardan biri olup, aerobik koşullarda ürer, anaerobik koşullarda ise fermentasyon yapar (Bilgiçli 2000). Günümüzde ökaryotik bir model organizma olarak *S. cerevisiae*'nın genomunun insana uyarlanabileceği anlaşılmıştır. Diğer mikroorganizmaların aksine *S. cerevisiae* suşlarının kararlı diploid ve haploid formları çok çeşitli markırlar içermektedirler. Bu yüzden resesif mutasyonların haploid suşlarda, bütünlük testlerinin ise diploid suşlarda yapılabileceği gösterilmiştir. DNA transformasyon tekniklerinin geliştirilmesiyle mayalar gen klonlama ve genetik mühedislik teknikleri için oldukça kullanılır olmuşlardır (Sherman 2002). Bu kullanımlardan bazıları; malaria antijeni (Bathurst 1994), insan genomuna ait interferon (Hitzeman *et al*. 1981), hepatit B virüs antijeni (Miyanohara *et al*. 1986), B1 vitamini (Van Lanen *et al*. 1942) üretimi, ağır metal biyoabsorbsiyonu (Strandberg *et al.* 1981), biyosensör olarak toksik kimyasalların tespiti (Hollis *et al*. 1999), tek hücre proteini eldesi (Litchfield *1989),* insan insülini *(*Kjeldsen 2000), tümör nekroz faktörü (Jeong and Jue 2000), insan serum albümini (Kobayashi *et al.* 1999), Hiv-1 aşılarının üretimidir (Caumont *et al.* 1995).

Ayrıca *S. cerevisiae* ile yapılan birçok çalışma, bu organizmanın; genomu yeniden düzenleyerek çeşitli kanser tiplerinin gelişimine yol açan karsinojenleri belirlemede kullanılabileceği olgusunu ortaya çıkarmıştır (Brennan and Schiestl 2004; Howlett and Schiestl 2004; Kirpnick *et al.* 2005).

Genetik değişim ile kanser arasında bulunan sıkı ilişki, kromozom hasarlarının tespitine yönelik standart testlerin önemini artırarak, bu testlerin gelişimine yönelik süreci hızlandırmıştır. Kansere sebep olan etmenlerin %70-90'ının çevresel karsinojenlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. İlaç, kozmetik ve gıda sanayisinde kullanılan birçok katkı maddesinin karsinojenik etki potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Ticari olarak kullanımda olan 60.000 sentetik kimyasal bulunmakta olup, her yıl 1000 kadar yeni sentetik kimyasal madde ortaya çıkmaktadır. Eğer karsinojenler, etkilerini ortadan kaldıran faktörler belirlenerek etkisiz hale getirilebilinirse, karsinojenlerin büyük bir kısmının oluşturacağı zararların engellenebilineceği düşünülmektedir. Ancak, çevremizde bulunan bu kimyasalların büyük bir kısmının karsinojenik aktiviteleri

araştırılmamıştır. Günümüzde, çevresel karsinojenlerin belirlenmesi için oluşturulmuş test sistemlerinin çoğunluğunu uzun süren ve hayvanların kullanıldığı test sistemleri oluşturmaktadırlar. Karsinojenlerin hayvanlar üzerinde denenmeleri hem çok pahalıdır hem de 2-4 yıl kadar uzun süren bir süreç gerektirir. Kısa zamanlı test sistemleri, uzun süreli test sistemleriyle karşılaştırıldıklarında hem daha ucuzdurlar hem de daha kısa bir sürede tamamlanabilirler. Bu yüzden herhangi bir maddenin karsinojenik potansiyelini kabul edilebilir bir doğrulukla tespit edebilen kısa süreli test sistemlerinin kullanımının oldukça faydalı olacağı düşünülmüştür. Ancak bu maddelerin, üretimin erken safhalarında karsinojenik potansiyellerinin mevcut kısa süreli test sistemlerince tespiti çok zor veya imkânsızdır. Örneğin, *S. typhirnurium'*un mutastonuna dayalı olan ve en çok kullanılan kısa süreli mutajenite testlerinden biri olan Ames testinin karsinojen maddeleri tespit etme kabiliyeti % 56 olarak belirtilmiştir. Uzun süreli test sistemlerinin de yakın bir gelecekte bu problemleri çözemeyeceği düşünülmektedir. Bu nedenle, kısa süreli test sistemlerinin hassasiyetleri artırılarak bu problemlerin çözüleceği tahmin edilmektedir (Schiestl 1993). Sonuç olarak, hem ucuz hem kısa süreli test sistemlerinden biri olan maya delesyon test sistemi kromozomal hasar tespiti başta olmak üzere karsinojen kimyasalların tespitinde de kullanılmak üzere araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Diğer kısa süreli test sistemleriyle karşılaştırıldığında hassasiyeti, mevcut kısa süreli test sistemlerinden daha iyi olan maya delesyon test sistemi Dr. Robert H. Schiestl tarafından 1987 yılında geliştirilmiştir (Aubrecht *et al.* 1999). Kısa süreli test sistemlerinden olan Ames test sistemi ve maya delesyon test sistemi güvenilirlikleri açısından karşılaştırıldıklarında aralarında önemli sayılabilecek bir fark olduğu tespit edilmiştir. 'Kimyasalların Güvenliği' isimli kuruluş tarafından belirlenmiş bazı kimyasalların bu test sistemlerinin her ikisi de kullanılarak ayrı ayrı karsinojenik özellikleri test edilmiş ve sonuçta Ames test sisteminin bu kimyasalları tespit edebilme oranı %20; maya delesyon test sisteminin bu maddeleri tespit edebilme oranı %60 olarak bulunmuştur (Cals and Schiestl 1994).

Yapılan bir diğer çalışmada, 8 karsinojen ve 2 nonkarsinojen madde birçok farklı laboratuvar ekibi tarafından farklı mutajenite ve genotoksisite test sistemleri kullanılarak test edilmiştir. Bakteriyel mutajenite test sistemlerinin birçoğu hiçbir

maddeyi doğru şekilde sınıflandıramazken, bunlardan Ames testi sadece 10 maddeden 2 maddeyi doğru şekilde sınıflandırabilmiştir. Ancak, tüm mutajenite test sistemleri içerisinde maya delesyon test sistemi bu kimyasalların %60'ı gibi yüksek bir miktarını karsinojen ve nonkarsinojen olmak üzere doğru bir şekilde sınıflandırmıştır (Brennan and Schiestl 2004; Sobol *et al*. 2007). Sonuç olarak, bakteriyel mutajenite testlerince ve kısa süreli genotoksisite testlerince çok az ölçüde tespit edilen karsinojenlerin maya delesyon test sistemi kullanılarak tespiti oldukça hassas ve spesifik olmaktadır.

İnversiyonlar, translokasyonlar ve delesyonlar gibi genomik düzeyde oluşan yeniden düzenlenmeler karsinojeniteyle ilişkilidir. Özellikle insanlarda görülen kanser vakalarının büyük bir kısmında (Amerika'da %50'sinde) p53 geni değişime uğramıştır. Bu nedenle kanser araştırmalarında gen düzeyinde en çok p53 geni çalışılmaktadır. İnsanlarda görülen birçok kanser vakasında, tümör gelişiminden önce p53 geninin ikinci yabanıl tip alleli kaybolmaktadır. Heterozigotluğun kaybı olarak tanımlanan bu olay, nokta mutasyonunun tanımlandığı p53 genini de içeren 17. kromozomdaki delesyonların sonucu gerçekleşmektedir. Heterozigotluğun kaybolmasıyla genomun yeniden düzenlenmesi sonucu meydana gelen bazı genetik hastalıklar genomik kararsızlığa, genomik kararsızlık da karsinogenezisin yüksek sıklıkta görülmesine neden olmaktadır. Ataxia telangiectasia, Li-Fraumeni sendromu, Bloom sendromu, Werner sendromu, Cockayne sendromu, Fanconi anemia, Lynch sendromu I ve II, Wiskott-Aldrich sendromu ve xeroderma pigmentosum gibi kansere eğilimli hastaların hücrelerinde de genomu yeniden düzenleyen rekombinasyonların sıklığında artış gözlemlenmiştir.

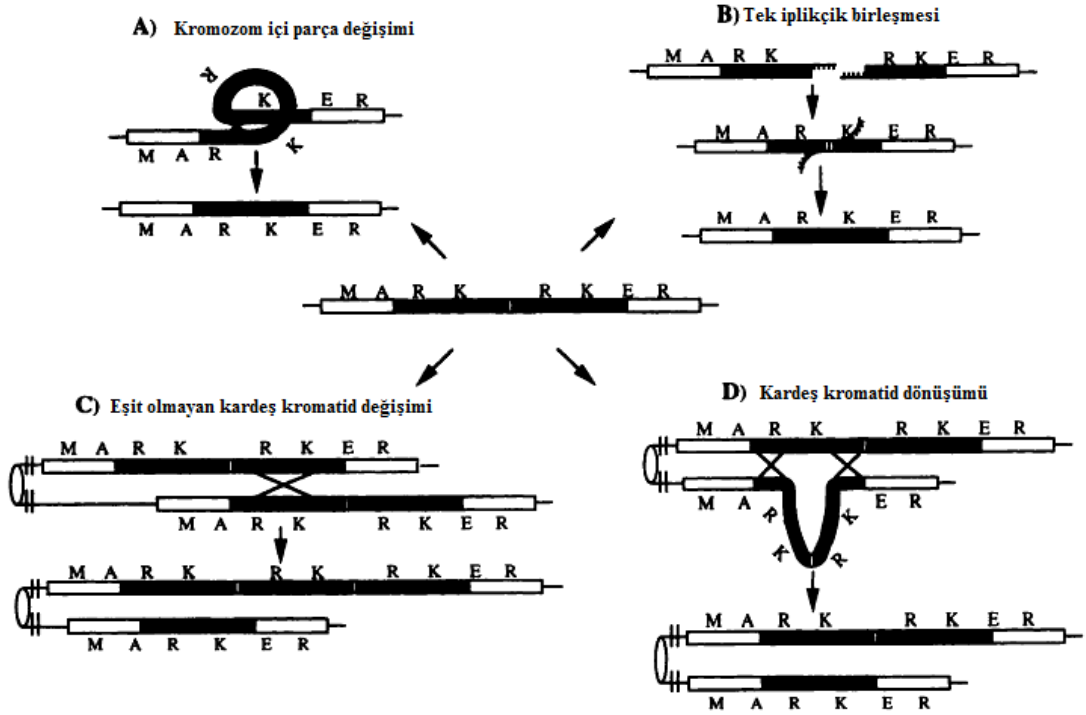
Genomik düzeyde oluşan yeni düzenlemelerle karsinojenite arasındaki sıkı ilişki nedeniyle, genomik delesyonla sonuçlanan intrakromozomal homolog rekombinasyonların sıklığını ölçen sistemler maya, insan, fare, hamster, tütün ve arabidopsis gibi çeşitli organizmalar kullanılarak geliştirilmiştir. Farklı durumlarda rekombinasyon sistemlerinin genotoksik streslere cevap verdiği gösterilmiştir. Sonuç olarak görülmüştür ki; İntrakromozomal rekombinasyonların sıklığını ölçen sistemler içinde en kullanışlı ve en basit sistem maya delesyon testidir. Mayada gözlenen

delesyon sonucu meydana gelen rekombinasyonunun; iyonize edici ve etmeyici radyasyon, alkilleyici ajanlar, oksidatif stres, DNA iplikçik kırıkları oluşturan ajanlar ve sıcaklık şokunu da içeren ajanlarla teşfik ederek bu ajanları tespit edilebilmesi sistemin en önemli avantajları arasındadır. Maya delesyon test sistemi; homolog olan iki kromozomundan birinin His3 gen bölgesi hasara uğratılarak ve diğer kromozomunun da aynı gen bölgesine bir marker geni yerleştirilerek oluşturulmuş suşların kullanıldığı bir test sistemidir. Mutajen maddeyle muamele edilmesi sonucunda kromozom içi delesyon sonucu meydana gelen rekombinasyonla His3 geninin dönme sıklığını ölçerek kimyasalları mutajen ve mutajen olmayan şeklinde analiz edebilen hızlı ve basit bir yöntemdir. Maya delesyon test sistemi DNA hasarına yol açan birçok kimyasalın delesyon-rekombinasyon oluşturma sıklıklarını araştırmada kullanılmıştır. Mutajen kimyasallar uygulandığında, kullanılan suşların histidin prototrofisine dönüşü, histidin aminoasidini sentezleyen gen bölgesine yerleştirilmiş marker genin delesyonu sonucu olmaktadır (Brennan and Schiestl; 2004, Sobol *et al*. 2007; Rodriguez *et al.* 2008). Maya delesyon test sisteminin en çok kullanılan suşlarından biri olan RS112 suşu intrakromozomal delesyon rekombinasyonuna ilaveten interkromozomal gen dönüşümlerinin sıklığını araştırmada da kullanılabilmektedir. İki rekombinasyon tipi, çeşitli genotoksik hasarlara verdikleri cevaplar ve mekaniksel olarak genetik kontrolleri bakımından birbirinden farklıdır (Brennan and Schiestl 2004).

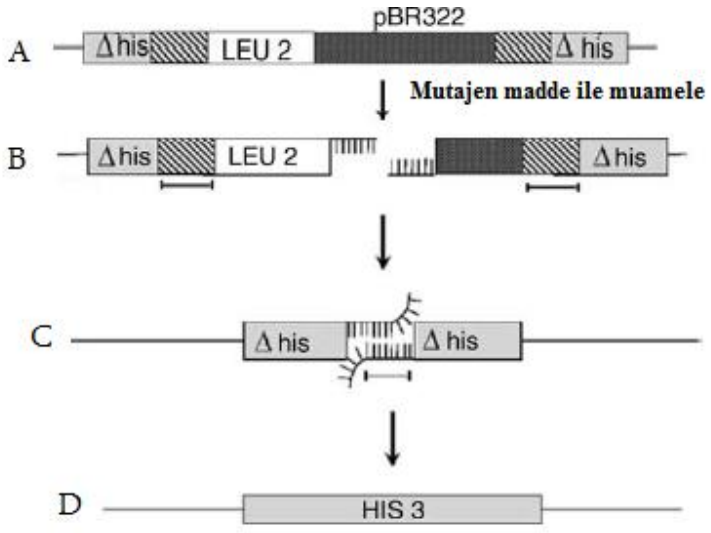
2.5.1.a. Histidin gereksinimi

Bu test siteminde kullanılan 16 kromozom içeren *S. cerevisiae'*nın 15. kromozomunun 1. allelinde bulunan histidin aminoasidini sentezleyen gen (HİS3) çıkarılmıştır. 15. kromozomun 2. allelindeki HİS3 lokusuna fonksiyonel olmayan bir his3 geninin fragmenti ve LEU2 marker genini içeren bir plazmid yerleştirilmiştir. 15. kromozumun 2.alleline yerleştirilen plazmid his3 geninin olduğu bölgede içine yerleştirildiği gene entegre edilmiştir. Böylece 15. kromozumun 2. allelindeki his3 geni kısmen dublike olmuştur. Organizmada spontan olarak veya bir mutajenle muamele edildiğinde, 15. kromozomun 2. alleline entegre edilmiş olan plazmid kırılır ve daha önce kısmen duplike olan his3 geninin ortaya çıkmasına neden olur. Kısmen dublike olan his3 geni

olası dört farklı mekanizmayla fonksiyonel olan HİS3 genine dönüşür (Brennan and Schiestl 2004; Rodriguez *et al.* 2008). Sonuç olarak organizma mutajenle muamele edildiğinde histidinsiz ortamda üreme gösterir (Şekil 2.4 ve 2.5).



Şekil 2.4. Histidin protrofisine dönüşü gösteren dört olası mekanizma (Schiestl *et al.* 1997)



Şekil. 2.5. Histidin protrofisine dönüş (Kirpnick *et al.* 2005)

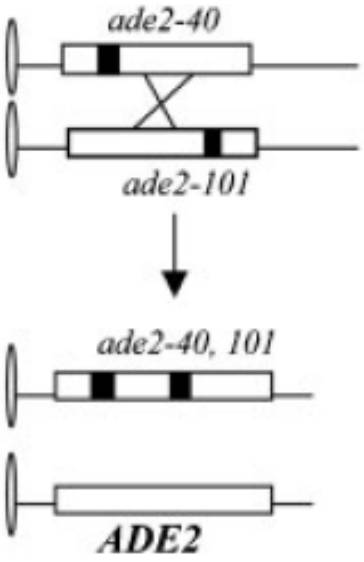
2.5.1.b. Lösin gereksinimi

*S. cerevisiae'*nın RS112 suşunda lösin aminoasidini sentezleyen gen bölgesi 3. kromozomda bulunan Leu2 geni tarafından sentezlenir ve suş lösin aminoasidine oksotroftur. RS112 suşu oluşturulurken Leu2 markır geni , 15. kromozomda bulunan ve histidin amino asidinden sorumlu his3 gen bölgesine bir plazmid vasıtasıyla entegre edilmiştir. 15. kromozoma entegre olan Leu2 markır geni sayesinde organizma lösin protrofu, ancak histidin oksotrofu olur. Organizmada spontan olarak veya organizma bir mutajen ajana maruz kaldığında 15. kromozomuna entegre edilen Leu2 markır geni çıkar (Brennan and Schiestl 2004; Rodriguez *et al.* 2008). Leu2 markır geninin çıkmasıyla organizma bu defa lösin oksotrofu, ancak histidin prototrofu olur (Şekil 2.4 ve 2.5).

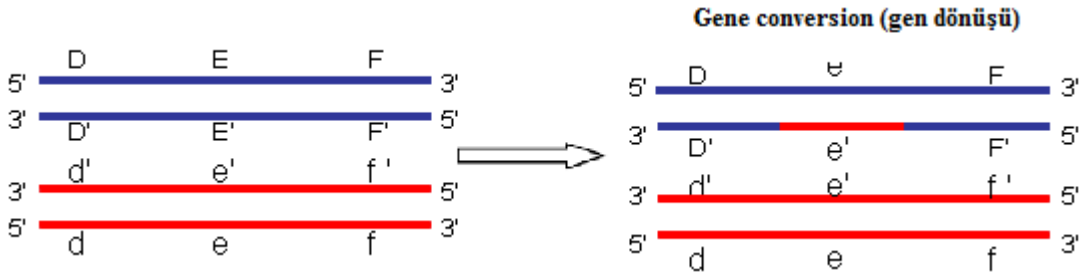
2.5.1.c. Adenin gereksinimi

RS112 suşu aynı zamanda adenin bazına oksotroftur, yani organizmada adenin bazını sentezleyen kromozom hasara uğratılmıştır. Bu hasar sonucu RS112 suşunun kolonileri kırmızı renkte olmaktadır. Organizmada spontan olarak oluşabilen veya organizmanın bir mutajen ajana maruz kalmasıyla 'gene conversion''(gen dönüşümü) diye adlandırılan olay sonucu kromozomlar arası parça değişimi (interchromosomal recombination) gerçekleşir. Bu olayın gerçekleşmesiyle, organizma adenin bazının sentezinden sorumlu ADE2 gen bölgesini fonksiyonel hale getirir ve böylelikle beyaz renkli koloni oluşturur (Şekil 2.6, 2.7 ve 2.8). Bu olay sayesinde, maya delesyon test sistemiyle kromozomlar arası parça değişimine sebep olan mutajenlerde tespit edilebilmektedir (Brennan and Schiestl 2004; Sobol *et al*. 2007).

Şekil 2.6. Adenin prototrofisine dönüşü gösteren yapı



Şekil 2.7. Adenin prototrofisine dönüşü gösteren mekanizma (Caligo *et al*. 2008)



Şekil 2.8. Adenin bazı gen bölgesinde meydana gelen gen dönüşünü gösteren yapı

2.5.2. Ames/*Salmonella* test sistemi

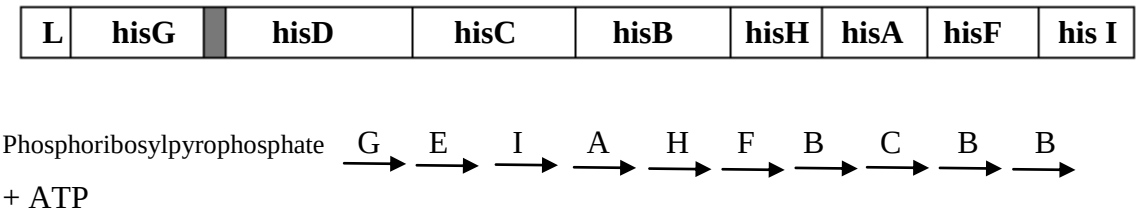
Ames/*Salmonella* test sistemi Dr. Bruce Ames tarafından 1970'lerde geliştirilmiş ve o zamandan günümüze kadar dünya genelinde genel kabul gören, kimyasal maddelerin nükleotid seviyesinde potansiyel genetik aktivitelerini hızlı, güvenilir ve ekonomik bir şekilde araştıran bir test sistemidir (Clare 1995; Mortelmans and Ziger 2000).

Ames/*Salmonella* test sistemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden bir tanesidir. Bu test sistemi mutajen madde araştırmalarında mikrobiyal test sistemleri kullanımının ilk örneğidir. Ames testinde kullanılan *Salmonella* suşları önceden içerdikleri mutasyonlar nedeniyle gerekli olan histidin aminoasidini sentezleyemez ve bundan dolayı büyüyüp koloni oluşturamazlar (Mortelmans and Ziger 2000). Mutasyonlu gendeki ikinci bir mutasyon hasarlı genin restorasyonu ile sonuçlanır ve daha önce sentezlenemeyen histidin amino asidinin sentezlemesine yol açar ve bundan dolayı bu test sistemi çoğunlukla reversiyon testi olarak adlandırılır (Şekil 2.9 ve 2.10). Ames test sisteminde kullanılan *Salmonella* suşları her biri farklı mekanizmalarla mutasyona neden olan mutajen maddelerin tespiti için histidin operonunda farklı mutasyonlar içermektedirler. İlave mutasyonlar bu suşların geniş çeşitlilikteki maddelere cevap vermeleri için tasarlanmıştır (Mortelmans and Ziger 2000). Bu test sisteminde kullanılan *S. typhimurium* test bakterileri aromatik ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bileşiklerin karaciğerde aktifleşmeden mutajenik etki göstermeyen mutajenlerin tespiti için kullanılır (Jorgensen *et al.* 1987).

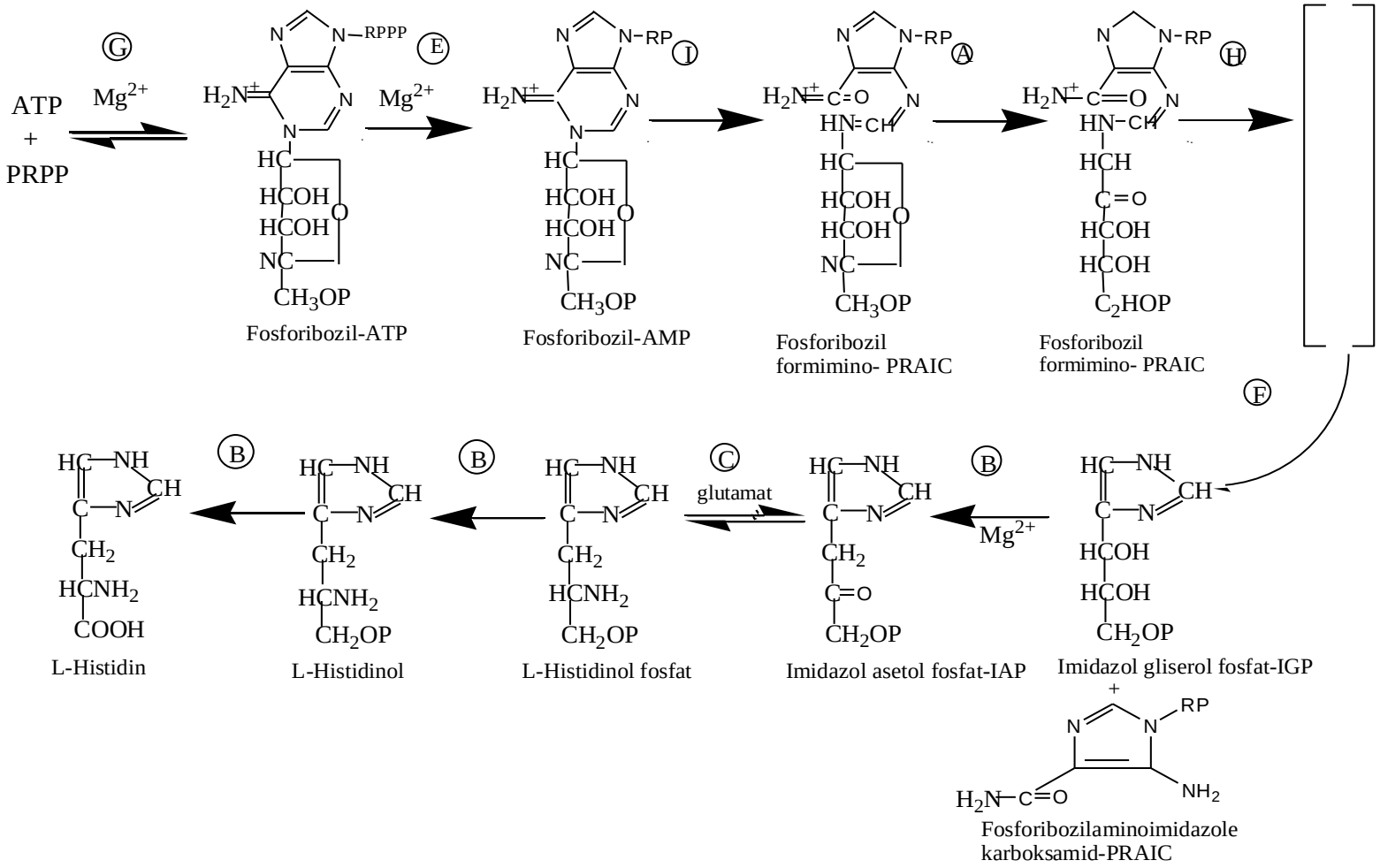
Ames test sisteminin dünya genelinde genel kabul görmesinin nedenlerinden biri test sisteminin mutajen/karsinojenik madde tespitinin yanı sıra antimutajenik ve anti karsinojenik madde tespitini de yapabilmesidir (Fratianni *et al.* 2007). Yapılan bazı çalışmalarda karsinojen ve non-karsinojen olan 300 madde Ames test sistemine tabi tutulmuş ve Ames test sisteminin karsınojen maddeleri mutajen olarak tespiti %90 bulunurken, non-karsinojenlerin non mutajen alarak tespiti %87 olarak bulunmuştur (McCann and Ames 1976). Mutajenite testlerinde kullanılan *S. typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri aşağıda verilmiştir:

2.5.2.a. Histidin mutasyonu

Ames/*Salmonella* 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 değişmeleri yada çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Test edilen bileşiğin neden olduğu mutasyonun esas mekanizması, moleküler düzeyde bu suşlarla gösterilebilir (Mortelmans and Zeiger 2000).



Şekil 2.9. Histidin operonunu gösteren gen yapısı



Şekil 2.10. Histidin biyosentezi

S. 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 hisG üzerindedir. Bu mutasyon, hisG geninde, lösin aminoasidinin 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 and Zeiger 2000).

Ames test sisteminde, *S. typhimurium* TA100 ve *S. typhimurium* TA1535 suşlarında, histidin mutasyonunun yanısıra, test edilen kimyasallara bu suşları daha duyarlı hale getirebilmek için rfa mutasyonu, uvrB mutasyonu ve R faktörü gibi ilave mutasyonlar ve genetik değişiklikler bulunmaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000).

2.5.2.b. *rfa* mutasyonu

rfa mutantları, polisakkaritlerin sentezinden sorumlu bir enzim bakımından kusurludurlar. Bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit (LPS) tabakasını kodlayan genlerde meydana getirilen *rfa* mutasyonu nedeniyle tüm test suşlarında bakteri yüzeyini kaplayan lipopolisakkarit tabakanın eksik sentezlenmesi gerçekleşmektedir. Bakteri yüzeyini kaplayan LPS tabakasının eksik veya hatalı sentezlenmesi de bakteriyi dış ortamdan gelebilecek yabancı maddelere karşı koruyan engelin kalkmasına, dolayısıyla mutajenin bakteri içerisine girmesini kolaylaştırarak, hücrenin mutajen büyük moleküllü olsa bile daha duyarlı olmasına yol açmaktadır (Ames *et al*. 1973; Mortelmans and Zeiger 2000). Çünkü Ames test sisteminin amacı kimyasal maddelerle bakteri DNA'sını karşı karşıya bırakarak, bu kimyasalların mutasyon yapabilme özelliklerini tespit etmektir (Mortelmans and Zeiger 2000).

2.5.2.c. *uvrB* mutasyonu

uvrB mutasyonu DNA tamir mekanizmasında, uygun olmayan bazların çıkarılmasını sağlayan yani 'kesip-çıkarma'(excision repair) görevini üstlenen ABC enzim sisteminin altünitesi olan uvrB'nin gen bölgesinin delesyonu ile oluşmuştur. Bu sayede kullanılan suşlarda DNA tamir mekanizması çalışmayacak, maruz kalınan mutajenin DNA üzerindeki etkisi giderilemeyecek ve sonuç olarak birçok mutajenin ortaya çıkarılmasındaki duyarlılık arttırılmış olacaktır. Ancak, teknik nedenlerden ötürü bu delesyon ile birlikte istenmeden, biyotin sentezini kodlayan genler de delesyona uğramıştır. Vitamin H denilen biotinin sentezinden sorumlu biotin geninin delesyonu bakterinin yaşamı için zorunlu bir maddeden mahrum kalmasına neden olmuştur. Bu nedenle Ames testi uygulanırken kullanılan suşların üreyebilmeleri için histidinin yanında biotin de ortama ilave edilmektedir (Ames *et al*. 1973; Mortelmans and Zeiger 2000).

2.5.2.d. R faktörü

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. typhimurium* TA 1538 ve TA1535 suşlarına, ampisiline dirençlilik geni tasıyan pkM101R faktörü plazmidin eklenmesiyle *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları elde edilmiştir (Ames *et al*. 1973). Plazmid içeren suşların, mutajenik olduğu gösterilmiş ajanlara karşı cevapları, plazmid içermeyen suşlara göre oldukça yükselmiştir. Plazmid içeren yeni suşlar, 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 onarım sistemi ile bağlantılı gen ürünleri içermektedir (Levin *et al*. 1982).
Bu plazmid, DNA'nın kesme-çıkarma yoluyla onarım mekanizmasının aktivasyonuna ve dolayısıyla spontan mutasyonların ve kimyasalların neden olduğu mutasyonların artmasına neden olur. Bunların dışında son olarak Ames test sistemine daha sonra sıçan karaciğerinin süpernatantını ve kofaktörlerini içeren bir metabolik aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya

çalışılmıştır. Önceki çalısmalarda mutajenik aktivite göstermeyen birçok prokarsinojenler, test sisteminin metabolik aktivasyonu içeren bu uygulaması ile pozitif sonuç vermiştir (Ames *et al*. 1973; Mortelmans and Zeiger 2000).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mutajenik ve antimutajenik özellikleri araştırılan etken maddelerin eldesi

3.1.1.a. Bitkilerin toplanması ve adlandırılması

Mentha longifolia L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisi Palandöken-Erzurum (1400 m) bölgesinden, 2007 yılı Temmuz-Ağustos aylarında, bitkilerin çiçeklenme dönemlerinde toplanmıştır. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* türünün tanılanması Davis (1988)'in ''Flora of Turkey and The Aegean Islan'' adlı eserinden yararlanılarak Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi-Biyoloji Bölümü) tarafından yapılmıştır. Tanılanan bitkiye ait bu örnek Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda (ATA HERB 9732) mevcuttur.

3.1.1.b. Mutajenik ve antimutajenik potansiyeli araştırılan etken maddeler

Çalışmamızda mutajenik ve antimutajenik potansiyelleri araştırılan etken maddeler *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden, Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı tarafından izole edilip tarafımıza sağlamıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan mutant organizmalar

3.1.2.a. *S. cerevisiae* RS112 suşu;

Çalışmada kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* RS112, Prof. Dr. Robert H. Schiestl (Departments of Pathology, Environmental Health and Radiation Oncology, Geffen School of Medicine and School of Public Health UCLA, CA 90095, USA) sağlanmıştır.

3.1.2.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşları;

Bu çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA1535 (ATTC® Numarası: 29629) ve TA1537 (ATTC® Numarası: 29630) mutant bakteri suşları ATTC® (The American Type Culture Collection – Georgetown University, Bacteria Department, Washington, U.S.A.)'den sağlanmıştır.

3.1.3. Pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler

Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde pozitif kontrol olarak kullanılan ve doğrudan etki gösterme potansiyeline sahip mutajenik ajanlardan etil metan sülfonat (EMS), ($C_3H_8O_3S$), akridin ($C_{13}H_9N$) ve sodyum azid (NaN_3) Sigma-Aldrich®'ten ve 9-aminoakridin (9-AA) Merck®'ten temin edilmiştir. Mikrobiyal mutajenite ve antimutajenite uygulamalarının çeşitli aşamalarında kullanılan kimyasal maddelerden D-glukoz (dekstroz) ve Nutrient Broth No:2 Oxoid®'ten; Nutrient Agar ve Bacto Agar Difco®'dan; yeast extract-peptone-dekstroz (YPAD) Fluka'dan; L-triptofan, magnezyum sülfat ($MgSO_4$) ve potasyum fostaf dibasic (K_2HPO_4) Merck®'ten; Amonyum sodyum fosfat dibasic tetrahidrat ($NaNH_4HPO_4$ +4H_2O), D-biyotin, L-histidin HCl, kristal viyole, sitrik asit monohidrat ($HOC(COOH)(CH_2COOH)_2$ +H_2O), sodyum klorür (NaCl), sodyum fosfat monobasic (NaH_2PO_4), Yeast Nitrogen Base Without Aminoasit, L-arjinin, homoserin, L-lizin, L-fenilalalnin, L-metiyonin, L-

izolösin, L-valin, L-lösin, L-tirozin, urasil L-adein hemisülfat ve sodyum fosfat dibasic (Na_2HPO_4) Sigma-Aldrich®'ten temin edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, (TÜRKİYE, 8190NF)
Çalkalamalı İnkübatör	: Wisecupe, (KOREA, Wis-20)
Çalkalamalı İnkübatör	: Zhicheng, (CHINA, ZHWY-200B)
Derin Dondurucu	: Nuaire, (U.S.A., SN P07K-476316-PK)
Hassas Terazi	: Scaltec, (GERMANY, SPB42, SN SPB42-90908239)
İnkübatör	: Binder, (GERMANY, BD53)
Manyetik Karıştırıcı	: Nüve, (TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083)
Mikrodalga Fırın	: Arçelik, (TÜRKİYE, MD592)
Mini Karıştırıcı	: IKA, (U.S.A., M51, SN 03017581)
Otoklav	: Hirayama, (JAPAN, HVE 50, SN 030787253)
Saf Su Cihazı	: Ateks, 7x35, Eu (GFL, Germany)
Sıcak Su Banyosu	: Memmert, (GERMANY, 854)
Steril Kabin	: Esco, (SINGAPORE, AC2-3E)
Spektrofotometre	: Shimadzu, (JAPAN, RC 232C)
Santrifuj	:Hettich, (GERMANY,EBA-20)
pH Metre	: Hanna, (PORTUGAL, HI 9321, SN 396202)
Vortex	: IKA, (U.S.A., MS2)

3.1.5. Stok çözeltiler ve besi ortamları

3.1.5.a. Maya delesyon testinde kullanılan stok çözeltiler ve besi ortamları

Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPAD) besiyeri: Test suşunun canlandırılması amacıyla kullanılmıştır.

İçerik	600 ml
Distile su	600 ml
Fluka Yeast Extract-Peptone-Dekstroz	42 g

Bu besiyerinin hazırlanışında 42 g Yeast Extract-Peptone-Dekstroz 600 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülmüştür.

Amino asit çözeltileri

Bu çözeltiler mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılacak besiyerlerine uygun miktarlarda ilave edilmiştir.

L- arjinin	0,6 g
Homoserin	3 g
L-lizin	0,9 g
10 'ar ml ddH_2O da	
L-triptofan	1,2 g
L- fenilalalnin	1,5 g
L-metiyonin	0,6 g
L-izolösin	0,9 g
L-valin	4,5 g
L- lösin	0,9 g
L-histidin – HCI	0,6 g

Her bir amino asit yukarıda belirtilen miktarlarda 100 'er ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. Bu işlemden sonra 20 ml'lik hacimlerde cam deney tüplerine aktarılarak +4°C'de saklanmıştır.

Sentetik tamamlayıcı besiyeri (Synthetic complete): Bu besiyeri test suşunun canlandırılması, tek koloni eldesi ve % yaşam oranının tespiti için kullanılmıştır.

İçerik	600 ml için
Distile su	583 ml
Amino asitsiz azot kaynağı	4 g
Dekstroz	12 g
Agar	10 g
L- arjinin	235 µl
Homoserin	235 µl
L-lizin	235 µl
L-triptofan	2340 µl
L- fenilalalnin	2340 µl
L-metiyonin	2340 µl
L-izolösin	2340 µl
L-valin	2340 µl
L- lösin	2340 µl
L-histidin – HCI	2340 µl
L-tirozin	21 mg
Urasil	14 mg
L- adein hemisülfat	21 mg

Bu besiyerinin hazırlanışında 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 10 g Agar, 12 g glukoz, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalnin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösin, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adein hemisülfat kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 583 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülmüştür.

Lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri (Synthetic complete – leu): Test suşunun lösin amino asidinin sentezinden sorumlu gen bölgesini taşıdığını doğrulamak için kullanılmıştır.

İçerik	600 ml için
Distile su	581 ml
Amino asitsiz azot kaynağı	4 g
Dekstroz	12 g
Agar	10 g
L- arjinin	235 µl
Homoserin	235 µl
L-lizin	235 µl
L-triptofan	2340 µl
L-fenilalalnin	2340 µl
L-metiyonin	2340 µl
L-izolösin	2340 µl
L-valin	2340 µl
L-histidin – HCI	2340 µl
L-tirozin	21 mg
Urasil	14 mg
L- adein hemisülfat	21 mg

Bu besiyerinin hazırlanışında 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 12 g glukoz, 10 g Agar, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalnin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösin, 2340 µl L-histidin – HCI, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adein hemisülfat 583 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülmüştür.

Lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri (Liquid Syntetic complate – leu): Test suşunun lüsin amino asdinin sentezinden sorumlu gen bölgesini taşıyan suşun uygulama için çoğaltılmasında kullanılmıştır.

Bu besiyerinin lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyerinden farkı agar katılmadan hazırlanmış olmasıdır. 250 ml'lik hacimlerde vidalı kapaklı cam şişelere aktarılan bu besiyeri 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Histidinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri (Syntetic complate – his) : Test suşunun histidin amino asit gen bölgesinin pozitif mutajenle kırıldığını tespit etmek amacıyla kullanılmıştır.

İçerik	600 ml için
Distile su	581 ml
Amino asitsiz azot kaynağı	4 g
Dekstroz	12 g
Agar	10 g
L-arjinin	235 µl
Homoserin	235 µl
L-lizin	235 µl
L-triptofan	2340 µl
L-fenilalalnin	2340 µl
L-metiyonin	2340 µl
L-izolösin	2340 µl
L-valin	2340 µl
L-lösin	2340 µl
L-tirozin	21 mg
Urasil	14 mg
L-adein hemisülfat	21 mg

Bu besiyerinin hazırlanışında 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 12 g glukoz, 10 g Agar, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalnin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösin, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L- adein hemisülfat 581 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülmüştür.

Adeninsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri (Syntetic complate – ade):

Test suşunun adenin bazının sentezinden sorumlu gen bölgesini taşıdığını doğrulamak için kullanılmıştır.

İçerik	600 ml için
Distile su	583 ml
Amino asitsiz azot kaynağı	4 g
Dekstroz	12 g
Agar	10 g
L- arjinin	235 µl
Homoserin	235 µl
L-lizin	235 µl
L-triptofan	2340 µl
L-fenilalalnin	2340 µl
L-metiyonin	2340 µl
L-izolösin	2340 µl
L-valin	2340 µl
L-lösin	2340 µl
L-histidin – HCI	2340 µl
L-tirozin	21 mg
Urasil	14 mg

Bu besiyerinin hazırlanışında 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 12 g glukoz, 10 g Agar, 235 µl L- arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalnin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösin, 2340 µl L-histidin – HCI, 21 mg L-tirozin ve 14 mg urasil 583 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülmüştür.

Top (üst) agar: Bu çözelti etken maddelerin *S. cerevisiae* suşuyla yapılan mutajenite ve antimutajenite deneylerinde uygulanan test materyalinin ve diğer kimyasalların homojen olarak etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Distile su	900 ml
Agar	6 g
Sodyum klorit (NaCl)	6 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 6 g agar ve 6 g NaCl 900 ml distile su içerisine katılmıştır ve oluşan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilip ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Deneyde kullanılmadan önce çözelti, mikrodalga fırında çözülmüş ve uygulama yapılmıştır.

3.1.5.b. Ames/*Salmonella* testinde kullanılan stok çözeltiler ve besi ortamları

Vogel-Bonner (VB tuzları) medyum E (50X): Minimal glukoz agar (bottom = alt agar) besi yerlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Magnezyum sülfat ($MgSO_4$)	8,7 g
Amonyum sodyum fosfat dibasic tetrahidrat ($NaNH_4HPO_4$ +	75 g

$4H_2O$)	
Potasyum fostaf dibasic (K_2HPO_4)	500 g
Sitrik asit monohidrat ($HOC(COOH)(CH_2COOH)_2+H_2O$)	100 g

Bu çözeltinin hazırlanışında yukarıda belirtilen maddeler, önceden sıcaklığı 50°C'ye ayarlanmış olan 650 ml distile su içerisine sırasıyla eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünmesi sağlanan bir maddenin ardından diğerinin eklenmesi suretiyle hazırlanan çözeltinin son hacmi, distile su eklenerek 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlemden sonra 20 ml'lik hacimlerde cam deney tüplerine aktarılan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir ve karanlıkta oda ısısında saklanmıştır.

%10'luk D-glukoz çözeltisi: Minimal glukoz agar (bottom = alt agar) besi yerlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
D-glukoz (Dekstroz)	100 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 100 g D-glukoz 700 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüş ve son hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlemden sonra 50 ml'lik hacimlerde cam şişelere aktarılan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilerek ve +4°C'de saklanmıştır.

Minimal glukoz agar: Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde temel alt (bottom) besi yeri olarak kullanılmıştır. Ayrıca bu besiyeri modifiye edilerek, test organizmalarının biyotin, histidin ve triptofan oksotrofilerini araştırmak için de kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Agar	15 g
Vogel-Bonner (VB tuzları) medyum E (50X)	20 ml
%10'luk D-glukoz çözeltisi	50 ml

Bu besiyerinin hazırlanışında 15 g agar 930 ml distile su içerisine katılmış ve oluşan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu işlemin ardından, sıcaklığı 45-65°C'ye kadar düşürülmüş olan çözeltiye daha önceden steril edilmiş Vogel-Bonner (VB tuzları) medyum E (50X) ve %10'luk D-glukoz çözeltisi eklenerek steril kabin içerisinde hafifçe çalkalamak suretiyle iyice karışması sağlanmıştır. Çözelti uygun dökme ısısına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülmüştür.

Histidin/Biyotin çözeltili top agar: *S. typhimurium* suşlarıyla yapılan mutajenite ve antimutajenite deneylerinde uygulanan test materyalinin, test bakterilerinin ve diğer kimyasalların homojen olarak etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Agar	6 g
Sodyum klorür (NaCl)	6 g
0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi	100 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında 6 g agar ve 6 g NaCl 900 ml distile su içerisine katılmış ve oluşan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilerek oda sıcaklığında saklanmıştır. Deneyde kullanılmadan önce çözelti, mikrodalga fırında çözülerek içerisine 100 ml 0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi eklenmiştir.

0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi: Bu çözelti *S. typhimurium* suşları ile yapılan mutajenite ve antimutajenite deneylerinde; histidin ve biyotin oksotrofu olan test

bakterilerinin birkaç kez bölünmesine olanak sağlayarak, bu bakterileri mutajen ve antimutajen ajanlara karşı daha hassas kılmak amacıyla kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
D-Biyotin	124 mg
L-Histidin	96 mg

Bu çözeltinin hazırlanışında yukarıdaki maddeler kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. 0,22 µM membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır.

0,1 mM Sodyum fosfat tamponu (pH: 7,4): Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde reaksiyon ortamının pH dengesini sağlamak, test materyali, mutajen ve bakteri hücreleri arasındaki etkileşimi kolaylaştırmak amacıyla kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
A Çözeltisi: 1000 ml distile su içerisinde 11,9 g sodyum fosfat monobasic (NaH_2PO_4) çözülmesiyle hazırlanmıştır.	120 ml
B Çözeltisi: 1000 ml distile su içerisinde 12,6 g sodyum fosfat dibasic (Na_2HPO_4) çözülmesiyle hazırlanmıştır.	880 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında A ve B çözeltileri yukarıda belirtilen miktarlarda karıştırılarak gerektiğinde ortama A veya B çözeltisi ilave edilerek pH: 7,4 değerine ayarlanmıştır. Bu işlemin ardından 20 ml'lik hacimlerde cam deney tüplerine aktarılan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve karanlıkta oda ısısında saklanmıştır.

Nutrient broth: Test bakterilerinin canlandırılması ve gecelik kültürlerinin hazırlanması amacıyla kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Oxoid nutrient broth No: 2	25 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 23 g Nutrient broth 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 10 ml'lik hacimlerde cam tüplere aktarıldıktan sonra 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır.

Nutrient agar: Canlandırılan test bakterilerinden tek kolonilerin elde edilmesi ve *S. typhimurium* mutant bakterilerinin *rfa* ve *uvrB* mutasyonlarının genetik kontrolü için kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Difco nutrient agar	23 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 28 g Nutrient agar 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülmüştür.

%0,1'lik Kristal viyole çözeltisi: *rfa* mutasyonu taşıyan mutant *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

İçerik	100 ml için
Kristal viyole	100 mg

Bu çözelti 100 mg kristal viyolenin 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti ışık geçirmeyen şişelere konularak +4°C'de saklanmıştır.

%0,01'lik Biyotin çözeltisi: Biyotin oksotrofu olan *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

İçerik	100 ml için
D-Biyotin	10 mg

Bu çözelti 10 mg D-biyotinin 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti 0,22 μM membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır.

%0,5'lik Histidin çözeltisi: Histidin oksotrofu olan *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

İçerik	100 ml için
L-Histidin	500 mg

Bu çözelti 500 mg L-histidinin kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada kullanılan mutant organizmaların genetik özelliklerinin kontrolü

3.2.1.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun genetik özelliklerinin kontrolü

Histidin gereksinimi

Bu test, maya delesyon test sisteminde kullanılan *S. cerevisiae* RS112 mutant maya suşunun, histidin oksotrofu olduğunun gösterilmesi amacıyla yapılmıştır. 1 gecelik kültürleri hazırlanan mayalar, 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 10 g agar, 12 g glukoz, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalnin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösin, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adenin hemisülfat 581 ml distile su içerikli, histidinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri ile tüm amino asitleri içeren sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri içeren petrilere ekilmiş ve 30°C'de 2-3 gün inkübasyonun ardından bu petrilerdeki üreme durumu kontrol edilmiştir. Deney örneklerinden sadece sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üreme görülmesi, kullanılan test suşunun histidin oksotrofu olduğunu göstermiştir.

Lösin gereksinimi

Uygulamalarda kullanılan, mutant maya suşunun, lösin oksotrofu olduğunun göstermek amacıyla yapılan bu testte; 1 gecelik kültürleri hazırlanan mayalar, 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 10 g agar, 12 g glukoz, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalnin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-histidin – HCI, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adein hemisülfat 581 ml distile su içerikli, lösinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri ile tüm amino asitleri içeren sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri içeren petrilere ekilmiş ve 30°C'de 2-3 gün inkübasyonun ardından bu petrilerdeki üreme durumu kontrol edilmiştir. Deney örneklerinden sadece sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üreme görülmesi, kullanılan test suşunun lösin oksotrofu olduğunu göstermiştir.

Adenin gereksinimi

Aynı mutant maya suşunun, adenin oksotrofu olduğunun gösterilmesi amacıyla yapılan bu testte; gecelik kültürleri hazırlanan mayalar, 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 10 g agar, 12 g glukoz, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalnin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-histidin – HCI, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 2340 µl L-lösin, 583 ml distile su içerikli, adeninsiz sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri ile tüm amino asitleri içeren sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri içeren petrilere ekilmiş ve 30°C'de 2-3 gün inkübasyonun ardından bu petrilerdeki üreme durumu kontrol edilmiştir. Deney örneklerinden sadece sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üreme görülmesi, kullanılan test suşunun adenin oksotrofu olduğunu göstermiştir.

3.2.1.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının genetik özelliklerinin kontrolü

Histidin/Biyotin gereksinimi

Bu test, Ames deneylerinde kullanılan *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşunun histidin ve biyotin oksotrofu olduklarının gösterilmesi amacıyla yapılmıştır. Gecelik kültürleri hazırlanan bakteriler minimal glukoz agar, histidinli minimal glukoz agar (1000 ml MGA+8 ml %0,5'lik Histidin çözeltisi), biyotinli minimal glukoz agar (1000 ml MGA+8 ml %0,01'lik Biyotin çözeltisi) ve histidin/biyotinli minimal glukoz agar (1000 ml MGA+8 ml %0,5'lik Histidin çözeltisi+8 ml %0,01'lik Biyotin çözeltisi) içeren petrilere ekilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından petrilerdeki üreme durumu kontrol edilmiştir. Deney örneklerinden sadece histidin/biyotinli minimal glukoz agar petrilerinde üreme görülmesi, kullanılan test bakterilerinin histidin/biyotin oksotrofu olduğunu göstermiştir.

uvrB mutasyonları

Bu testte kullanılan *S. typhimurium* suşlar *uvrB* mutasyonu taşımaktadır. Bu mutasyonun varlığı ultra viyole ışınlara duyarlılık testi ile ölçülmüştür. Bu testte, gecelik kültürleri hazırlanan bakteriler nutrient agar besi yeri içeren petrilere tüm yüzeye yayılacak şekilde ekilmiştir. Steril kabin içerisinde kapakları açılan petrilerin %50'lik kısımları U.V. ışınlarına karşı geçirgen olmayan alüminyum folyo ile kaplanmış ve bu haldeki petriler 30 watt gücündeki U.V. lambası altında 10 saniye boyunca ışınlara maruz bırakılmıştr. Bu işlemin ardından kapakları yeniden kapatılan petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve daha sonra bakterilerin üreme durumları kontrol edilmiştir. U.V. ışınlarına maruz kalan bölgede üreme olmamasına karşın, alüminyum folyo ile kapatılan bölgelerde üremenin görülmesi test bakterilerinin *uvrB* mutasyonlarını taşıdıklarını göstermiştir.

rfa mutasyonu

Bu test, Ames deneylerinde kullanılan *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşunun *rfa* mutasyonu taşıdıklarının gösterilmesi amacıyla yapılmıştır. Bu testte, gecelik kültürleri hazırlanan bakteriler nutrient agar besi yeri içeren petrilere tüm yüzeye yayılacak şekilde ekilmiştir. Aynı zamanda filtre kağıdından diskler hazırlanmış ve her bir diske 10 µl %0,1'lik kristal viyole çözeltisi emdirilmiştir. Daha sonra bu diskler petrilerin ortalarına yerleştirilmiş ve petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda disklerin etrafında görülen bakteri üremesi olmayan şeffaf alan test bakterilerinin *rfa* mutasyonu taşıdığını göstermiştir.

3.2.2. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi

3.2.2.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi

Test suşunun, histidinsiz ortamda üreyebilmesine yol açan spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden geri dönen koloni sayıları, yaptığımız tüm çalışmalarda sürekli olarak ölçülmüş ve her uygulama sonucu için ± geriye dönen maya sayısı olarak ifade edilmiştir. Bu çalışmalarda, lösinsiz sentetik tamalayıcı besiyerinde canlandırılıp gecelik kültürü hazırlanan mutant maya hücrelerinin 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler sonrasında 0,1-0,2 değerlerine sahip kültürlerden 100 µl alınarak içerisinde 4900 µl lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri olan deney tüplerine aktarılmıştır. Hazırlanan bu yeni kültürler, preinkübasyon süreci adı altında 30^{o}C sıcaklık ve 250 rpm çalkalama hızında 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından 5000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenen kültürlerin süpernatant kısımları atılırak ve geriye kalan pelet 5 ml steril saf suda yıkanmıştır. Bu işlemin 3 kez tekrarlanması ile önceki besiyerinden tamamen arındırılan maya hücreleri 5 ml saf su içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Bu süspansiyon içerisinden alınan 100 µl hacimli maya örneği 45 ^{o}C sıcaklığındaki 2 ml hacimli top agar (0,6 g Agar+0,6 g NaCl+100 ml distile su) içerisinde homojen olarak yayılmış ve histidinsiz sentetik tamamlayıcı agar besiyeri içeren petriler üzerine uygulanmıştır. Bu işlemin ardından, hazırlanan petriler 30^{o}C'de 2-3 gün inkübe edilerek ve sürenin sonunda kendiliğinden geriye dönen kolonilerin sayımı yapılmıştır (Brennan and Schiestl 2004).

3.2.2.b. *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi

Kültürlerin canlandırılması esnasında çok düşük oranlarda kendiliğinden meydana gelen mutasyonlar (spontan mutasyon) kültür içerisindeki bazı bakterilerin oksotrof formdan (*S. typhimurium* için his^{-},) prototrof forma (*S. typhimurium* için his^{+}) dönüşmesine

neden olabilmektedir (Mortelmans and Zeiger 2000). Bu nedenle mutajenite ve antimutajenite çalışmalarından elde edilen sonuçlarda meydana gelebilecek sapmaların önlenmesi için her deneyden önce kullanılan çalışma kültürlerindeki kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi gerekmektedir. Bunu sağlamak amacıyla 45 °C sıcaklığında 2 ml eritilmiş histidin/biyotin çözeltili top agar içeren deney tüplerinin her birine gecelik bakteri kültürlerinden ($O.D_{540}$ – 0,1-0,2) 100 µl ilave edilerek ve iyice karıştırıldıktan sonra minimal glukoz agar petrilerine dökülmüştür. Karışımın petri yüzeyine iyice yayılması sağlandıktan sonra petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından petrilerde gelişen kolonilerin sayılmasıyla her bir bakteri suşu için "kendiliğinden geri dönen koloni sayısı" belirlenmiştir.

3.2.3. Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

3.2.3.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun pozitif mutajenlerinin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

Maya delesyon test sistemi ile yapılan çalışmalarda *S. cerevisiae* RS112 mutant maya suşu için etil metan sülfonat ve acridine maddeleri pozitif mutajenler olarak kullanılmıştır. Bu deneylerden elde edilecek sonuçların sağlıklı değerlendirilebilmesi için çeşitli konsantrasyonlardaki pozitif mutajen uygulamalarından sonra maya hücreleri sentetik tamamlayıcı besiyerlerine ekilmiş ve 2-3 gün boyunca 30 C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme süresinin sonunda besiyerlerinin yüzeyinde oluşan maya kolonilerinin sayılması ve kontrol grupları ile kıyaslanmaları sonucunda çeşitli mutajen konsantrasyonlarına maruz kalmış maya hücrelerinin % yaşam oranları tespit edilerek her bir mutajen madde için uygun konsantrasyon belirlenmiştir. Bu testler sonucunda, istatistiksel açıdan önemli olan delesyon oranlarının gözlemlenebildiği % yaşam oranları seçilerek kullanılmıştır.

Ayrıca bu deney sitemi kullanılarak, etken maddeler ile yapılacak mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında bu maddelerin uygun test konsantrasyonlarının belirlenmesi için kullanılan etken maddelerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi gerekir. Sitotoksik etki belirlemede çeşitli etken madde konsantrasyonları ile muamele edilen maya test suşu sentetik tamamlayıcı besiyerinde 30 °C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Deney ve kontrol gruplarında gelişen kolonilerin sayılması ve birbiri ile kıyaslanması sonucunda test materyalinin uygulanan konsantrasyonunun çalışılan maya suşu üzerine olan sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Testler sonucunda, istatistiksel açıdan önemli olan delesyon oranlarının gözlemlenmediği % yaşam oranları seçilerek kullanılmıştır (Brennan and Schiestl 2004).

3.2.3.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının pozitif mutajenlerinin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşları için pozitif mutajenler olarak sırasıyla NaN_3 ve 9-AA maddeleri kullanılmıştır. Yapılan mutajenite ve antimutajenite deneylerinden elde edilecek sonuçların sağlıklı değerlendirilebilmesi için pozitif mutajen uygulamalarından 48 saat sonra bu petrilerde 300-700 geri dönen koloni gözlenmesi gerekmektedir. Belirtilen miktarda etkiye sahip pozitif mutajen konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla çeşitli yoğunluklada mutajen çözeltileri hazırlanmış ve test bakterileri üzerine uygulanmış ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından kolonilerin sayılmasıyla her bir mutajen madde için uygun konsantrasyon belirlenmiştir. Ayrıca mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılmadan önce etken maddelerin de test mikroorganizmaları üzerine olan sitotoksik etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Sitotoksik etki belirlemede çeşitli etken madde konsantrasyonları ile muamele edilen test bakterileri NA da 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deney ve kontrol gruplarında gelişen kolonilerin sayılması ve birbiri ile kıyaslanması sonucunda test materyalinin uygulanan konsantrasyonunun çalışılan bakteriler üzerine olan sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Negatif kontroldeki koloni sayısının %80'inden daha az koloni

gelişmesine olanak sağlayan test maddesi konsantrasyonları sitotoksik olarak tanımlanmış ve çalışmalarda kullanılmamıştır (Edenharder and Grünhage 2003).

3.2.4. Test suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerin hazırlanması

3.2.4. a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun test suşunun saklanması ve gecelik kültürlerin hazırlanması

S. cerevisiae RS112 test suşunun uzun süreli saklanması -87^{o}C'yapılmaktadır. Genetik işareti doğrulanan test suşu, lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri ortamda ml'sinde 1 × 10^{7}maya bulunacak şekilde çoğaltılmıştır. (540 nm absorbans da 0,1) Maya kültürüne, kültürün her ml'si için 0,09 ml olacak şekilde (spektrofotometrik saflıkta) gliserol ilave edilerek ve yavaşça karıştırılmıştır. Ependorf tüplere 1'er ml dağıtılmıştır. Tüpler hemen kuru buz içerisine yerleştirilerek ~ 30dk bekletildikten sonra -87^{o}C'lik derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Test suşu, bu şekilde uzun süre saklanabilmektedir. Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılacak olan gecelik kültürler -87°C'deki stoklardan hazırlanmıştır. Bu işlem oda sıcaklığında çözülmüş olan stok kültürün lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri içerisinde 30°C'de 250 rpm hızda yaklaşık bir gece (11-14 saat) çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından inkübatörden çıkarılan kültürler deney zamanına kadar oda ısısında bekletilmiştir.

3.2.4. b. S. *typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerin hazırlanması

S. typhimurium mutant bakteri suşları uzun süre kullanımları için -87°C'de saklanmıştır. Genetik özellikleri doğrulanan bakteriler nutrient broth besiyerinde 1-2 X 10^{9} bakteri/ml ($O.D_{540}$ – 0,1-0,2) yoğunluk olacak şekilde geliştirilmiştir. Daha sonra ortama son konsantrasyonu %10 olacak şekilde gliserol eklenerek ve iyice karışması sağlanmıştır. Kültür 1 ml hacimlerde bölünerek steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Bu tüpler

kuru buz içerisinde dondurulduktan sonra -87°C'de saklanmıştır. Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılacak olan gecelik kültürler -87°C'deki stoklardan hazırlanmıştır. Bu işlem oda sıcaklığında çözülmüş olan stok kültürün nutrient broth besiyeri içerisine inoküle edilmesiyle yapılmıştır. İnokülasyonun ardından taze kültürler oda ısısında karanlıkta 4 saat bekletilmiştir. Daha sonra 37 °C'de 120 rpm hızda yaklaşık bir gece (11-14 saat) çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından inkübatörden çıkarılan kültürler deney zamanına kadar oda ısısında karanlıkta bekletilmiştir.

3.2.5. Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kulanılan mikroorganizmaların uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

3.2.5.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun uygulama konsantrasyonunun belirlenmesi

Mutajenite ve antimutajnite çalışmalarında ön hazırlık niteliği taşıyan, maya uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi için, önce YPAD besiyerinde canlandırılıp sonra lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyerinde çoğaltılan maya suşu gecelik kültürlerin hazırlanması için 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılır. Bu ölçümler sonrasında 0,1-0,2 değerlerine sahip kültürlerden 100 µl alınarak içerisinde 4900 µl lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri olan deney tüplerine aktarılır. Hazırlanan bu yeni kültürler, preinkübasyon süreci adı altında 30^{o}C sıcaklık ve 250 rpm çalkalama hızında 16-18 saat inkübasyona bırakılır. Bu sürenin ardından 5000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenen kültürlerin süpernatant kısımları atılır ve geriye kalan pelet 5 ml steril saf suda yıkanır. Bu işlemin 3 kez tekrarlanması ile önceki besiyerinden tamamen arındırılan maya hücreleri 5 ml saf su içerisinde yeniden süspanse edilir. Daha sonra bu maya süspansiyondan mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılacak olan dilüsyonlar hazırlanır. Dilüsyonların hazırlanması için, maya süspansiyonundan 100 µl alınır ve 900 µl ddH_2O (deiyonize su) bulunan tüpler içerisine aktarılır. Bu işlemin seriler halinde tekralanması sonucunda maya süspansiyonunun 10^{-1}- 10^{-5} aralıklarındaki dilüsyonları hazırlanır. Hazırlanan bu dilüsyonların her biri; mutant maya hücrelerinin

% yaşam, kromozom içi rekombinasyon ve kromozomlar arası parça değişimi oranlarının belirlenmesi için sırasıyla sentetik tamamlayıcı agar, histidinsiz sentetik tamamlayıcı agar ve adeninsiz sentetik tamamlayıcı agar petrilerine ekilmiş ve 30^{o}C de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu deneylerde, maya dilüsyanlarından alınan 100 µl hacimli örneklerin her biri 45^{o}C sıcaklığındaki 2 ml top agar içerisinde homojen olarak yayılmış ve ilgili petrilere uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından her bir petrideki kolonilerin sayılmasıyla elde edilen sonuçlar değerlendirilerek çalışmalarda kullanılacak uygun dilisyonlar belirlenmiştir.

3.2.5.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

S. typhimurium TA1535 ve TA1537 suşlarının gecelik kültürülerinin, 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılarak, suşlarının uygulama konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.6. Mutajenite ve antimutajenite deneyleri

3.2.6.a. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun mutajenite ve antimutajenite deneyleri

M.longifolia elde edilen; Luteolin-7-*O*-glukozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Rozmarinik asit, Luteolin-7-*O*-glukuronit ve Apigenin-7-*O*- glukozit etken maddelerin, maya delesyon test sistemi kullanılarak yapılan mutajenite çalışmalarında, maya uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi için, önce YPAD besiyerinde canlandırılıp sonra lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyerinde çoğaltılan maya suşu gecelik kültürlerin hazırlanması için 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler sonrasında 0,1-0,2 değerlerine sahip kültürlerden 100 µl, 400 µl etken maddelerin çeşitli konsantrasyonları ve 4500 µl lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri olan deney tüplerine aktarılmıştır. Hazırlanan bu yeni kültürler, preinkübasyon

süreci adı altında 30^{o}C sıcaklık ve 250 rpm çalkalama hızında 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından 5000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenen kültürlerin süpernatant kısımları atılarak ve geriye kalan pelet 5 ml steril saf suda yıkanmıştır. Bu işlemin 3 kez tekrarlanması ile önceki besiyerinden tamamen arındırılan maya hücreleri 5 ml saf su içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Daha sonra bu maya süspansiyondan mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılacak olan dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dilüsyonların hazırlanması için, maya süspansiyonundan 100 µl alınarak ve 900 µl ddH_2O bulunan tüpler içerisine aktarılmıştır. Bu işlemin seriler halinde tekralanması sonucunda maya süspansiyonunun 10^{-1} 10^{-5}aralıklarındaki dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu dilüsyonların her biri; mutant maya hücrelerinin % yaşam, kromozom içi rekombinasyon ve kromozomlar arası parça değişimi oranlarının belirlenmesi için sırasıyla sentetik tamamlayıcı agar, histidinsiz sentetik tamamlayıcı agar ve adeninsiz sentetik tamamlayıcı agar petrilerine ekilmiş ve 30^{o}C de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu deneylerde, maya dilüsyanlarından alınan 100 µl hacimli örneklerin her biri 45^{o}C sıcaklığındaki 2 ml top agar (0,6 g Agar+0,6 g NaCl +100 ml distile su) içerisinde homojen olarak yayılmış ve ilgili petrilere uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından her bir petrideki kolonilerin sayılmasıyla elde edilen sonuçlar değerlendirilerek çalışmadarda kullanılacak uygun dilisyonlar belirlenmiştir. Yapılan optimizasyonla % yaşam oranının 10^{-4}, kromozom içi rekombinasyon ve kromozomlar arası parça değişimi oranlarının ise 10^{-1} dilisyonlarında en iyi hesaplanabildiği tespit edilmiştir.

3.2.6.b. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının mutajenite ve antimutajenite deneyleri

S. typhimurium mutant bakteri suşları ile yapılan mutajenite deneylerinde; 45 °C sıcaklığında 2 ml eritilmiş histidin/biyotin çözeltili top agar içeren deney tüplerine 50 µl test materyali, 500 µl sodyum fosfat tamponu (0,1 mM – pH 7,4), 100 µl gecelik bakteri kültürü ($O.D_{540}$ – 0,1-0,2) eklenmiş ve 3 saniye düşük hızda vorteks uygulanarak karışması sağlanmıştır. Hazırlanan bu karışım minimal glukoz agarlı petrilere dökülerek tüm yüzeye iyice yayılması sağlanmıştır. 37 °C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından bu

petrilerde oluşan koloniler sayılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Aynı bakteri suşları ile yapılan antimutajenite deneylerinde benzer şekilde 45°C sıcaklığında 2 ml eritilmiş histidin/biyotin çözeltili top agar içeren deney tüplerine 50 µl test materyali, 50 µl test suşuna spesifik mutajen madde çözeltisi, 500 µl sodyum fosfat tamponu (0,1 mM – pH 7,4), 100 µl gecelik bakteri kültürü ($O.D._{540}$ – 0,1-0,2) eklenmiş ve 3 saniye düşük hızda vortex uygulanarak karışması sağlanmıştır. Hazırlanan bu karışım minimal glukoz agarlı petrilere dökülerek tüm yüzeye iyice yayılması sağlanmıştır. 37°C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından bu petrilerde oluşan koloniler sayılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Yapılan tüm testlerde deney materyalinin minimal glukoz agarlı petrilerin yüzeylerine homojen olarak yayılması amacıyla karıştırma, dökme ve yayma işlemlerinin tümü 20 saniyeden daha az bir sürede yapılmıştır.

3.2.6. Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmamızda denemeler üç tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen sonuçların istatistiki önemleri SPSS 17,0 istatistik programı kullanılarak ANOVA ve Tukey testleri ile analiz edilmiştir. Maya delesyon ve Ames/*Salmonelle* test sistemleri kıllanılarak yapılan antimutajenite çalışmalarında % inhibisyon oranlarının hesaplanması için aşağdaki förmül kulanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left(1 - \frac{T}{M}\right) X\ 100$$

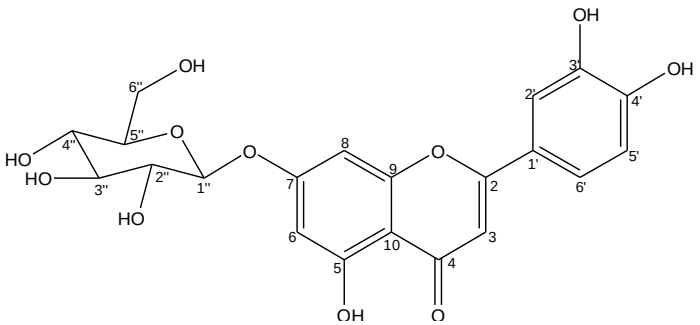
T : Mutajen ve test materyeli varlığında oluşan koloni sayısı (Deney grubu)
M : Sadece mutajen madde varlığında oluşan koloni sayısı (Pozitif kontrol)

Mutajenite çalışmalarıda ise test materyallerinin her bir konsantrasyonu için % mutasyon oranları negatif kontrol'e göre doza bağımlı olmak koşulu ile en az 2 kat artış görüldüğünde test materyalleri mutajenik olarak değerlendirilmiştir (Negi *et al.* 2003; Brennan and Schiestl 2004; Özbek 2006).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

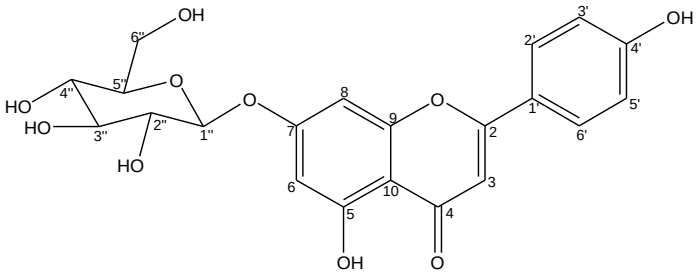
4.1. Mutajenik ve antimutajenik potansiyeli araştırılan etken maddeler

Çalışmamızda mutajenik ve antimutajenik potansiyelleri araştırılan etken maddeler *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden, Atatürk üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı tarafından izole edilip tarafımıza sağlanmıştır. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden izole edilen bileşiklerin moleküler ağırlıkları, açık ve kimyasal formülleri;



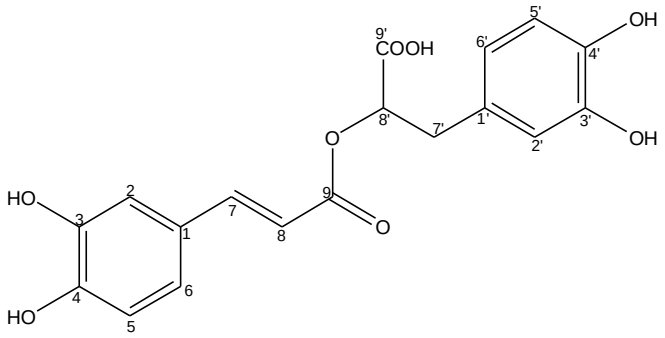
Luteolin-7-*O*-glikozit - $C_{21}H_{20}O_{11}$, M.A:448

Şekil 4.1. Luteolin-7-*O*-glikozit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı



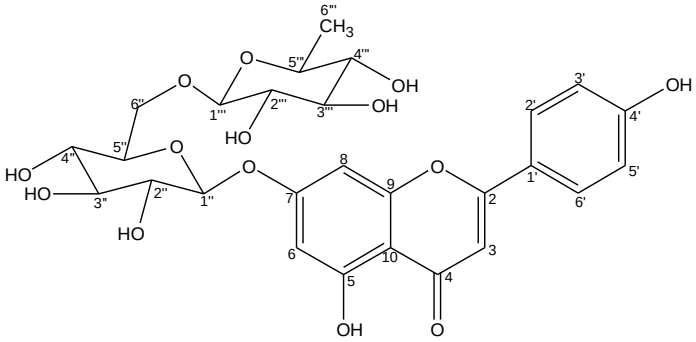
Apigenin-7-*O*-glikozit - $C_{21}H_{20}O_{10}$, M.A: 432

Şekil 4.2. Apigenin-7-*O*-glikozit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı



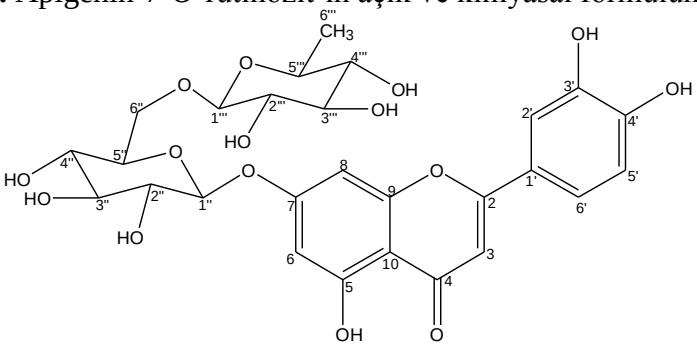
Rozmarinik asit - $C_{18}H_{16}O_8$, M.A:360

Şekil 4.3. Rozmarinik asit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı



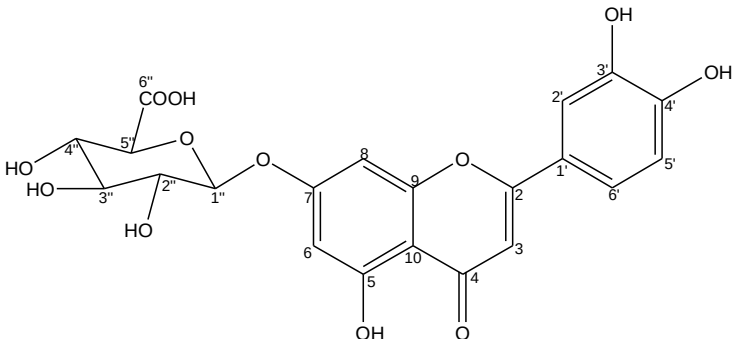
Apigenin-7-*O*-rutinozit - $C_{27}H_{30}O_{14}$, M.A:578

Şekil 4.4. Apigenin-7-*O*-rutinozit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı



Luteolin-7-*O*-rutinozit - $C_{27}H_{30}O_{15}$, M.A:594

Şekil 4.5. Luteolin-7-*O*-rutinozit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı



Luteolin-7-*O*-glukuronit - $C_{21}H_{18}O_{12}$, M.A: 462

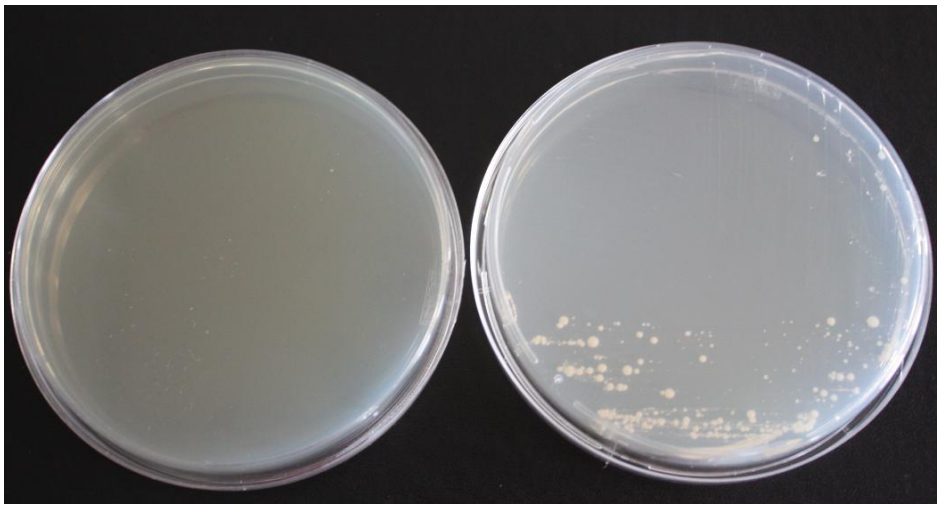
Şekil 4.6. Luteolin-7-*O*-glukuronit'in açık ve kimyasal förmülünü gösteren yapı

4.2. Çalışmada kullanılan mutant organizmaların genetik özelliklerinin kontrolü

4.2.1. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun genetik özelliklerinin kontrolü

4.2.1.a. Histidin gereksinimi

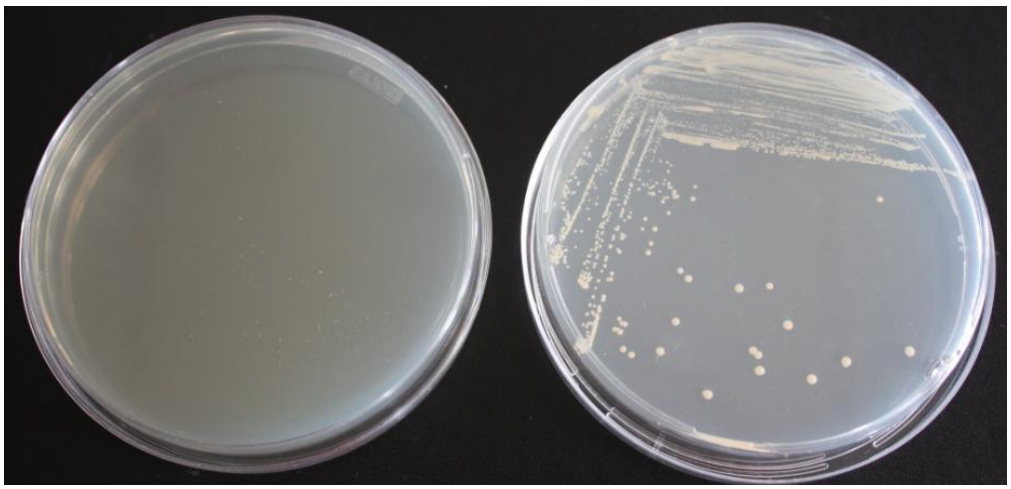
Çalışmamızda kullandığımız *S. cerevisiae* RS112 suşu histidinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üremiş, lösinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üretememiştir. Suşun his^- karakteri kontrol edilerek doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.7. *S. cerevisiae* RS112 suşunda histidin gereksinimin gösterilmesi

4.2.1.b. Lösin gereksinimi

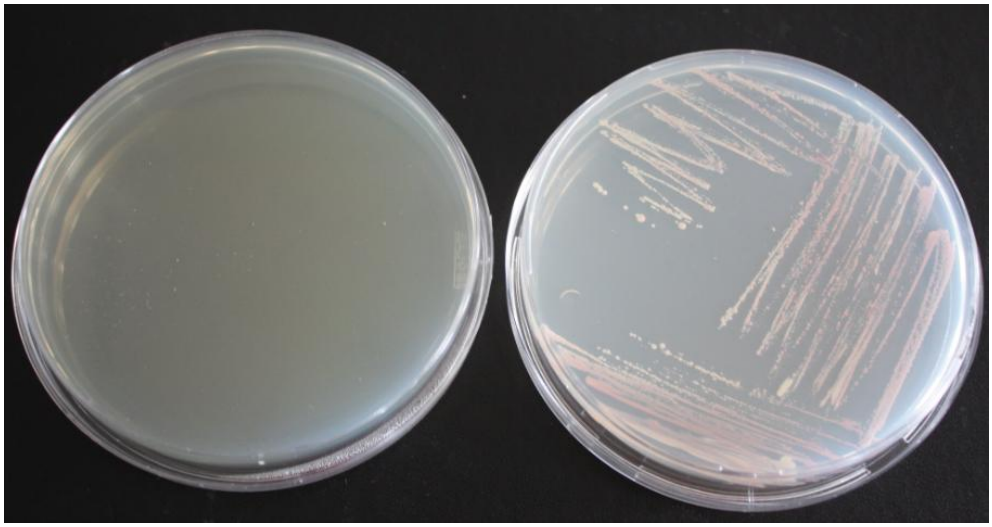
Çalışmamızda kullandığımız *S. cerevisiae* RS112 suşu sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üremiş, lösinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üremiştir. Suşun lös$^-$ karakteri kontrol edilerek doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.8. *S. cerevisiae* RS112 suşunda lösin gereksinimin gösterilmesi

4.2.1.c. Adenin gereksinimi

Çalışmamızda kullandığımız *S. cerevisiae* RS112 suşu sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üremiş, adeninsiz sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üremiştir. Suşların ade$^-$ karakteri kontrol edilerek doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.9)

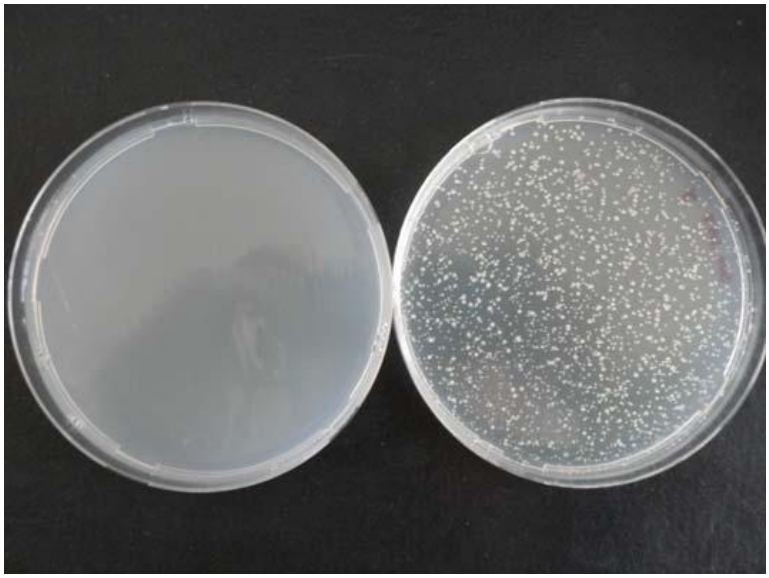


Şekil 4.9. *S. cerevisiae* RS112 suşunda adenin gereksinimin gösterilmesi

4.2.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının genetik özelliklerinin kontrolü

4.2.2.a. Histidin/Biyotin gereksinimi

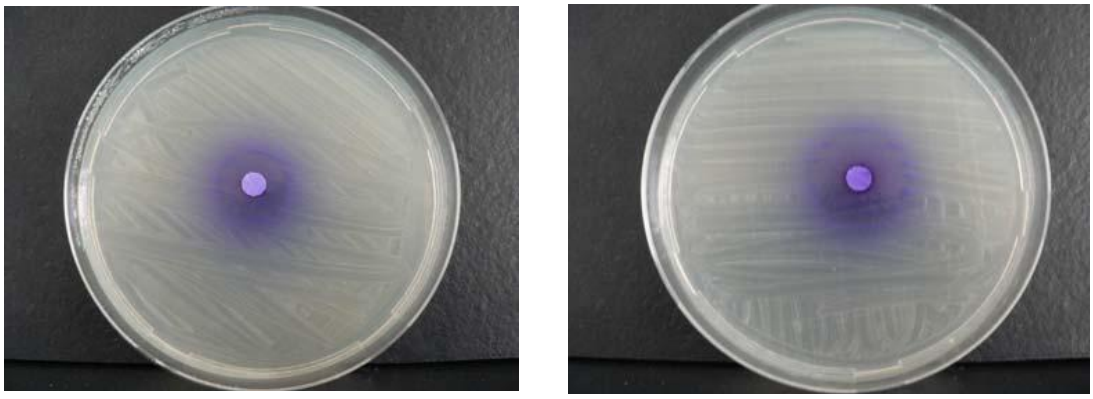
S. typhimurium TA1535 ve TA1537 suşları histidin\biyotin içeren minimal glukoz agarlı petrilerde üremiş, biyotin içeren histidinsiz minimal glukoz agarlı petrilerde üremediştir. Suşların his^- karakteri kontrol edilerek doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarında histidin gereksinimin gösterilmesi

4.2.2.b. *rfa* mutasyonun kontrolü

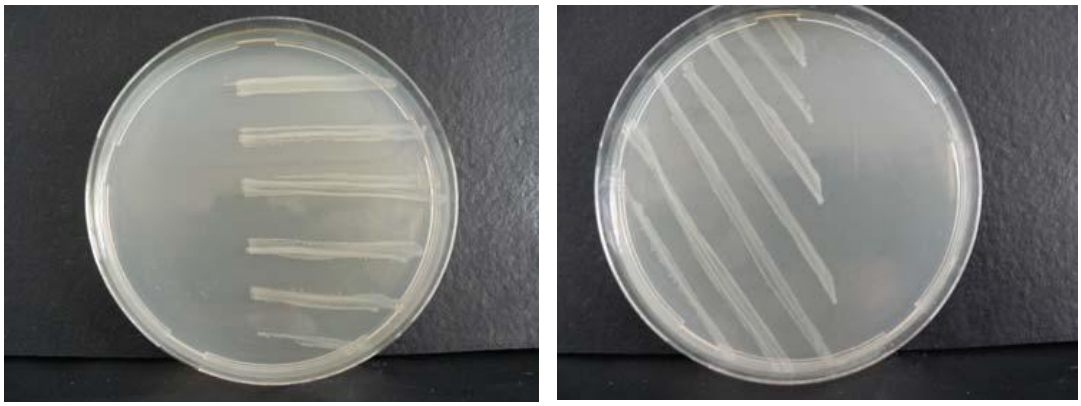
Nutrient agarlı besiyeri ortamında üretilen test suşlarının kristal viyole disklerinin çevresinde üremediği gözlenmiştir. Bu *rfa* mutasyonun varlığını doğrulamıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarında *rfa* mutasyonun gösterilmesi

4.2.2.c. *uvrB* mutasyonun kontrolü

Suşlar nutrient agarlı besiyerine ekildikten sonra petri kaplarının kapakları açılıp yarısı kapatılarak 30 wattlık U.V. lambası altında 10 saniye ışınlanmıştır. U.V. ışınına maruz kalan petrinin kapatılmayan kısmında üreme olmazken kapalı olan kısımda üreme gözlenmiştir. Test suşlarının *uvrB* mutasyonu taşıdıkları doğrulanmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının ultraviyole duyarlılık testi

4.3. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi

4.3.1. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi

S. cerevisiae RS112 suşunun histidinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde kendiliğinden geriye dönen his^+ revertantlar gözlenmiştir. Test suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları her denemede rutin olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Test suşunun kendiliğinden geri dönene koloni sayıları.

Saccharomyces cerevisiae mutant suşu	Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı*****
RS112	18,50± 04,52

***** ortalama değer ± standart hata

4.3.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi

Test bakterilerinin histidinsiz minimal glukoz agarlı petrilerde kendiliğinden geriye dönen his^+ revertantlar gözlendi.

Test suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları her denemede rutin olarak belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Mutant suşların kendiliğinden geri dönen koloni sayısı

Salmonella typhimurium mutant suşlar	Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı*****
TA1535	24,00 ± 02,34
TA1537	24,50 ± 02,06

***** ortalama değer ± standart hata

4.4. Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

4.4.1. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun pozitif mutajenlerinin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

S. cerevisiae RS112 suşu kullanılarak yapılan çalışmalarda pozitif mutajen olarak kullandığımız EMS ve akridin mayalar için toksik olmayan dozu belirlenmiştir. Elde

ettiğimiz verilere göre mutajenlerin 10 µg/ml EMS ve 15 µg/ml akridin dozlarında kullanılabileceği belirlenmiştir.

4.4.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının pozitif mutajenlerinin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

S. typhimurium TA1535 ve TA1537 suşları kullanılarak yapılan çalışmalarda pozitif mutajen olarak kullandığımız NaN_3 ve 9-AA bakteriler için toksik olmayan dozu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre mutajenlerin 1µg\petri NaN_3 ve ve 40µg\petri 9-AA dozlarında kullanılabileceği belirlenmiştir.

4.5. Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kulanılan mikroorganizmaların uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

4.5.1. Maya delesyon test sistemi/*S. cerevisiae* RS112 suşunun uygulama konsantrasyonunun belirlenmesi

Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılan mikroorganizmaların uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda; % yaşam oranı çalışmaları için 10^{-4}, kromozom içi rekombinasyon ve kromozomlar arası parça değişimi oranlarının araştırılması için de 10^{-1} dilisyonlarının uygun olduğu belirlenmiştir.

4.5.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

S. typhimurium TA1535 ve TA1537 suşlarının gecelik kültürlerinin 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılarak mutajenite ve antimutajenite çalışmaları için en uygun aralık 0,1-0,2 olarak belirlenmiştir.

4.6. Mutajenite ve antimutajenite deney sonuçları

4.6.1. Maya delesyon test sistemin/*S. cerevisiae* RS112 suşunun mutajenite ve antimutajenite deney sonuçları

M. longifolia bitkisinden izole edilen Luteolin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*-glukozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit ve Luteolin-7-*O*-glukuronit maddelerinin mutajenik ve antimutajenik etkilerinin saptanması için yapılan deneylerde bu maddelerin stok çözeltilerinin hazırlanmasında 1 mM konsantrasyonu kullanılmıştır.

Etken maddelerin mutajenik ve antimutajenik aktivitelerini belirlemek için *S. cerevisiae* RS112 suşu ile yapılan deneylerde her bir stok çözeltiden, 2µM/ml, 4µM/ml, 8µM/ml ve 16µM/ml olmak üzere dört ayrı doz uygulanmış ve bu denemeler en az üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar her bir etken madde için ayrı ayrı özetlenecek olursa; Luteolin-7-*O*-glikozit'in EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda 2µM/ml, 8µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %27.6, %38 ve %44.6 antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir, 4µM konsantrasyonunda ise EMS mutajen maddesinin etkisini artırmıştır. Luteolin-7-*O*-glikozit'in EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda ise 8µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %4,7, ve %2,3 antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. 2 µM ve 4µM konsantrasyonlarında ise akridin mutajen maddesinin etkisini artırmıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). Luteolin-7-*O*-glikozit'in akridin tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda 2µM/ml, 8µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %19,3, %38,5 ve %53,9 antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. Luteolin-7-*O*-glikozit'in akridin tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda ise 2µM/ml konsantrasyonunda etkisiz, 16µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %76,7 oranında antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. 4µM/ml ve 8µM/ml konsantrasyonlarında ise akridin mutajen maddesinin etkisini artırmıştır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3). Aynı deneyde Luteolin-7-*O*-glikozit'in

hiçbir konsantrasyonunda mutajenik aktiviteye rastlanmamıştır (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Apigenin-7-*O*-glikozit'in EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda 4µM/ml konsantrasyonunda %6,9 antimutajenik aktivite gösterdiği gözlenmiştir, 8µM konsantrasyonunda etkisiz; 2µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında EMS mutajen maddesinin etkisini artırmıştır. Apigenin-7-*O*-glikozit'in EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda ise 8µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %4 ve %40.9 antimutajenik aktivite gösterdikleri 2µM/ml ve 4µM/ml konsantrasyonlarında da EMS mutajen maddesinin etkisini artırdıkları gözlenmiştir (Çizelge 4.5. ve Şekil 4.5.). Apigenin-7-*O*-glikozit'in akridin tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda 2µM/ml ve 4µM/ml ve 8µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %29,8, %26,9 ve %26,2 antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. 16µM/ml konsantrasyonunda ise akridin mutajen maddesinin etkisini artırmıştır (Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6.). Aynı deneyde Apigenin-7-*O*-glikozit'in hiçbir konsantrasyonunda mutajenik aktiviteye rastlanmamıştır (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4).

Rosmarinik asit EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda 2µM/ml ve 4µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %37 ve %10 antimutajenik aktivite göstermiş, artan doza bağlı olarak 8µM/ml ve 16µM/ml EMS mutajenin mutajenik aktivitesini artırdıkları gözlemlenmiştir. Rosmarinik asit EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda ise 2µM/ml, 4µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %50, %20,4 ve %51,6 antimutajenik aktivite gözlemlenmiş, 8µM/ml konsantrasyonunda ise EMS mutajen maddesisnin aktivitesini artırdığı gözlemlenmiştir. (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8). Rosmarinik asit akridin tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda 2µM/ml 4µM/ml, 8µM/ml ve 16µM/ml tüm konsantrasyonlarında sırasıyla %63,3 ve %22,5, %22,5 ve %40,9 antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlemlenmiştir.

Rosmarinik asit akridin tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda ise 2µM/ml, 4µM/ml, 8µM/ml ve 16µM/ml tüm konsantrasyonlarında sırasıyla %13,4, %33,4 % 33,4 ve %33,4 antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlemlenmiştir (Çizelge

4.9 ve Şekil 4.9). Aynı deneyde Rosmarinik asidin 16µM/ml konsantrasyonu mutajenik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7).

Apigenin-7-*O*-rutinozit EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda delesyonda 2µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %1,9 ve %6,5 antimutajenik aktivite göstermiş, 4µM/ml ve 8µM/ml konsantrasyonlarında ise EMS mutajenin mutajenik aktivitesini artırdıkları gözlemlenmiştir. Apigenin-7-*O*-rutinozit EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda ise sadece 4µM/ml konsantrasyonunda %53,9 antimutajenik aktivite göstermiş, 8µM/ml konsantrasyonunda etkisiz, 2µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında ise EMS mutajenin mutajenik aktivitesini artırdıkları gözlemlenmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11). Apigenin-7-*O*-rutinozit akridin tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda delesyonda 2µM/ml, 4µM/ml 8µM ve 16µM/ml tüm konsantrasyonlarında sırasıyla %18,6, %42,3, %59,8 ve %53,7 antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlemlenmiştir. Apigenin-7-*O*-rutinozit akridin tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda ise 2µM/ml, 4µM/ml 8µM ve 16µM/ml tüm konsantrasyonlarında sırasıyla %12,5, %50, %75 ve %75 antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlemlenmiştir (Çizelge 4.12. Şekil 4.12.). Aynı deneyde Apigenin-7-*O*-rutinozit'in 16µM/ml konsantrasyonu mutajenik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10).

Luteolin-7-*O*-rutinozit'in EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda delesyonda 2µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında sırasıyla % 15,3 ve %50 antimutajenik aktiviteteleri gözlemlenmiş, 4µM/ml ve 8µM/ml konsantrasyonlarında ise EMS mutajeninin mutajenik aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Luteolin-7-*O*-rutinozit'in EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda 2µM/ml ve 4µM/ml konsantrasyonlarda sırasıyla %40,9 ve % 47 antimutajenik aktiviteteleri gözlemlenmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14). Luteolin-7-*O*-rutinozit'in akridin tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda delesyonda 2µM/ml, 4µM/ml, 8µM/ml ve 16µM/ml tüm konsantrasyonlarında sırasıyla %29,5, %35,3, %32,4 ve %23,6 antimutajenik aktiviteye raslanmıştır. Luteolin-7-*O*-rutinozit'in akridin tarafından

oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda 2µM/ml ve 4µM/ml konsantrasyonlarında etksiz, 8µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında ise sırasıyla %70 ve %40 antimutajenik aktiviteye raslanmıştır (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15). Luteolin-7-*O*-rutinozit'in hiçbir konsantrasyonu mutajenik aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13).

Luteolin-7-*O*-glukuronit'in EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda 2µM/ml, 4µM/ml, 8µM/ml ve 16µM/ml tüm konsantrasyonlarında artan doza bağlı olarak EMS mutajen maddesinin aktivitesini artırdıkları gözlenmiştir. Luteolin-7-*O*-glukuronit'in EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda 2µM/ml, 4µM/ml, 8µM/ml ve 16µM/ml tüm konsantrasyonlarında sırasıyla %67,5, %51,2, %65,2 ve %48,9 antimutajenik aktivite gözlemlenmiştir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.17). Luteolin-7-*O*-glukuronit'in akridin tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda sadece 2µM/ml konsantrasyonunda %62,2 antimutajenik aktivite gözlemlenirken; 4µM/ml, 8µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında akridin mutajen maddesinin aktivitesini artırdıkları gözlenmiştir. Luteolin-7-*O*-glukuronit'in akridin tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda 2µM/ml ve 8µM/ml konsantrasyonlarında srasıyla %36,4 ve %6,9 antimutajenik aktivite gözlemlenmiştir (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.18). Aynı deneyde Apigenin-7-*O*-rutinozit'in hiçbir konsantrasyonu mutajenik aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.16).

Çizelge 4.3. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları.

Luteolin-7-*O*-glukozit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	Mutasyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	Mutasyon
*Negatif Kontrol		%100 (318±00,91)	16±00,70		60±00,81	
**Pozitif kontrol (EMS)		% 63,2 (201±01,47)	29±01,08		85±01,08	
Mutajenite	Luteolin-7-*O*-glukozit (2 µM/ml)	% 102,5 (326±02.48)	14±00.81	-	39±01.08	-
	Luteolin-7-*O*-glukozit (4 µM/ml)	%126,4 (402±00,91)	16±01,47	-	55±00,40	-
	Luteolin-7-*O*-glukozit (8 µM/ml)	% 131,4 (418±03,36)	18±01,08	-	37±01,08	-
	Luteolin-7-*O*-glukozit (16 µM/ml)	% 107,2 (341±00,70)	18±01,22	-	40±02,27	-

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.4. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukozit etken maddesinin EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

Luteolin-7-*O*-glukozit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
*Negatif Kontrol		%100 (318±00,91)	16±00,70		60±00,81	
**Pozitif kontrol (EMS)		% 63,2 (201±01,47)	29±01,08		85±01,08	
Antimutajenite	Luteolin-7-*O*-glukozit (2 µM/ml)	% 87,4 (278±01,47)	21±01,08	27,6	94±02,04	komutajen
	Luteolin-7-*O*-glukozit (4 µM/ml)	% 61,6 (196±01,03)	45±00,70	komutajen	94±03,71	komutajen
	Luteolin-7-*O*-glukozit (8 µM/ml)	% 94,7 (310±01,82)	18±00,40	38	81±00,70	4,7
	Luteolin-7-*O*-glukozit (16 µM/ml)	% 86,7 (276 ±00,40)	16±01,08	44,6	83±01,08	2,3

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.5. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukozit etken maddesinin akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

Luteolin-7-*O*-glukozit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
*Negatif Kontrol		%100 (314±03,16)	28±00,40		25±00,91	
**Pozitif kontrol (Akridin)		% 57,9 (182±02,48)	52±02,48		30±01,83	
Antimutajenite	Luteolin-7-*O*-glukozit (2 µM/ml)	% 52,5 (165±02,64)	42±03,39	19,3	30±01,82	-
	Luteolin-7-*O*-glukozit (4 µM/ml)	% 52,8 (166±01,08)	66±01,82	kumutajen	32±00,70	komutajen
	Luteolin-7-*O*-glukozit (8 µM/ml)	% 72,9 (229±03,10)	32±00,70	38,5	102±01,68	komutajen
	Luteolin-7-*O*-glukozit (16 µM/ml)	% 66,3 (208 ±02,70)	24±02,68	53,9	7±00,41	76,7

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: Akridin (15 µg/ml)

Çizelge 4.6. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-glukozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları.

Apigenin-7-*O*-glukozit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	Mutasyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	Mutasyon
*Negatif Kontrol		%100 (312±01,22)	25±01,35		114±02,12	
**Pozitif kontrol (EMS)		% 79,8 (249±01,87)	43±01,78		122±01,35	
Mutajenite	Apigenin-7-*O*-glukozit (2 µM/ml)	% 102,2 (319±05,06)	29±01,58	-	79±00,41	-
	Apigenin-7-*O*-glukozit (4 µM/ml)	%88,4 (276±02,04)	27±01,68	-	85±02,18	-
	Apigenin-7-*O*-glukozit (8 µM/ml)	% 78,5 (245±02,12)	29±01,58	-	86±00,71	-
	Apigenin-7-*O*-glukozit (16 µM/ml)	% 89,4 (279±03,94)	27±01,68	-	110±01,78	-

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.7. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-glukozit etken maddesinin EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

	Apigenin-7-*O*-glukozit	% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
	*Negatif Kontrol	%100 (312±01,22)	25±01,35		114±02,12	
	**Pozitif kontrol (EMS)	% 79,8 (249±01,87)	43±01,78		122±01,35	
Antimutajenite	Apigenin-7-*O*-glukozit (2 µM/ml)	% 51,2 (160±01,19)	62±02,04	komutajen	157±02,16	komutajen
	Apigenin-7-*O*-glukozit (4 µM/ml)	% 52,8 (165±00,91)	40±01,29	6,9	152±01,08	komutajen
	Apigenin-7-*O*-glukozit (8 µM/ml)	% 44,5 (139±01,08)	43±01,47	-	117±00,70	4
	Apigenin-7-*O*-glukozit (16 µM/ml)	% 83 (259 ±00,40)	47±03,49	komutajen	72±03,23	40,9

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.8. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-glukozit etken maddesinin akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

Apigenin-7-*O*-glukozit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
*Negatif Kontrol		%100 (286±02,80)	84±02,25		64±01,83	
**Pozitif kontrol (Akridin)		% 53,4 (153±01,35)	134±01,83		104±03,11	
Antimutajenite	Apigenin-7-*O*-glukozit (2 µM/ml)	% 71,3 (204±02,35)	94±02,34	29,8	44±00,71	57,7
	Apigenin-7-*O*-glukozit (4 µM/ml)	% 63,2 (181±02,35)	98±02,48	26,9	56±00,70	46,2
	Apigenin-7-*O*-glukozit (8 µM/ml)	% 56,6 (162±01,47)	99±00,91	26,2	44±02,04	57,7
	Apigenin-7-*O*-glukozit (16 µM/ml)	% 37,1 (106±00,41)	145±01,96	komutajen	44±01,08	57,7

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: Akridin (15 µg/ml)

Çizelge 4.9. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Rozmarinik asit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları.

Rozmarinik asit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	Mutasyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	Mutasyon
*Negatif Kontrol		%100 (327±01,47)	62±01,71		50±02,35	
**Pozitif kontrol (EMS)		% 65,7 (215±01,47)	81±02,42		64±01,29	
Mtimutajenite	Rozmarinik asit (2 µM/ml)	% 109,5 (358±01,47)	43±02,04	-	49±02,97	-
	Rozmarinik asit (4 µM/ml)	%122,9 (402±01,08)	65±03,19	-	44±00,92	-
	Rozmarinik asit (8 µM/ml)	% 63,6 (208±04,96)	98±01,58	-	45±01,83	-
	Rozmarinik asit (16 µM/ml)	% 65,4 (214±01,47)	127±02,97	2 kat	93±01,96	2 kat

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.10. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Rozmarinik asit etken maddesinin EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

Rozmarinik asit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
*Negatif Kontrol		%100 (327±01,47)	62±01,71		50±02,35	
**Pozitif kontrol (EMS)		% 65,7 (215±01,47)	81±02,42		64±01,29	
Antimutajenite	Rozmarinik asit (2 µM/ml)	% 69,4 (227±01,83)	51±01,47	37	32±01,58	50
	Rozmarinik asit (4 µM/ml)	% 55 (180±05,77)	73±03,73	10	51±03,44	20,4
	Rozmarinik asit (8 µM/ml)	% 43,4 (142±01,96)	177±02,97	komutajen	71±02,29	komutajen
	Rozmarinik asit (16 µM/ml)	% 22,3 (73 ±04,56)	135±03,49	komutajen	31±02,12	51,6

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.11. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Rozmarinik asit etken maddesinin akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

Rozmarinik asit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
*Negatif Kontrol		%100 (209±01,47)	33±01,08		12±00,41	
**Pozitif kontrol (Akridin)		% 40,7 (85±01,58)	49±01,08		60±01,87	
Antimutajenite	Rozmarinik asit (2 µM/ml)	% 45,5 (95±01,83)	18±00,41	63,3	52±02,34	13,4
	Rozmarinik asit (4 µM/ml)	% 40,2 (84±04,17)	38±00,70	22,5	40±00,70	33,4
	Rozmarinik asit (8 µM/ml)	% 44 (92±01,83)	38±00,82	22,5	40±01,22	33,4
	Rozmarinik asit (16 µM/ml)	% 52,2 (109 ±02,09)	29±00,40	40,9	40±02,45	33,4

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: Akridin (15 µg/ml)

Çizelge 4.12. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları.

Apigenin-7-*O*-rutinozit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	Mutasyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	Mutasyon
*Negatif Kontrol		%100 (129±00,85)	52±02,68		9±00,92	
**Pozitif kontrol (EMS)		% 34,9 (45±01,47)	108±03,58		26±00,91	
Mtimutajenite	Apigenin-7-*O*-rutinozit (2 µM/ml)	% 42,6 (55±01,83)	49±02,12	-	16±01,29	-
	Apigenin-7-*O*-rutinozit (4 µM/ml)	% 42,6 (70±01,29)	50±01,78	-	15±00,91	-
	Apigenin-7-*O*-rutinozit (8 µM/ml)	% 34,9 (45±01,20)	52±01,35	-	20±01,58	-
	Apigenin-7-*O*-rutinozit (16 µM/ml)	% 13,2 (17±00,91)	39±01,33	-	61±02,12	6,7 kat

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.13. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

Apigenin-7-*O*-rutinozit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
*Negatif Kontrol		%100 (129±00,85)	52±02,68		9±00,92	
**Pozitif kontrol (EMS)		% 34,9 (45±01,47)	108±03,58		26±00,91	
Antimutajenite	Apigenin-7-*O*-rutinozit (2 µM/ml)	% 35,6 (46±02,38)	106±00,91	1,9	50±02,04	komutajen
	Apigenin-7-*O*-rutinozit (4 µM/ml)	% 34,1 (44±01,29)	167±03,76	komutajen	12±00,91	53,9
	Apigenin-7-*O*-rutinozit (8 µM/ml)	% 27,1 (35±01,83)	149±02,68	komutajen	26±01,58	-
	Apigenin-7-*O*-rutinozit (16 µM/ml)	% 8,5 (11 ±00,92)	101±02,12	6,5	44±01,29	komutajen

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.14. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

Apigenin-7-*O*-rutinozit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
*Negatif Kontrol		%100 (290±01,82)	82±03,28		12±00,41	
**Pozitif kontrol (Akridin)		% 51,7 (150±04,56)	97±00,91		32±01,08	
Antimutajenite	Apigenin-7-*O*-rutinozit (2 µM/ml)	% 65,5 (190±01,47)	79±01,29	18,6	28±00,40	12,5
	Apigenin-7-*O*-rutinozit (4 µM/ml)	% 58,6 (170±03,53)	56±03,03	42,3	16±00,41	50
	Apigenin-7-*O*-rutinozit (8 µM/ml)	% 60,3 (175±02,04)	39±00,41	59,8	8±00,00	75
	Apigenin-7-*O*-rutinozit (16 µM/ml)	% 14,5 (42 ±00,91)	45±01,82	53,7	8±00,40	75

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: Akridin (15 µg/ml)

Çizelge 4.15. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları.

	Luteolin-7-*O*-rutinozit	% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	Mutasyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	Mutasyon
[*]Negatif Kontrol		%100 (149±05,61)	39±01,58		40±01,77	
[**]Pozitif kontrol (EMS)		% 37,1 (59±02,08)	46±01,29		98±01,29	
Mtimutajenite	Luteolin-7-*O*-rutinozit (2 µM/ml)	% 21,4 (32±01,08)	40±01,58	-	168±00,90	-
	Luteolin-7-*O*-rutinozit (4 µM/ml)	% 33,5 (50±03,49)	39±01,08	-	135±01,81	-
	Luteolin-7-*O*-rutinozit (8 µM/ml)	% 87,9 (131±03,08)	26±00,91	-	29±00,91	-
	Luteolin-7-*O*-rutinozit (16 µM/ml)	% 20,8 (31±01,22)	11±00,41	-	33±01,29	-

[*]Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
[**]Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.16. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

	Luteolin-7-*O*-rutinozit	% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
	*Negatif Kontrol	%100 (149±05,61)	39±01,58		40±01,77	
	**Pozitif kontrol (EMS)	% 37,1 (59±02,08)	46±01,29		98±01,29	
Antimutajenite	Luteolin-7-*O*-rutinozit (2 µM/ml)	% 61,7 (92±00,40)	39±01,47	15,3	58±02,08	40,9
	Luteolin-7-*O*-rutinozit (4 µM/ml)	% 65,1 (97±03,90)	77±00,91	komutajen	52±01,58	47
	Luteolin-7-*O*-rutinozit (8 µM/ml)	% 14,1 (21±00,91)	56±01,47	komutajen	142±00,64	komutajen
	Luteolin-7-*O*-rutinozit (16 µM/ml)	% 3,4 (5 ±00,70)	23±01,35	50	114±03,39	komutajen

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.17. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

Luteolin-7-*O*-rutinozit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
*Negatif Kontrol		%100 (158±02,88)	22±02,27		6±01,08	
**Pozitif kontrol (Akridin)		% 67,7 (107±03,29)	34±01,83		10±01,47	
Antimutajenite	Luteolin-7-*O*-rutinozit (2 µM/ml)	% 94,3 (149±00,91)	24±01,08	29,5	10±00,40	-
	Luteolin-7-*O*-rutinozit (4 µM/ml)	% 98,1 (155±02,67)	22±01,08	35,3	10±01,29	-
	Luteolin-7-*O*-rutinozit (8 µM/ml)	% 85,4 (135±01,95)	23±01,09	32,4	3±00,41	70
	Luteolin-7-*O*-rutinozit (16 µM/ml)	% 62,6 (99 ±00,91)	26±01,08	23,6	6±00,41	40

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: Akridin (15 µg/ml)

Çizelge 4.18. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukuronit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları.

Luteolin-7-*O*-glukuronit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	Mutasyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	Mutasyon
*Negatif Kontrol		%100 (313±03,89)	40±01,96		30±01,83	
**Pozitif kontrol (EMS)		% 68,7 (215±01,10)	70±01,29		43±00,71	
Mtimutajenite	Luteolin-7-*O*-glukuronit (2 µM/ml)	% 101,6 (318±01,82)	45±00,91	-	21±00,90	-
	Luteolin-7-*O*-glukuronit (4 µM/ml)	% 99 (310±02,04)	41±01,22	-	2±00,40	-
	Luteolin-7-*O*-glukuronit (8 µM/ml)	% 97,8 (306±03,51)	42±01,83	-	16±00,71	-
	Luteolin-7-*O*-glukuronit (16 µM/ml)	% 69 (216±00,91)	61±01,29	-	9±00,41	-

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

Çizelge 4.19. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukuronit etken maddesinin EMS ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

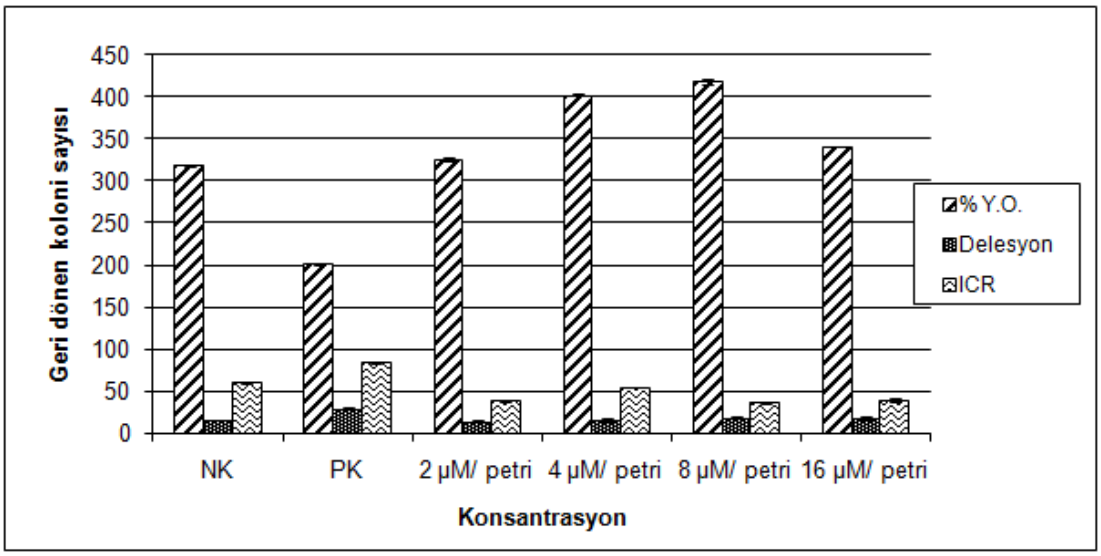
	Luteolin-7-*O*-glukuronit	% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
	*Negatif Kontrol	%100 (313±03,89)	40±01,96		30±01,83	
	**Pozitif kontrol (EMS)	% 68,7 (215±01,10)	70±01,29		43±00,71	
Antimutajenite	Luteolin-7-*O*-glukuronit (2 µM/ml)	% 62,6 (196±03,97)	87±01,95	komutajen	14±01,29	67,5
	Luteolin-7-*O*-glukuronit (4 µM/ml)	% 66,1 (207±01,68)	98±02,64	komutajen	21±01,47	51,2
	Luteolin-7-*O*-glukuronit (8 µM/ml)	% 81,5 (255±02,58)	96±02,27	komutajen	15±00,65	65,2
	Luteolin-7-*O*-glukuronit (16 µM/ml)	% 17,9 (56 ±00,91)	284±01,83	komutajen	22±02,41	48,9

*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: EMS (Etil metil sülfonat)(10 µg/ml)

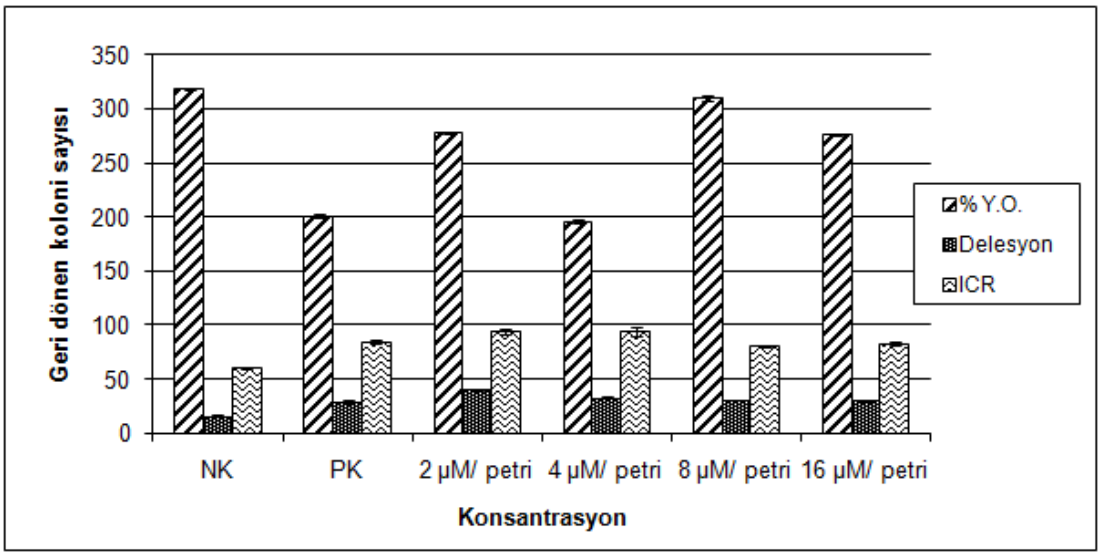
Çizelge 4.20. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukuronit etken maddesinin akridin ve *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları.

Luteolin-7-*O*-glukuronit		% Yaşama oranı Ortalama ±S.hata	Delesyon (Kromozom içi kırık) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon	ICR (Kromozomlar arası rekombinasyon) Ortalama ±S.hata	% İnhibisyon
*Negatif Kontrol		%100 (414±01,93)	38±00,91		15±00,91	
**Pozitif kontrol (Akridin)		% 34 (141±02,48)	82±00,90		44±02,41	
Antimutajenite	Luteolin-7-*O*-glukuronit (2 µM/ml)	% 68,3 (283±01,47)	31±00,91	62,2	28±00,91	36,4
	Luteolin-7-*O*-glukuronit (4 µM/ml)	% 31,6 (131±02,35)	92±01,78	komutajen	60±02,04	komutajen
	Luteolin-7-*O*-glukuronit (8 µM/ml)	% 33,8 (140±04,74)	115±01,83	komutajen	41±01,11	6,9
	Luteolin-7-*O*-glukuronit (16 µM/ml)	% 5 (21 ±00,41)	220±02,48	komutajen	66±01,49	komutajen

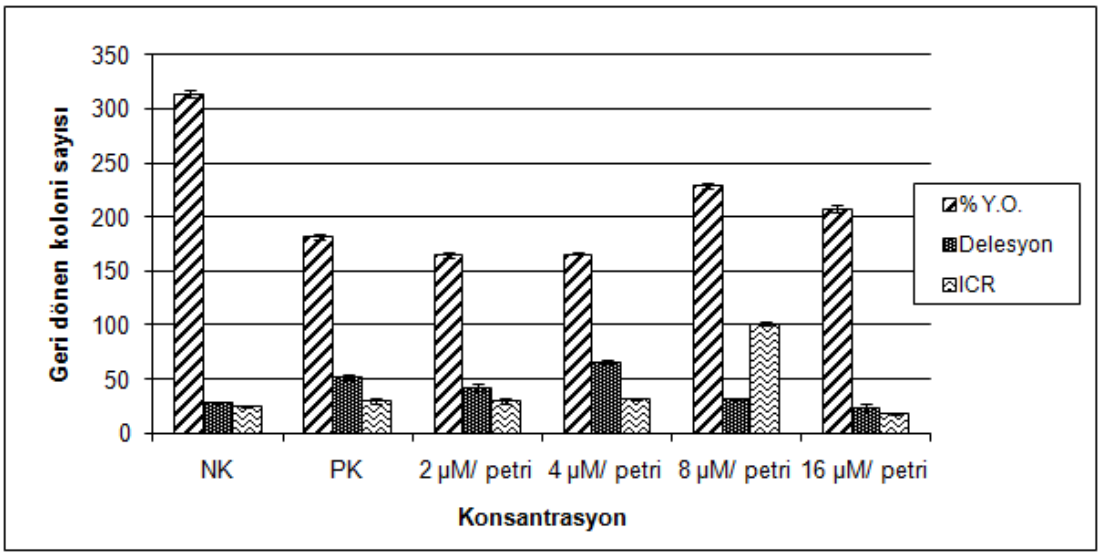
*Negatif kontrol: Sadece besiyeri ve RS112 maya straini
**Pozitif kontrol: Akridin (15 µg/ml)



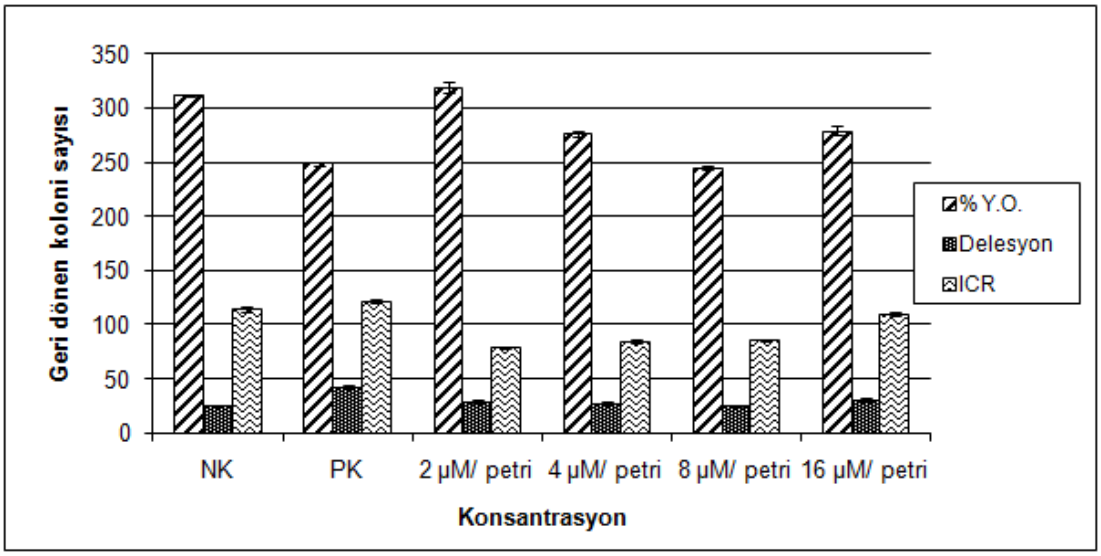
Şekil 4.13. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml Etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



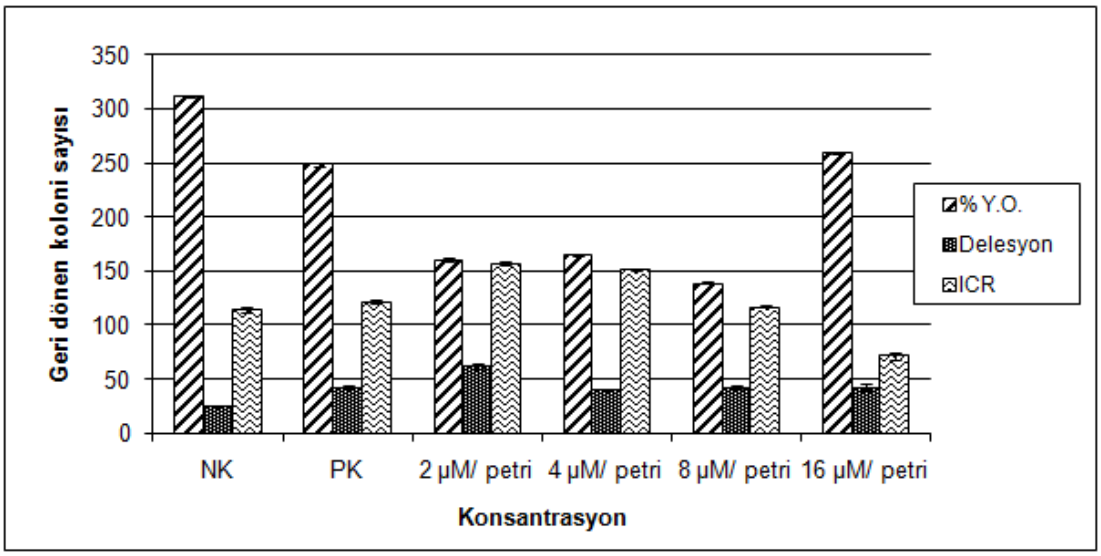
Şekil 4.14. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml Etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



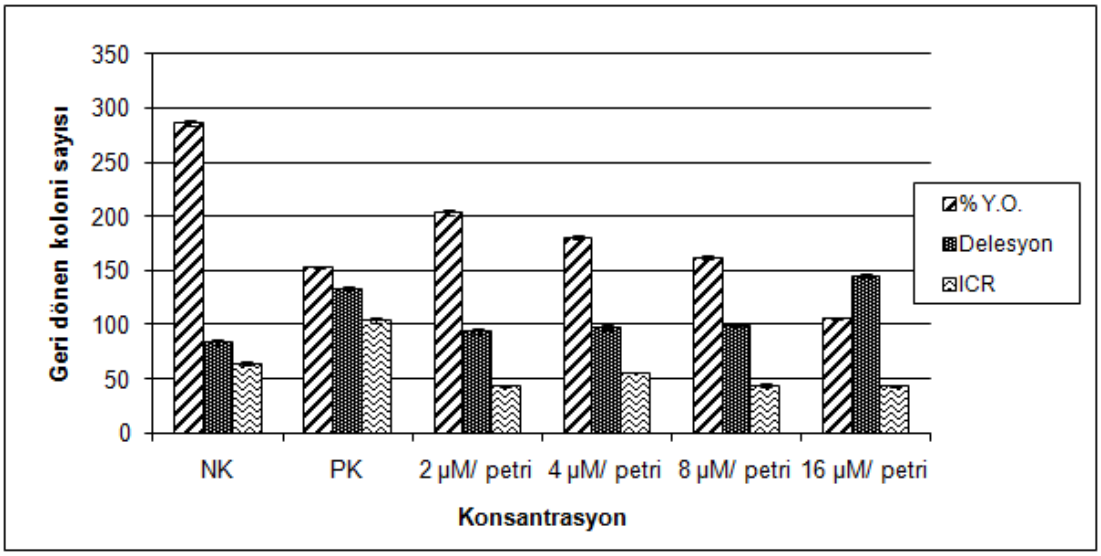
Şekil 4.15. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 15 µl/ml akridin, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



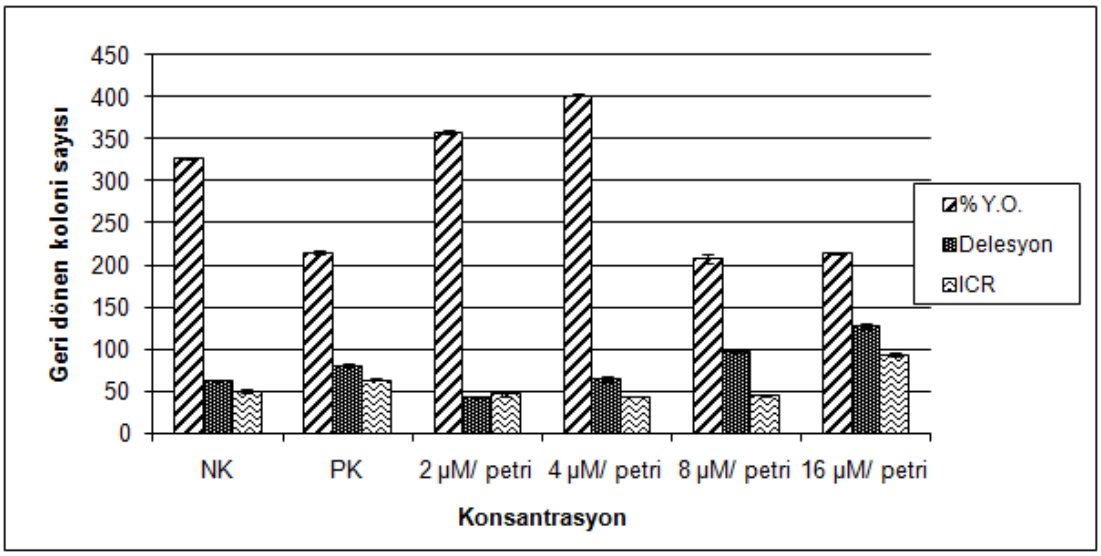
Şekil 4.16. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-glukozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml Etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



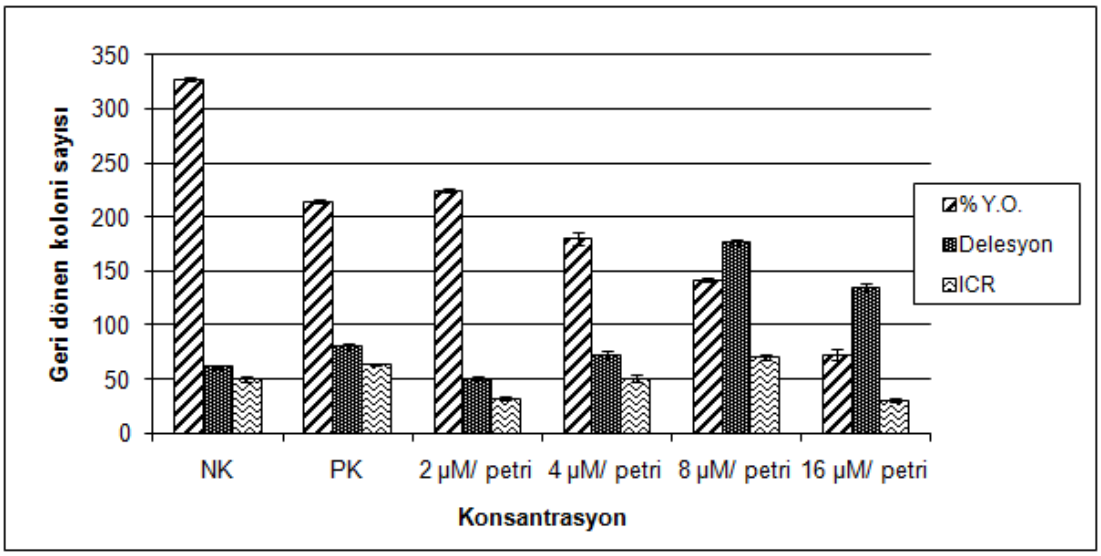
Şekil 4.17. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-glukozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml Etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



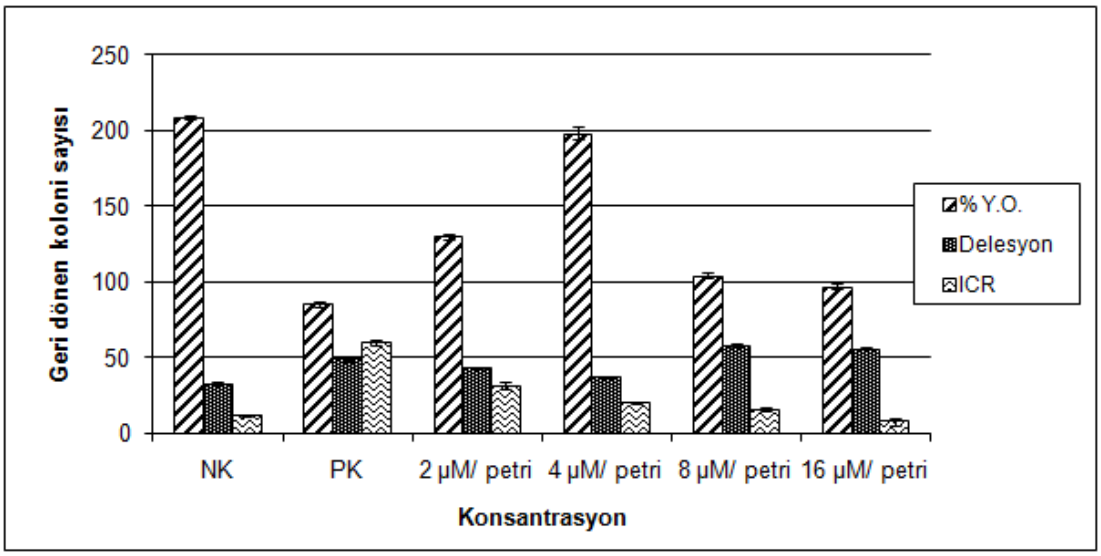
Şekil 4.18. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-glukozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 15 µl/ml akridin, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



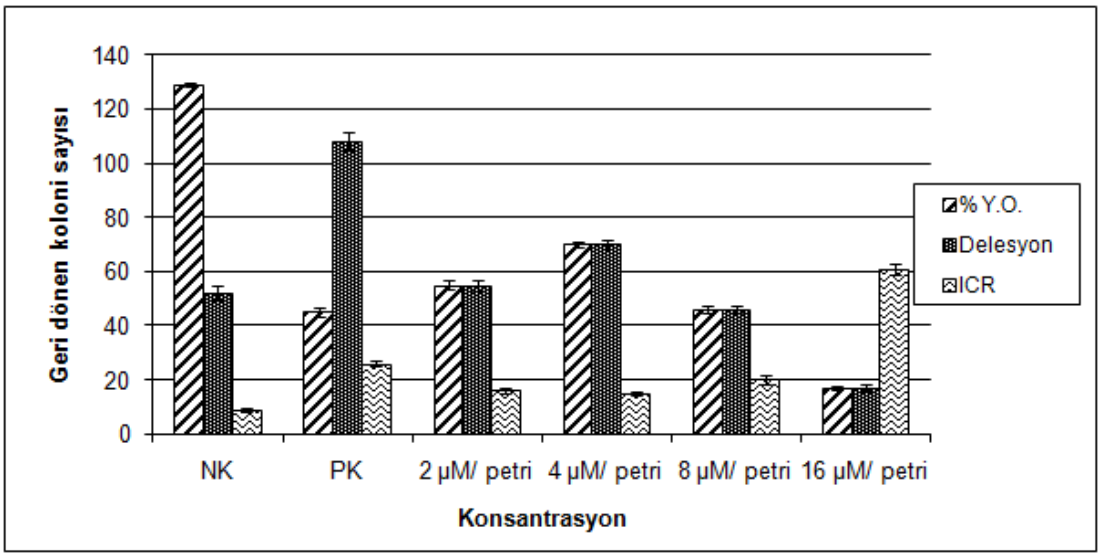
Şekil 4.19. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Rosmarinik asit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml Etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



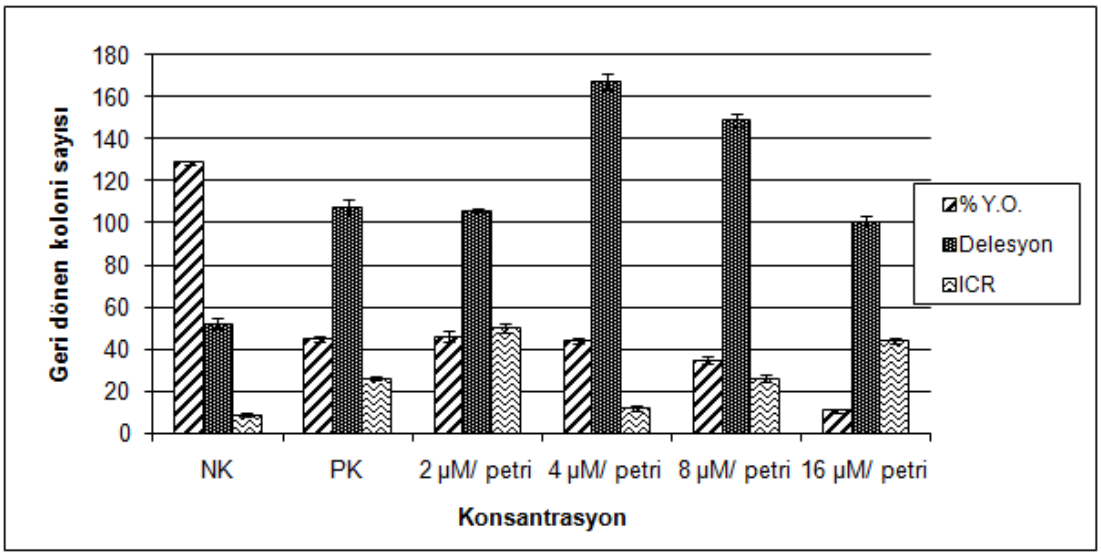
Şekil 4.20. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Rosmarinik asit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml Etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



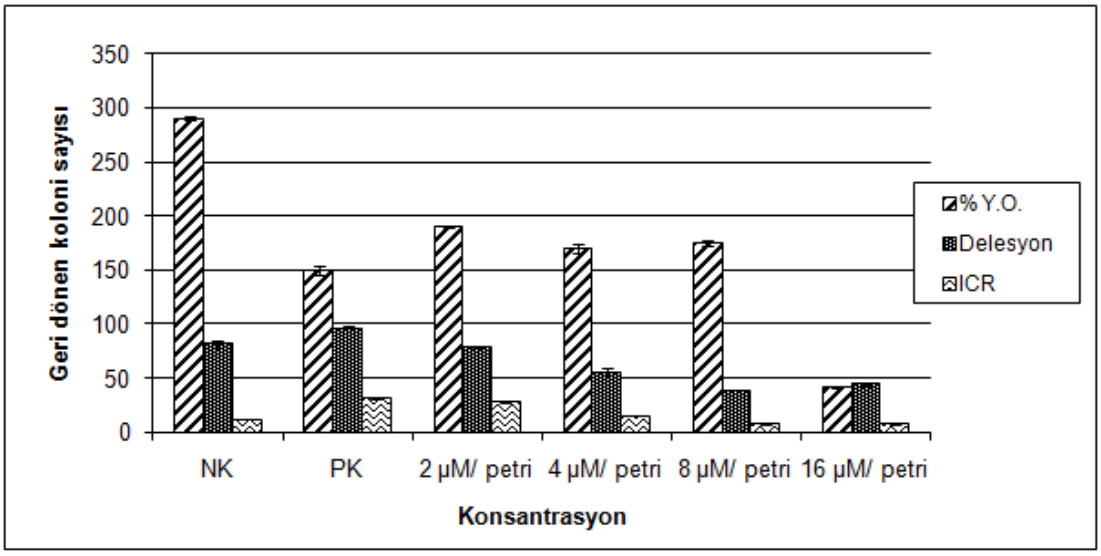
Şekil 4.21. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Rosmarinik asit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 15 µl/ml akridin, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



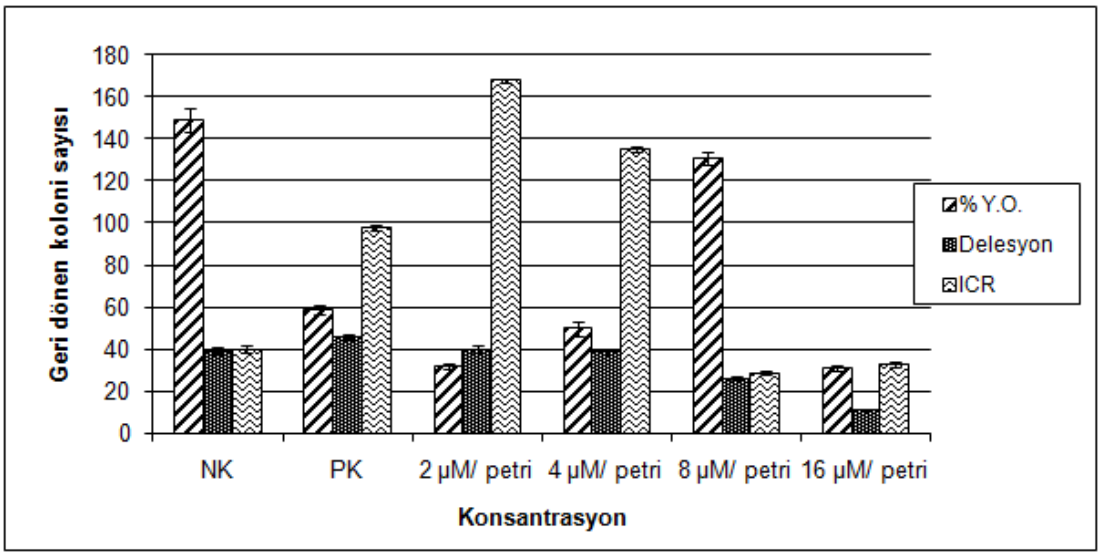
Şekil 4.22. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



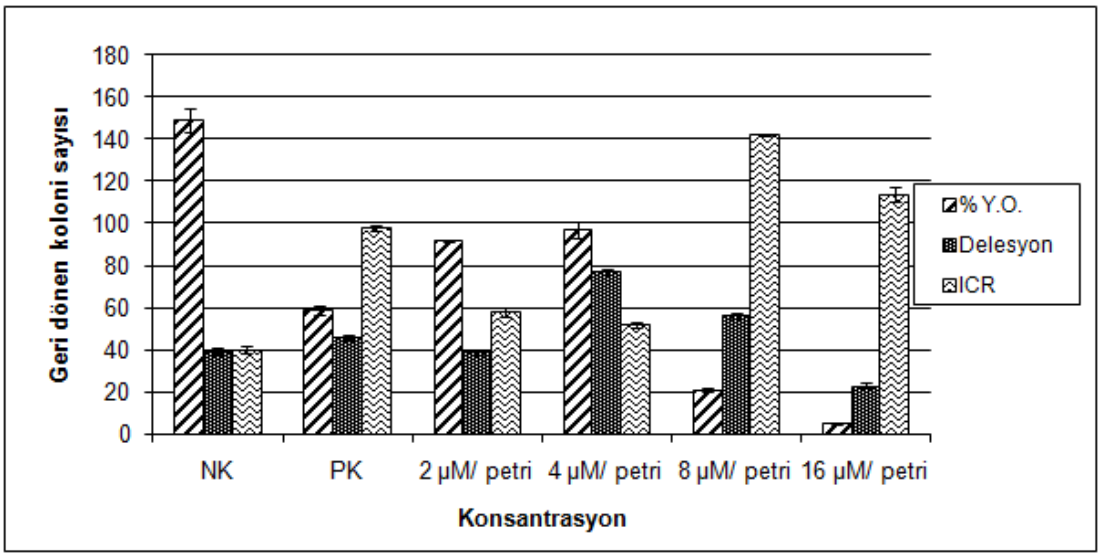
Şekil 4.23. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



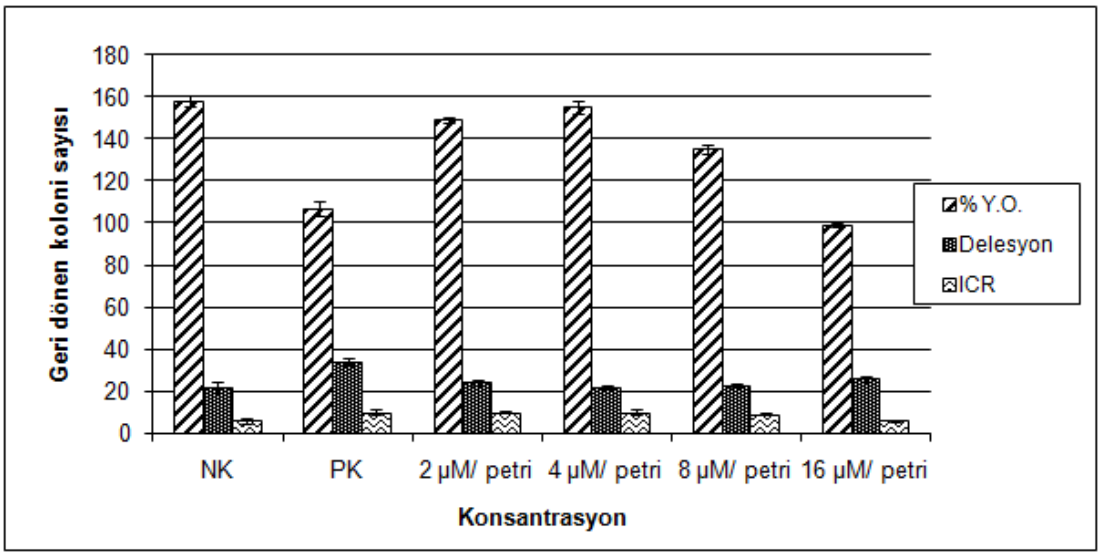
Şekil 4.24. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Apigenin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 15 µl/ml akridin, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



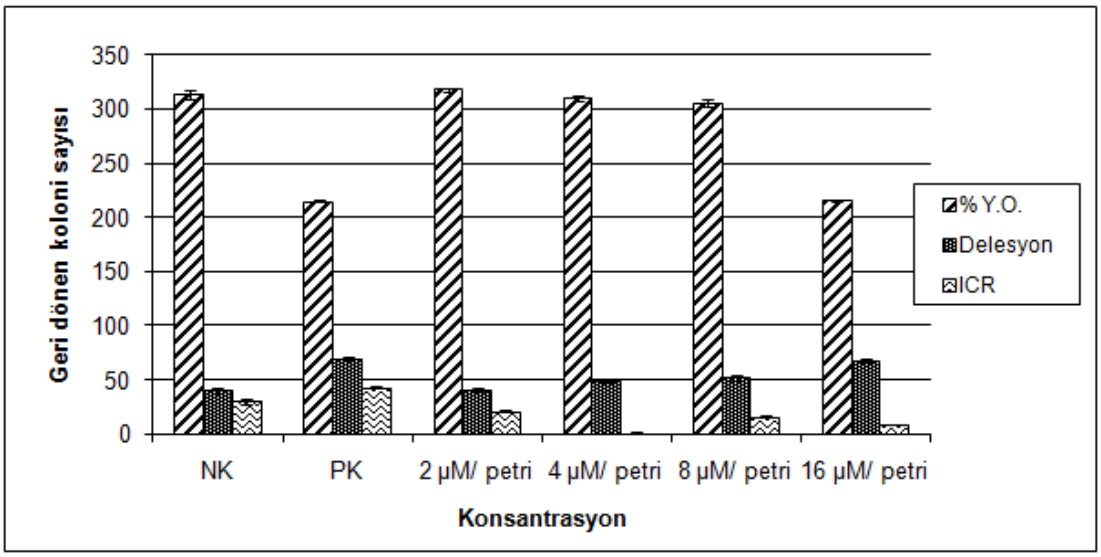
Şekil 4.25. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



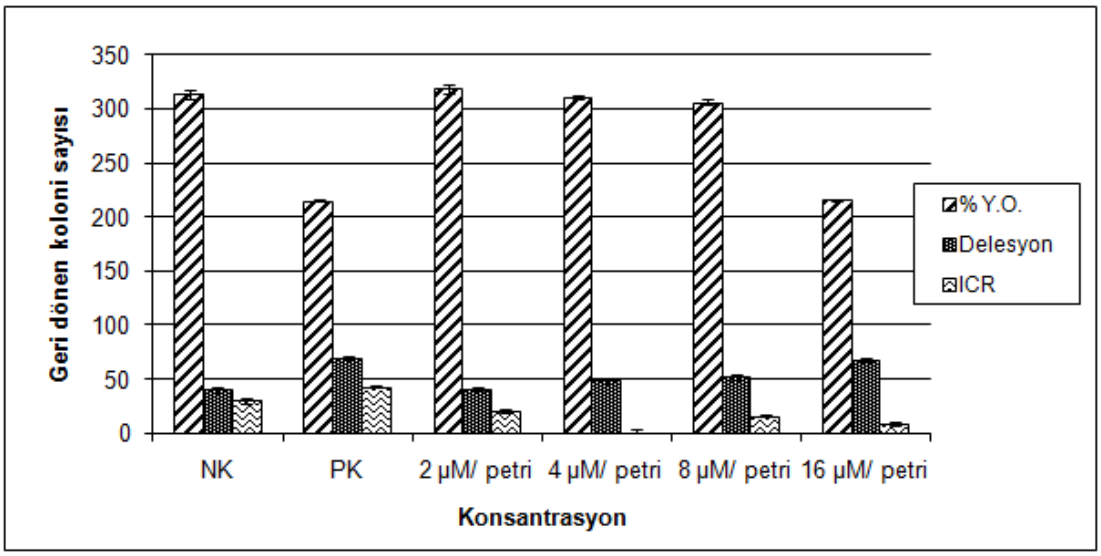
Şekil 4.26. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



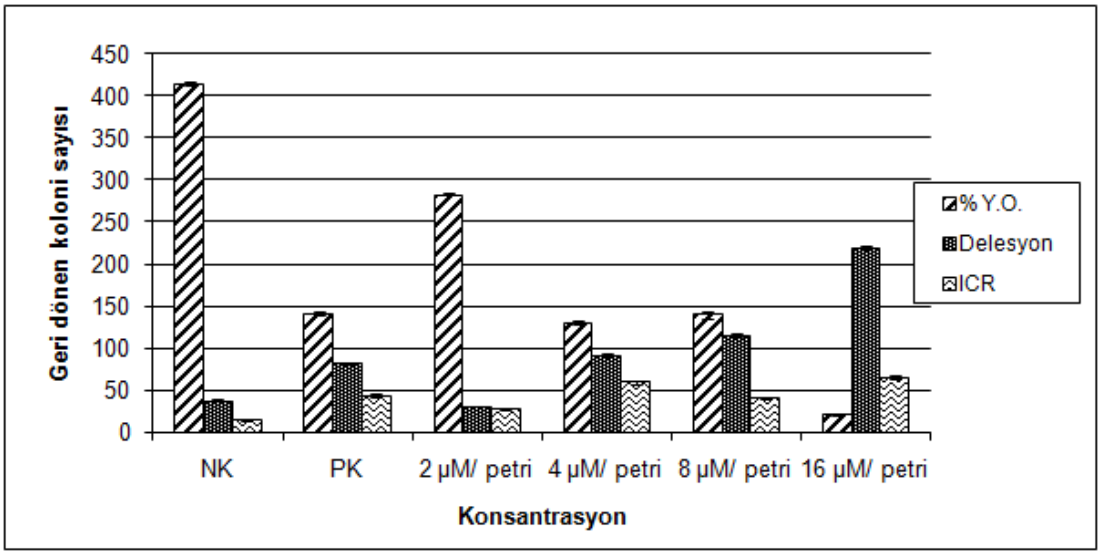
Şekil 4.27. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-rutinozit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan antimutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 15 µl/ml akridin, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



Şekil 4.28. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukuronit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



Şekil 4.29. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukuronit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 10 µl/ml etil metan sülfonat, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).



Şekil 4.30. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen Luteolin-7-*O*-glukuronit etken maddesinin, *S. cerevisiae* RS112 maya suşu ile yapılan mutajenite test sonuçları (Pozitif kontrol: 15 µl/ml akridin, % Y.O: % yaşam oranı, Delesyon: Kromozom içi kırık, ICR: kromozomlar arası rekombinasyon).

4.6.2. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarının mutajenite ve antimutajenite deney sonuçları

Mentha longifolia L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden izole edilen Luteolin-7-*O*-glikozit, Apigenin-7-*O*-glikozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-glukuronit maddelerinin mutajenik ve antimutajenik etkilerinin saptanması için yapılan deneylerde bu maddelerin stok çözeltileri 2 mM ve 2 µM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır.

İzole edilen etken maddelerin mutajenik aktivitelerini belirlemek için *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 bakteri suşları ile yapılan mutajenite deneylerinde her bir stok çözeltiden 100 µl/petri, 50 µl/petri ve 25 µl/petri alınarak üç ayrı konsantrasyonda uygulama yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde mM ve µM düzeyde uygulanan etken madde konsantrasyonlarının hiçbirinde mutajenik aktivite gözlenmemiştir (Çizelge 4.21-4.24 ve Şekil 4.31-4.34).

Aynı bakteri suşları ile yapılan antimutajenite deneylerinde her bir stok çözeltiden 100 µl/petri, 80 µl/petri, 60 µl/petri, 40 µl/petri ve 20 µl/petri alınarak beş ayrı konsantrasyonda uygulama yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde *S. typhimurium* TA1535 suşu üzerine mM seviyesindeki konsantrasyonlarda uygulanan maddelerden hiçbirinin antimutajenik aktivitesinin olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.25 ve Şekil 4.35). Ayrıca aynı bakteri suşuna µM seviyesindeki konsantrasyonların uygulanmasıyla yapılan antimutajenite deneylerinde Luteolin-7-*O*-glikozit'in 40 µl/petri konsantrasyonda %23,86 oranında orta dereceli; Apigenin-7-*O*-glikozit'in 40 ve 60 µl/petri konsantrasyonlarda sırasıyla %27,23 ve %31,19 oranlarında orta dereceli ve Luteolin-7-*O*-rutinozit'in 60 µl/petri konsantrasyonda %23,76 oranında orta dereceli antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir (Çizelge 4.27 ve Şekil 4.37).

S. typhimurium TA1537 ile yapılan antimutajenite deneylerinin sonuçları incelendiğinde mM seviyesindeki konsantrasyonlarda uygulanan maddelerden Luteolin-7-*O*-glikozit'in 20, 40, 60, 80 ve 100 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %84,03, %71,27, %72,87, %68,89 ve %83,61 oranlarında güçlü antimutajenik etki; Apigenin-7-*O*-glikozit'in 20, 40, 60, 80 ve 100 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %81,36, %79,40, %81,24, %90,83 ve %86,46 oranlarında güçlü antimutajenik etki; Rozmarinik asit'in sadece 40 µl/petri konsantrasyonda %45,90 oranında güçlü antimutajenik etki; Apigenin-7-*O*-rutinozit'in 20, 40, 60, 80 ve 100 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %76,85, %86,76, %86,82, %92,93 ve %84,33 oranlarında güçlü antimutajenik etki; Luteolin-7-*O*-rutinozit'in 20, 40, 60 ve 80 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %76,61, %79,46, %67,52 ve %70,08 oranlarında güçlü antimutajenik etki veLuteolin-7-*O*-glukuronit'te 40 µl/petri konsantrasyonda %26,06 oranında doza bağımlı olmayan orta dereceli antimutajenik aktiviteye ve 80 µl/petri konsantrasyonda %46,20 oranında doza bağımlı olmayan güçlü antimutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.26 ve Şekil 4.36).

Aynı test suşu üzerine µM seviyesindeki konsantrasyonlarda etken maddelerin uygulanmasıyla yapılan antimutajenite deneylerinin sonuçları incelendiğinde ise Luteolin-7-*O*-glikozit'in 20, 40, 60 ve 80 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %55,34 ve %43,82 oranlarında güçlü, %31,45 oranında orta dereceli ve %56,64 oranında güçlü antimutajenik etki; Apigenin-7-*O*-glikozit'in 20, 40, 60, 80 ve 100 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %91,14, %88,40, %88,17, %79,12 ve %42,14 oranlarında güçlü antimutajenik etki; Rozmarinik Asit'in 20 µl/petri konsantrasyonda %21,45 oranında zayıf antimutajenik aktiviteye ve 80 µl/petri ve 100 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %29,27 ve %36,97 oranlarında doza bağlı olmayan orta dereceli antimutajenik etki; Apigenin-7-*O*-rutinozit'in 20, 40, 60, 80 ve 100 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %88,55, %73,05, %84,43, %85,65 ve %85,65 oranlarında güçlü antimutajenik etki; Luteolin-7-*O*-rutinozit'in 20, 40, 60, 80 ve 100 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %65,34, %87,63, %74,20, %68,55 ve %78,32 oranlarında güçlü antimutajenik etki ve Luteolin-7-*O*-glukuronit'in 100 µl/petri konsantrasyonda %38,27 oranında doza bağımlı olmayan orta dereceli antimutajenik

aktiviteye ve 20, 40, 60 ve 80 µl/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %45,73, %48,34, %67,77 ve %53,08 oranlarında doza bağımlı olmayan güçlü antimutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.28 ve Şekil 4.38).

Çizelge 4.21. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan mutajenite test sonuçları.

Etken Madde	Etken Madde Konsantrasyonu	I. Sayım Sonuçları	II. Sayım Sonuçları	Ortalama	% Mutasyon
Luteolin-7-*O*-glikozit	25 µl	18	15	16,5 ± 01,50	-
	50 µl	12	15	13,5 ± 01,50	-
	100 µl	9	13	11 ± 02,00	-
Apigenin-7-*O*-glikozit	25 µl	8	14	11 ± 03,00	-
	50 µl	15	14	14,5 ± 00,50	-
	100 µl	8	9	8,5 ± 00,50	-
Rozmarinik Asit	25 µl	16	16	16 ± 00,00	-
	50 µl	9	10	9,5 ± 00,50	-
	100 µl	16	16	16 ± 00,00	-
Apigenin-7-*O*-rutinozit	25 µl	15	17	16 ± 01,00	-
	50 µl	6	9	7,5 ± 01,50	-
	100 µl	14	16	15 ± 01,00	-
Luteolin-7-*O*-rutinozit	25 µl	13	15	14 ± 01,00	-
	50 µl	8	10	9 ± 01,00	-
	100 µl	11	13	12 ± 01,00	-
Luteolin-7-*O*-glukuronit	25 µl	16	16	16 ± 00,00	-
	50 µl	9	10	9,5 ± 00,50	-
	100 µl	18	17	17,5 ± 00,50	-

* Ortalama Pozitif Kontrol (P.K.) değeri 417,8 ± 01,98 olarak belirlenmiştir.
** Ortalama Negatif Kontrol (N.K.) değeri standartlara uygun bulunmuştur.
*** Çalışmada kullanılan etken madde konsantrasyonları 100 µl'de 2 mM olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 4.22. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan mutajenite testi sonuçları.

Etken Madde	Etken Madde Konsantrasyonu	I. Sayım Sonuçları	II. Sayım Sonuçları	Ortalama	% Mutasyon
Luteolin-7-*O*-glikozit	25 µl	20	19	19,5 ± 00,50	-
	50 µl	20	19	19,5 ± 00,50	-
	100 µl	23	24	23,5 ± 00,50	-
Apigenin-7-*O*-glikozit	25 µl	19	17	18 ± 01,00	-
	50 µl	23	22	22,5 ± 01,00	-
	100 µl	25	21	23 ± 02,00	-
Rozmarinik Asit	25 µl	8	8	8 ± 00,00	-
	50 µl	5	6	5,5 ± 00,50	-
	100 µl	5	5	5 ± 00,50	-
Apigenin-7-*O*-rutinozit	25 µl	26	28	27 ± 01,00	-
	50 µl	24	21	22,5 ± 01,50	-
	100 µl	21	22	21,5 ± 00,50	-
Luteolin-7-*O*-rutinozit	25 µl	26	24	25 ± 01,00	-
	50 µl	27	24	25,5 ± 01,50	-
	100 µl	28	29	28,5 ± 00,50	-
Luteolin-7-*O*-glukuronit	25 µl	8	8	8 ± 00,00	-
	50 µl	6	6	6 ± 00,00	-
	100 µl	5	6	5,5 ± 00,50	-

* Ortalama Pozitif Kontrol (P.K.) değeri 555,6 ± 03,84 olarak belirlenmiştir.
** Ortalama Negatif Kontrol (N.K.) değeri standartlara uygun bulunmuştur.
*** Çalışmada kullanılan etken madde konsantrasyonları 100 µl'de 2 mM olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 4.23. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan mutajenite testi sonuçları.

Etken Madde	Etken Madde Konsantrasyonu	I. Sayım Sonuçları	II. Sayım Sonuçları	Ortalama	% Mutasyon
Luteolin-7-*O*-glikozit	25 µl	16	19	17,5 ± 01,50	-
	50 µl	18	17	17,5 ± 00,50	-
	100 µl	17	19	18 ± 01,00	-
Apigenin-7-*O*-glikozit	25 µl	18	17	17,5 ± 00,50	-
	50 µl	19	16	17,5 ± 01,50	-
	100 µl	19	15	17 ± 02,00	-
Rozmarinik Asit	25 µl	17	15	16 ± 01,00	-
	50 µl	8	8	8 ± 00,00	-
	100 µl	9	10	9,5 ± 00,50	-
Apigenin-7-*O*-rutinozit	25 µl	21	24	22,5 ± 01,50	-
	50 µl	19	19	19 ± 00,00	-
	100 µl	19	18	18,5 ± 00,50	-
Luteolin-7-*O*-rutinozit	25 µl	22	21	21,5 ± 00,50	-
	50 µl	19	18	18,5 ± 00,50	-
	100 µl	17	19	18 ± 01,00	-
Luteolin-7-*O*-glukuronit	25 µl	14	10	12 ± 02,00	-
	50 µl	11	16	13,5 ± 02,50	-
	100 µl	18	11	14,5 ± 03,50	-

* Ortalama Pozitif Kontrol (P.K.) değeri 521,4 ± 04,29 olarak belirlenmiştir.
** Ortalama Negatif Kontrol (N.K.) değeri standartlara uygun bulunmuştur.
*** Çalışmada kullanılan etken madde konsantrasyonları 100 µl'de 2 µM olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 4.24. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan mutajenite testi sonuçları.

Etken Madde	Etken Madde Konsantrasyonu	I. Sayım Sonuçları	II. Sayım Sonuçları	Ortalama	% Mutasyon
Luteolin-7-*O*-glikozit	25 µl	16	19	17,5 ± 01,50	-
	50 µl	18	17	17,5 ± 00,50	-
	100 µl	17	19	18 ± 01,00	-
Apigenin-7-*O*-glikozit	25 µl	18	17	17,5 ± 00,50	-
	50 µl	19	16	17,5 ± 01,50	-
	100 µl	19	15	17 ± 02,00	-
Rozmarinik Asit	25 µl	5	5	5 ± 00,00	-
	50 µl	7	8	7,5 ± 00,50	-
	100 µl	8	9	16,5 ± 00,50	-
Apigenin-7-*O*-rutinozit	25 µl	21	24	22,5 ± 01,50	-
	50 µl	19	19	19 ± 00,00	-
	100 µl	19	18	18,5 ± 00,50	-
Luteolin-7-*O*-rutinozit	25 µl	22	21	21,5 ± 00,50	-
	50 µl	19	18	18,5 ± 00,50	-
	100 µl	17	19	18 ± 01,00	-
Luteolin-7-*O*-glukuronit	25 µl	7	9	8 ± 01,00	-
	50 µl	8	9	8,5 ± 00,50	-
	100 µl	11	11	11 ± 00,00	-

* Ortalama Pozitif Kontrol (P.K.) değeri 615,4 ± 02,13 olarak belirlenmiştir.
** Ortalama Negatif Kontrol (N.K.) değeri standartlara uygun bulunmuştur.
*** Çalışmada kullanılan etken madde konsantrasyonları 100 µl'de 2 µM olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 4.25. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan antimutajenite testi sonuçları.

Etken Madde	Etken Madde Konsantrasyonu	I. Sayım Sonucu	II. Sayım Sonucu	III. Sayım Sonucu	IV. Sayım Sonucu	Ortalama ± S.H.	% İnhibisyon
Luteolin-7-*O*-glikozit	20 µl	471	479	481	473	476 ± 02,38	-
	40 µl	450	447	459	462	454,5 ± 03,57	-
	60 µl	455	452	462	465	458,5 ± 03,01	-
	80 µl	563	551	573	585	568 ± 07,23	-
	100 µl	443	455	453	441	448 ± 03,51	-
Apigenin-7-*O*-glikozit	20 µl	466	475	480	471	473 ± 02,97	-
	40 µl	425	430	430	425	427,5 ± 01,44	-
	60 µl	427	426	434	435	430,5 ± 02,33	-
	80 µl	445	441	451	455	448 ± 03,11	-
	100 µl	410	424	430	415	419,5 ± 04,48	-
Rozmarinik Asit	20 µl	389	337	359	367	363 ± 10,74	-
	40 µl	357	312	329	340	334,5 ± 09,46	-
	60 µl	328	367	346	349	347,5 ± 07,98	-
	80 µl	377	325	345	357	351 ± 10,89	-
	100 µl	310	346	324	332	328 ± 07,53	-
Apigenin-7-*O*-rutinozit	20 µl	417	420	425	422	421 ± 01,68	-
	40 µl	428	421	436	443	432 ± 04,78	-
	60 µl	451	475	459	435	455 ± 08,33	-
	80 µl	425	447	433	411	429 ± 07,53	-
	100 µl	441	441	447	457	449 ± 03,77	-
Luteolin-7-*O*-rutinozit	20 µl	442	445	438	435	440 ± 02,20	-
	40 µl	419	448	429	400	424 ± 10,01	-
	60 µl	402	415	418	405	410 ± 03,85	-
	80 µl	428	445	435	418	431,5 ± 05,69	-
	100 µl	441	438	452	455	446,5 ± 04,13	-
Luteolin-7-*O*-glukuronit	20 µl	393	451	421	423	422 ± 11,85	-
	40 µl	534	496	510	520	515 ± 08,02	-
	60 µl	387	435	409	413	411 ± 09,83	-
	80 µl	352	316	330	338	334 ± 07,53	-
	100 µl	470	530	505	495	500 ± 12,41	-

* Ortalama Pozitif Kontrol (P.K.) değeri 488 ± 21,24 olarak belirlenmiştir.
** Ortalama Negatif Kontrol (N.K.) değeri standartlara uygun bulunmuştur.
*** Çalışmada kullanılan etken madde konsantrasyonları 100 µl'de 2 mM olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 4.26. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan antimutajenite testi sonuçları.

Etken Madde	Etken Madde Konsantrasyonu	I. Sayım Sonucu	II. Sayım Sonucu	III. Sayım Sonucu	IV. Sayım Sonucu	Ortalama ± S.H.	% İnhibisyon
Luteolin-7-*O*-glikozit	20 µl	100	169	139	130	134,5 ± 14,20	84,03
	40 µl	231	261	223	253	242 ± 08,96	71,27
	60 µl	172	292	215	235	228,5 ± 24,91	72,87
	80 µl	284	240	261	263	262 ± 08,99	68,89
	100 µl	112	124	152	164	138 ± 12,06	83,61
Apigenin-7-*O*-glikozit	20 µl	124	165	190	149	157 ± 13,86	81,36
	40 µl	178	172	175	169	173,5 ± 01,94	79,40
	60 µl	151	147	169	165	158 ± 05,32	81,24
	80 µl	65	89	70	85	77,25 ± 05,78	90,83
	100 µl	116	112	120	108	114 ± 02,58	86,46
Rozmarinik Asit	20 µl	316	310	325	301	313 ± 05,05	-
	40 µl	165	195	179	181	180 ± 06,14	45,90
	60 µl	277	300	283	294	288,5 ± 05,20	-
	80 µl	320	330	322	328	325 ± 02,38	-
	100 µl	324	266	294	296	295 ± 11,85	-
Apigenin-7-*O*-rutinozit	20 µl	172	218	190	200	195 ± 09,61	76,85
	40 µl	95	128	100	123	111,5 ± 08,21	86,76
	60 µl	125	116	97	106	111 ± 06,07	86,82
	80 µl	60	59	64	55	59,5 ± 01,85	92,93
	100 µl	133	135	131	129	132 ± 01,29	84,33
Luteolin-7-*O*-rutinozit	20 µl	190	185	209	204	197 ± 05,67	76,61
	40 µl	157	189	164	182	173 ± 07,49	79,46
	60 µl	272	280	275	267	273,5 ± 02,72	67,52
	80 µl	223	264	240	281	252 ± 12,81	70,08
	100 µl	857	839	868	844	852 ± 06,54	-
Luteolin-7-*O*-glukuronit	20 µl	250	294	269	273	271,5 ± 09,02	-
	40 µl	265	227	240	252	246 ± 08,13	26,06
	60 µl	284	324	301	307	304 ± 08,26	-
	80 µl	173	185	177	181	179 ± 02,58	46,20
	100 µl	241	354	295	300	297,5 ± 23,08	-

* Ortalama Pozitif Kontrol (P.K.) değeri 842,2 ± 29,96 olarak belirlenmiştir.

** Ortalama Negatif Kontrol (N.K.) değeri 24.50 ± 02,06 olarak belirlenmiştir.

*** Çalışmada kullanılan etken madde konsantrasyonları 100 µl'de 2 mM olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 4.27. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan antimutajenite testi sonuçları.

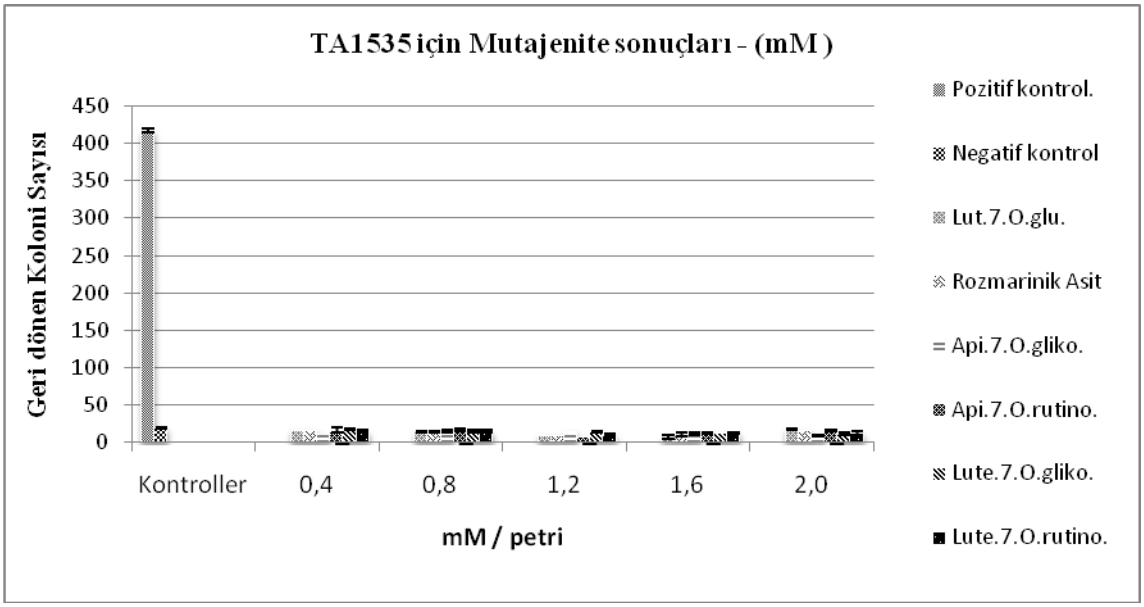
Etken Madde	Etken Madde Konsantrasyonu	I. Sayım Sonucu	II. Sayım Sonucu	III. Sayım Sonucu	IV. Sayım Sonucu	Ortalama ± S.H.	% İnhibisyon
Luteolin-7-*O*-glikozit	20 µl	456	435	480	459	457,5 ± 09,21	-
	40 µl	385	362	407	384	384,5 ± 09,19	23,86
	60 µl	458	465	457	464	461 ± 02,04	-
	80 µl	423	461	377	415	419 ± 17,22	-
	100 µl	435	444	431	440	437,5 ± 02,84	-
Apigenin-7-*O*-glikozit	20 µl	469	461	481	473	471 ± 04,16	-
	40 µl	370	381	354	365	367,5 ± 05,61	27,23
	60 µl	342	330	365	353	347,5 ± 07,49	31,19
	80 µl	440	425	449	434	437 ± 05,05	-
	100 µl	400	427	387	414	407 ± 08,65	-
Rozmarinik Asit	20 µl	442	455	482	418	449,25 ± 13,34	-
	40 µl	406	390	426	415	409,25 ± 07,61	-
	60 µl	378	383	375	385	380,25 ± 02,29	-
	80 µl	428	477	449	461	453,75 ± 10,32	-
	100 µl	439	381	471	420	427,75 ± 18,80	-
Apigenin-7-*O*-rutinozit	20 µl	420	430	415	425	422,5 ± 03,23	-
	40 µl	425	425	430	430	427,5 ± 01,44	-
	60 µl	479	461	492	474	476,5 ± 06,41	-
	80 µl	400	412	402	414	407 ± 03,51	-
	100 µl	423	427	414	418	420,5 ± 02,84	-
Luteolin-7-*O*-rutinozit	20 µl	413	420	401	408	410,5 ± 04,01	-
	40 µl	425	410	450	435	430 ± 08,42	-
	60 µl	390	338	432	380	385 ± 19,30	23,76
	80 µl	445	439	455	449	447 ± 03,37	-
	100 µl	440	434	441	435	437,5 ± 01,76	-
Luteolin-7-*O*-glukuronit	20 µl	331	320	364	368	345,75 ± 11,93	-
	40 µl	301	286	320	330	309,25 ± 09,81	-
	60 µl	318	290	311	317	309 ± 06,52	-
	80 µl	323	291	266	315	298,75 ± 12,86	-
	100 µl	331	320	364	368	345,75 ± 11,93	-

* Ortalama Pozitif Kontrol (P.K.) değeri 505 ± 15,07 olarak belirlenmiştir.
** Ortalama Negatif Kontrol (N.K.) değeri standartlara uygun bulunmuştur.
*** Çalışmada kullanılan etken madde konsantrasyonları 100 µl'de 2 µM olacak şekilde ayarlanmıştır.

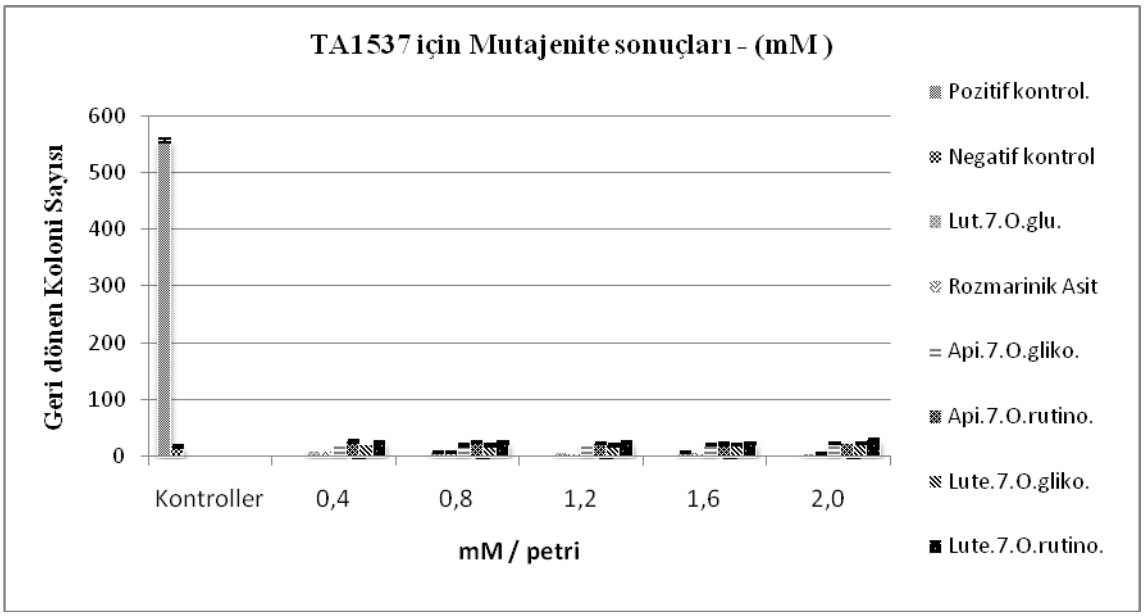
Çizelge 4.28. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan antimutajenite testi sonuçları.

Etken Madde	Etken Madde Konsantrasyonu	I. Sayım Sonucu	II. Sayım Sonucu	III. Sayım Sonucu	IV. Sayım Sonucu	Ortalama ± S.H.	% İnhibisyon
Luteolin-7-*O*-glikozit	20 µl	285	300	291	294	292,5 ± 03,12	55,34
	40 µl	253	483	371	365	368 ± 46,96	43,82
	60 µl	441	457	444	454	449 ± 03,85	31,45
	80 µl	371	197	281	287	284 ± 35,54	56,64
	100 µl	635	654	642	647	644,5 ± 04,01	-
Apigenin-7-*O*-glikozit	20 µl	32	84	58	58	58 ± 10,61	91,14
	40 µl	69	83	71	81	76 ± 03,51	88,40
	60 µl	77	78	73	82	77,5 ± 01,85	88,17
	80 µl	189	85	135	138	136,75 ± 21,24	79,12
	100 µl	373	385	375	383	379 ± 02,94	42,14
Rozmarinik Asit	20 µl	312	351	331	332	331,5 ± 07,96	21,45
	40 µl	367	338	313	342	340 ± 11,05	-
	60 µl	471	461	451	481	466 ± 06,45	-
	80 µl	282	315	298	299	298,5 ± 06,74	29,27
	100 µl	259	273	262	270	266 ± 03,29	36,97
Apigenin-7-*O*-rutinozit	20 µl	84	66	79	71	75 ± 04,02	88,55
	40 µl	183	170	180	173	176,5 ± 03,01	73,05
	60 µl	112	92	100	104	102 ± 04,16	84,43
	80 µl	97	91	96	92	94 ± 01,47	85,65
	100 µl	53	135	93	95	94 ± 16,74	85,65
Luteolin-7-*O*-rutinozit	20 µl	228	226	225	229	227 ± 00,91	65,34
	40 µl	114	48	85	77	81 ± 13,57	87,63
	60 µl	161	177	165	173	169 ± 03,65	74,20
	80 µl	211	201	200	212	206 ± 03,19	68,55
	100 µl	149	135	146	138	142 ± 03,29	78,32
Luteolin-7-*O*-glukuronit	20 µl	210	248	221	237	229 ± 08,42	45,73
	40 µl	238	198	217	219	218 ± 08,18	48,34
	60 µl	135	137	137	135	136 ± 00,58	67,77
	80 µl	171	225	196	200	198 ± 11,05	53,08
	100 µl	262	259	252	269	260,5 ± 03,52	38,27

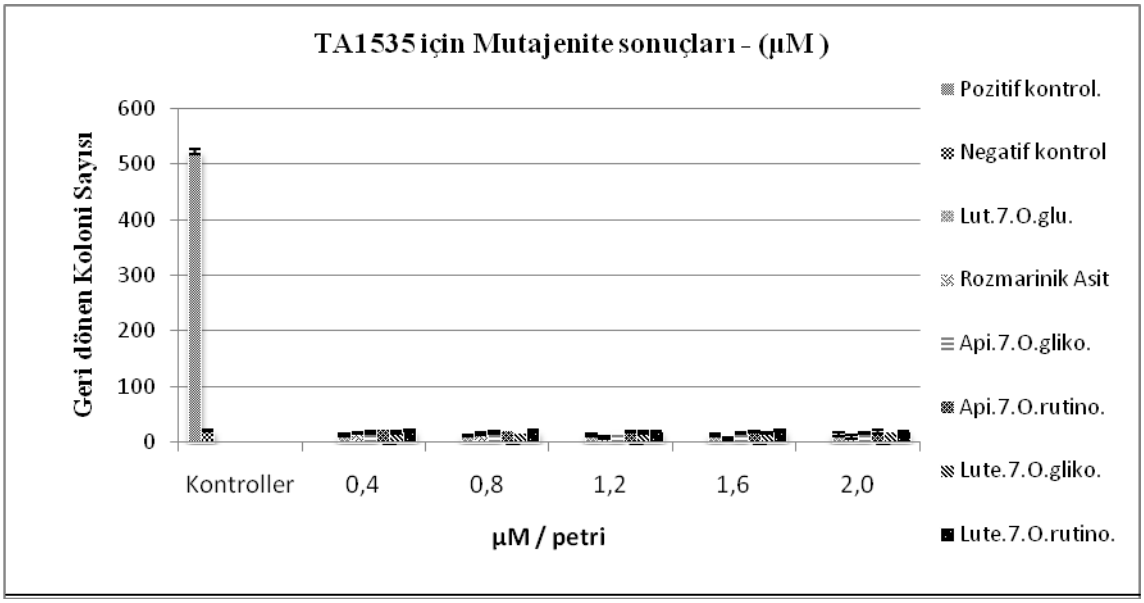
* Ortalama Pozitif Kontrol (P.K.) değeri 655 ± 10,14 olarak belirlenmiştir.
** Ortalama Negatif Kontrol (N.K.) değeri standartlara uygun bulunmuştur.
*** Çalışmada kullanılan etken madde konsantrasyonları 100 µl'de 2 µM olacak şekilde ayarlanmıştır.



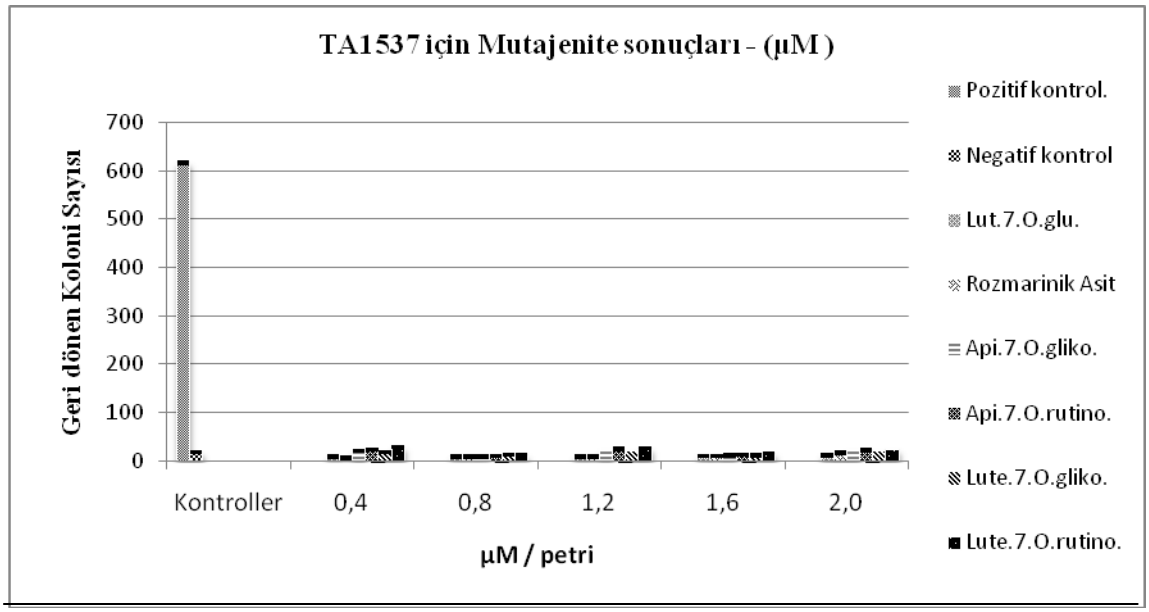
Şekil 4.31. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan mutajenite testi sonuçları (Luteolin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*- glukozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, ve Luteolin-7-*O*-glukuronit, P.K.: NaN_3).



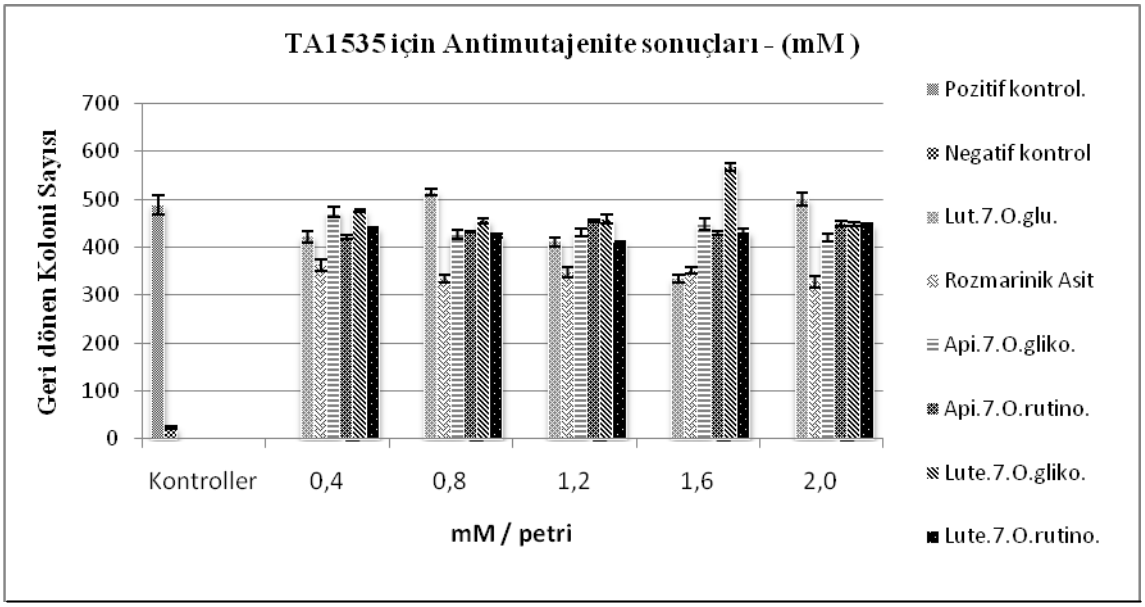
Şekil 4.32. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan mutajenite testi sonuçları (Luteolin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*- glukozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, ve Luteolin-7-*O*-glukuronit, P.K.: 9-AA).



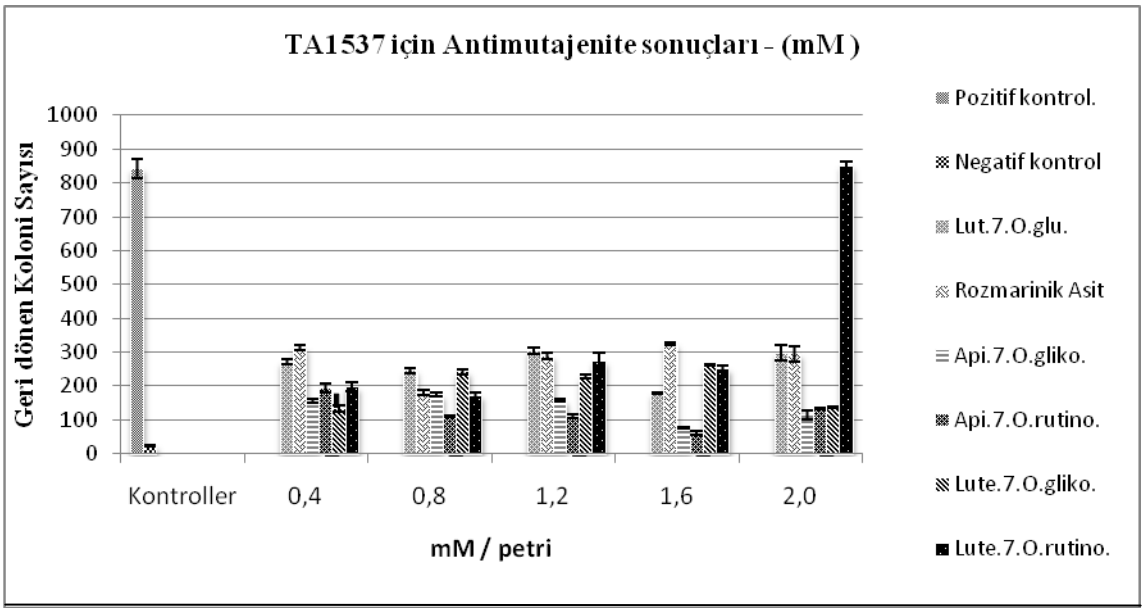
Şekil 4.33. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan mutajenite testi sonuçları (Luteolin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*- glukozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, ve Luteolin-7-*O*-glukuronit, P.K.: NaN_3).



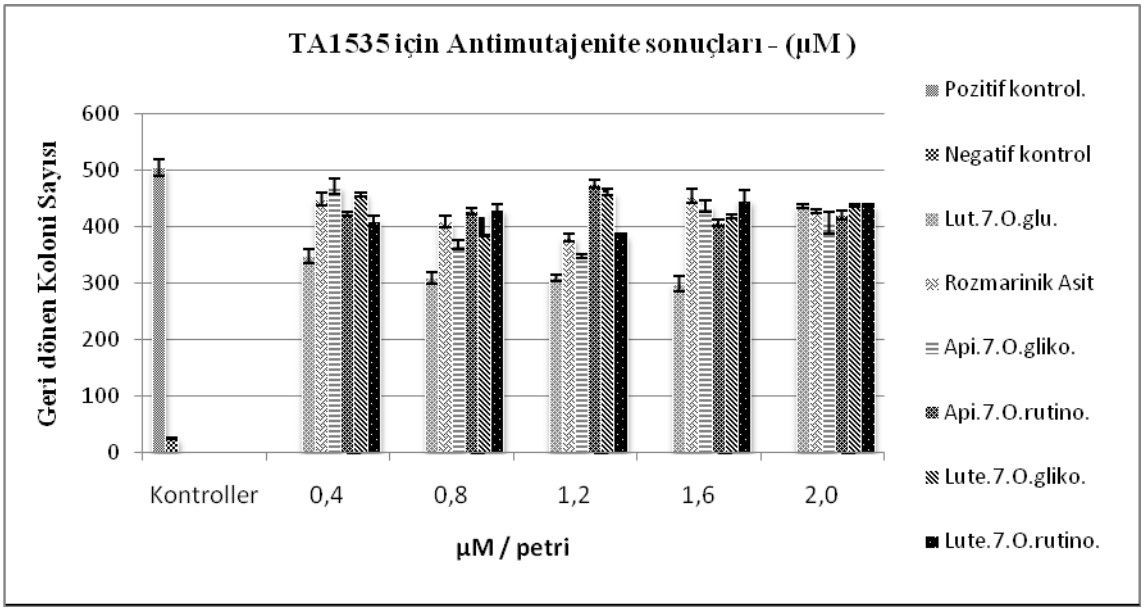
Şekil 4.34. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan mutajenite testi sonuçları (Luteolin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*- glukozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, ve Luteolin-7-*O*-glukuronit, P.K.: 9-AA).



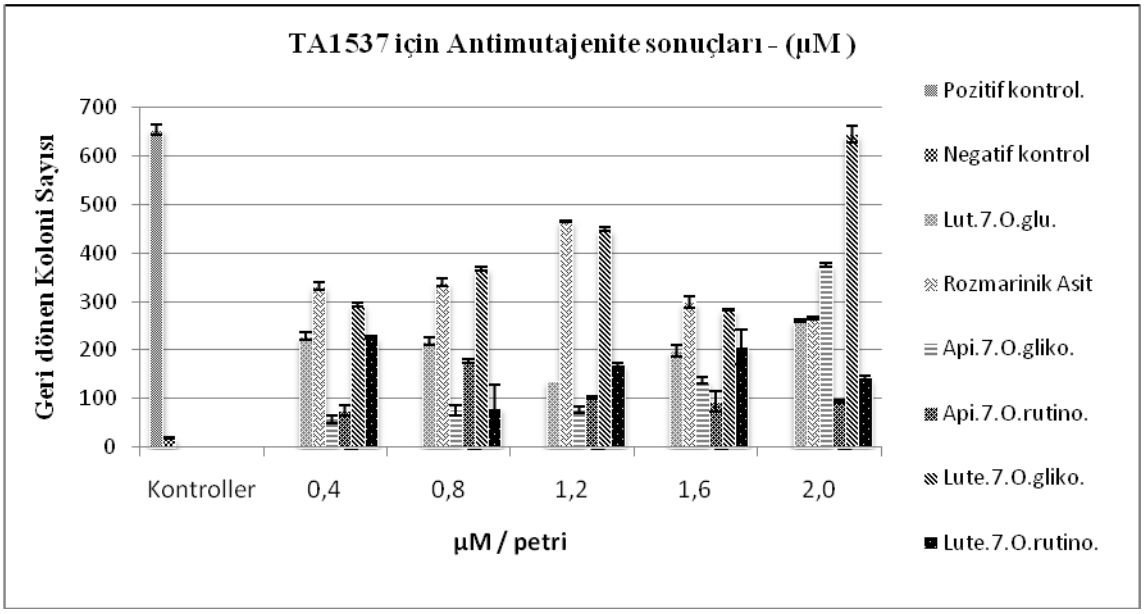
Şekil. 4.35. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan antimutajenite testi sonuçları (Luteolin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*- glukozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, ve Luteolin-7-*O*-glukuronit, P.K.: NaN_3).



Şekil 4.36. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile mM konsantrasyonda yapılan antimutajenite testi sonuçları (Luteolin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*- glukozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, ve Luteolin-7-*O*-glukuronit, P.K.: 9-AA).



Şekil 4.37. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan antimutajenite testi sonuçları (Luteolin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*- glukozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, ve Luteolin-7-*O*-glukuronit, P.K.: NaN_3).



Şekil 4.38. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden elde edilen aktif bileşiklerin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile µM konsantrasyonda yapılan antimutajenite testi sonuçları (Luteolin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*- glukozit, Rozmarinik asit, Apigenin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, ve Luteolin-7-*O*-glukuronit,P.K.: 9-AA).

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bitki kökenli ilaçlar halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (Ramawat 2009). Halk arasında kullanılmalarıyla bilim dünyasının dikkatini çeken bu bitkisel dragların; kanser dâhil birçok hastalığın tedavisinde kullanılabileceği açıkça gösterilmiştir. Buna bağlı olarak günümüz antikanser ilaçların % 60'ından fazlası ve bulaşıcı hastalıklarda kullanılan ilaçların % 75'i direk veya dolaylı olarak doğal kaynaklardan üretilmektedir (Georgiev *et al*. 2009). Kimyasal içerik bakımından zengin olan bitkilerinden elde edilen doğal kaynaklı preparatların en önemli bileşenlerinden birinin flavonoidler olduğu gösterilmiştir. Epidemiyolojiksel olarak yapılan araştırmalar sonucunda bu bileşiklerin; kanser, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz, yaşa bağlı rahatsızlıklar ve inflamantasyon gibi birçok hastalığa iyi geldiği belirtilmiştir. Bundan dolayı flavonoidlerce zengin besinlerin tüketilmesinin birçok yararı olduğu düşünülmektedir (Bandele and Osheroff 2004).

Sağlıklı besinlerin tüketiminin koroner kalp rahatsızlıkları ve kronik kanser gibi hastalıklardan korunmada önemli bir faktör olduğu geniş kabul gören bir görüştür. (Moon *et al.* 2006). Artan epidemiyolojik çalışmalar kadar in vitro çalışmalar da, bu bileşiklerin faydalı etkilerinden dolayı kronik rahatsızlıkları önlemede etkili ajanlar olabileceğini açıkça göstermiştir. Flavonoidlerin varsayılan sağlık yararlarından dolayı bunlara karşı ilgi araştırmalar giderek artmaktadır (Bovy *et al*. 2007).

Araştırıcılar geleneksel tıbbi bitkilerin mutajenik-antimutajenik özelliklerinin belirlenmesinde, esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli test sistemleri geliştirmişlerdir. Bahsi geçen test sistemlerinin başında Ames *Salmonella,* WP2 ve Yeast DEL assay testleri gelmektedir. Çalışmamızda da kullandığımız Ames mutajenite test sistemi çeşitli mutajen ve kanserojenlerin aktiviteleri üzerinde antioksidanlar başta olmak üzere çeşitli ajanların inhibitör etkilerinin izlendiği, çok önemli kısa zamanlı test sistemidir. Bu sistem aynı zamanda, kimyasalların mutajen veya kanserojen etkilerini ortadan kaldıran, bu kimyasalların DNA ile etkileşimlerini

önleyen anti-mutajenlerin ve anti-kanserojenlerin tayininde de kullanılmaktadır (Özbek 2006).

Uzun bir süredir tıbbi bitkilerin mutajenik ve antimutajenik özelliklerinin araştırılmasında bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır. Son yıllarda ise bakteriyel test sistemlerine ilave olarak *S. cerevisiae* test sistemi mutajenik antimutajenik maddelerin araştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır. *S. cerevisiae* 'nın D7 straini başlangıçta çevresel kirleticilerin mutajenik ve kanserojenik özelliklerinin tespiti için kullanılmıştır (Bakkali *et al.* 2006).

Terziyska (2000); çevresel kirleticilerin araştırılmasında kullanılan bakteriyel test sistemlerinin çok iyi geliştirilmesine, çok hızlı ve ucuz olmasına rağmen bu test sistemlerinin insan kaynaklı doğa kirleticilerinin insan üzerine etkilerinin belirlenmesinde güvenilir olmayacağını çünkü; memeli hücreleri ile bakteri hücreleri arasında kromozomal farklılıktan dolayı (ploploidi) bu iki test sisteminin mutajenik/karsinojenik maddelere karşı aynı şekilde cevap veremeyeceğini, ayrıca bakteriyel test sistemlerinin DNA düzeyinde basit hasarları yani tek tip genetik hasarı tespit etme yeteneğindeyken ökaryotik organizma olan mayanın daha kompleks genetik hasarların tespitinde bu organizmaların kullanımının daha avantajlı olduğunu ifade etmiştir. Çevresel kirleticilerin tespitinde kullanılmak üzere tasarlanmış bir başka maya suşu da bu çalışmada da kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* RS112 dir. Bu suşun ökaryotik bir model organizma olarak genomunun insan genomuna uyarlanabileceği anlaşılmış olup, kromozom içi ve kromozomlar arası rekombinasyonun belirlenmesinde kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Bu çalışmamızda *S. cerevisiae* RS112 suşuna karşı pozitif kontrol olarak seçilen mutajenlerden EMS bir alkilleyici ajan olarak bilinmektedir. Bu alkilleyici ajanın normal etki mekanizması, guanin bazının 6 numaralı ve timin bazının 4 numaralı pozisyonundaki keto gruplarını alkillemesidir. Guanin bazının alkillenmesi sonucu CG→TA transisyonu, timin bazının alkillenmesi sonucu ise TA→CG transisyonu meydana gelir. Çalışmamızda kullanılan diğer bir mutajen ajan ise interkalasyon ajanı

olarak bilinen Akridindir. Bazlar arasına girerek komşu bazların birbirinden uzaklaşmasına neden olan bu ajan; iki baz arasında açılmış olan mesafeye bir veya daha fazla baz ilavesine veya delesyonuna neden olabilir. Sonuçta çerçeve kayması mutasyonu meydana gelir ve okuma çerçevesi (reading frame) değişir. EMS ve akridin maddelerinin normal etki mekanizmaları bu şekilde tanımlanmakla beraber bu maddelerin yüksek konsantrasyonlarda kullanımı DNA da çift iplikçik kırığına, DNA hasarına neden olan oksidatif strese ve dolayısıyla oksidatif stres enzimlerinin (ROS enzimleri) sentezinin artmasına neden olur (Titmenstein *et al.* 2000; Brennan and Schiestl 2004; Buryskova *et al*. 2006). RS112 suşunun yapısı gereği kullanılan bu mutajen maddelerin normal mekanizmalarının suşta oluşturacağı hasar gözlenememekle beraber bu mutajenlerin yüksek konsantrasyonlarda kullanımı kromozom içi delesyon oluşturacak veya kromozomlar arası rekombinasyonu teşvik ettirerek HiS3 protrofisine dönüş olacak ve sonuçta histidinsiz besiyerinde organizmalar üreyebilecektir. EMS veya akridin ile muamele sonucu HiS3 protrofisine dönüş 4 farklı şekilde olabilmektedir; **1) kromozom içi parça değişimi** (Intrachromosomal Exchange), **2) tek iplik yapışması** (Single-Strand Annealing), **3) eşit olmayan kardeş kromatid değişimi** (Unequal Sister Chromatid Exchange) ve **4) gen dönüşümü** (Gene Conversion= Sister Chtomatid Conversion)' dür. Bu da bu test sisteminin bir başka avantajı olarak görülebilir. Çünkü mikroorganizmaların kullanıldığı kısa süreli test sistemlerinden hiç birisi kromozom içi delesyon ve kromozomlar arası rekombinasyonu tespit edebilme kabiliyetinde değillerdir (Brennan and Schiestl 2004). Bahsi geçen mutajenlerin zararlı etkilerini azaltacak veya ortadan kaldırabilecek türlerden biri olan ve halk arasında nane olarak bilinen *Mentha* cinsinin, ishal ve dizanteri gibi hastalıklarda, bağırsak kurdu ya da solucanlarını düşürmede, mide krampını, gazı, sancıyı, bulantıyı gidermede kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalarda *Mentha*'nın sedatif, antidepresan, antimikrobiyal, antifungal, antiviral gibi biyolojik aktivitelerin olduğu tespit edilmiştir (Moreno *et al*. 2002; Güllüce *et al.* 2007; Kaya 2009).

Uçucu yağ ve polifenollerce zengin bu türün içerdiği polifenoller, özelilkle flavonoid grubu bileşikler (apigenin ve luteolin) ve fenolik asitler (rosmarinik asit) dir. Bu çalışmada kullanılan *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia'*dan; Luteolin-7-*O*-

glukozit, Luteolin-7-*O*-rutinozit, Luteolin-7-*O*-glukuronit, Apigenin-7-*O*-glukozit, Apigenin-7-*O*-rutinozit ve Rozmarinik asit maddeleri izole edilmiştir. İzole edilen bu maddelerin birçoğunun mutajenite/karsinojenite ve antimutajenite/antikarsinojenite çalışmaları yapılmamıştır. Ayrıca literatürlerde Apigenin-7-*O*-rutinozit ve Luteolin-7-O-glukoronit'e ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu türden elde edilen aktif bileşiklerin mutajenik ve antimutajenik etkileri Ames/*Salmonella* test sistemi ve maya delesyon test sistemi kullanılarak tespit edilmiştir.

Çalışma ekibimiz tarafından Ames/*Salmonella* testi ve WP2 testi yıllardır kullanılmakta olup her iki test sistemi de sadece nokta mutasyonuna dayalıdır. Maya delesyon test sistemi ise hem kromozom içi delesyon hem de kromozomlar arası rekombinasyonu tespit edebilmesinden dolayı Ames test sistemiyle beraber kullanımının gerekliliği düşünülerek bu çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmalar; bir mutajen/karsinojen maddenin oluşturacağı gen mutasyonunun çeşidini; kromozom içi delesyonu ve kromozomlar arası rekombinasyonu gözlemleme fırsatı verecektir. Benzer şekilde bir antimutajen/antikarsinojen maddenin bir mutajen/karsinojen maddeye vereceği cevap gen, kromozom içi ve kromozomlar arası etkileşimler düzeyinde belirlenebilecektir.

Bu nedenle, çalışmamızda yol haritamızı çizerken elde ettiğimiz etken maddelerin Ames ve maya delesyon test sistemleriyle mutajenik ve antimutajenik özelliklerini çalışmayı ve böylece bu etkenlerin eğer antimutajenik özellikleri varsa; hangi mutasyonlara karşı etkili olduklarını belirlemeyi hedefledik.

İlk olarak *S. cerevisiae* RS112 suşu kullanılarak yapılan çalışmalarda pozitif mutajen olarak kullandığımız EMS ve akridin mayalar için toksik olmayan dozu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre mutajenlerin 10 µg/ml EMS ve 15 µg/ml akridin dozlarında kullanılabileceği belirlenmiştir. EMS'nin 1, 2,5, 5, 7,5 ve 10 µg/ml akridin'in ise 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 ve 15 µg/ml dozları denenmiştir. 10 µg/ml'nin altındaki EMS ve 15 µg/ml'nin altındaki akridin dozlarının kromozom içi delesyon ve kromozomlar arası

parça değişimini istenen seviyede teşvik etmediği görülmüştür. Bu nedenle kullanılan EMS ve akridin dozları sırasıyla 10 µg/ml ve 15 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Ames testi verilerine göre kullanılan tüm etken maddelerin hiçbir konsantrasyonunda mutajenik etki gözlenmemiştir. Fakat Maya delesyon test sistemi kullanılarak yapılan mutajenite deneylerinde Luteolin-7-*O*-glukozit'in, Apigenin-7-O- glukozit'in ve Luteolin-7-*O*-glukuronit'in hiçbir konsantrasyonu kromozom içi delesyon ve kromozomlar arası rekombinasyonda teşvik edici olmadığı yani mutajenik etki göstermediği gözlenirken, Rosmarinik asit'in 16µM/ml doz uygulamasının kromozom içi delesyon ve kromozomlar arası rekombinasyonda teşvik edici olduğu, Apigenin-7-*O*-rutinozit'in 8µM/ml ve 16µM/ml dozlarında ve Luteolin-7-*O*-rutinozit'in 2µM/ml ve 4µM/ml dozlarında kromozomlar arası rekombinasyona neden olduğu yani mutajenik olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde çoğu ökaryotik ve prokaryotik sistemde birçok flavonoidin genetik hasarı indüklediği ifade edilmiştir (Stopper *et al.* 2005). Flavonoidlerin sebep olduğu genotoksik etkiler birçok farklı mekanizmayla gerçekleşebilir. Flavonoidlerin klastojenik etki göstermesi, bazı metabolik enzimleri inhibe etmesi, oksidatif strese neden olmaları bu mekanizmalardan bazılarıdır. Fergusun ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Luteolin, quercetin, genisitein, apigenin ve acetini 'de kapsayan 5 flavonoidin güçlü klastojenik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Flavonoidlerin klastojenik etkisi ile ilgili birçok farklı mekanizma rapor edilmiştir. DNA interkalasyonu, flavonoidlerin DNA ile yakın teması sonucu meydana gelir, fakat DNA interkalasyonu tek başına genotoksik olarak değerlendirilmez, DNA'ya yakınlık bazı flavonoidlerin otooksidasyona sebep olmalarını sağlar, bu otooksidasyon hücrede mevcut geçiş metalleri varlığında artar. Bu oksidatif süreç hem kinon/semikononları hem de ROS' u üretir. ROS, topo II izomeraz inhibitörü olmamasına rağmen genotoksik olarak bilinmektedir. Diğer taraftan flavonoidlerin kinona dönüşümleri sırasında meydana gelen alkilleyici ajan, topo II enziminin üzerinde bulunan tihol grubunu hedef alarak inhibe eder (Fergusun *et al.* 2007; Snyder and Gillies 2002). Serbest radikaller sadece DNA'yı değil aynı zamanda hücre için hayati önem taşıyan lipid ve proteinleri hedef alarak onları oksitler. Bazı antioksidan polifenoller de yüksek dozlarda prooksidan olarak davranarak oluşturdukları ikincil ürünlerle mutajen etki

gösterebilirler (Noel 2006; Ferguson 2001). Sonuç olarak, etken maddelerimizin mutajenitesiyle ilgili veriler mevcut literatürlerce desteklenmektedir.

Maya delesyon test sistemiyle yaptığımız deneyler sonucunda bazı etkenlerin farklı dozlarında antimutajenik etki yerine Ames *Salmonella* test sisteminde rastlanılamayan komutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Komutajenik etki gösteren etkenler, komutajenik etki gösterdikleri dozlar ve mutasyon tipleri şu şekildedir; Luteolin-7-*O*-glukozit'in 4µM/ml konsantrasyonunda hem EMS hem akridin tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonu, 2µM/ml ve 4µM/ml konsantrasyonlarında EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonu ve 4 µM/ml ve 8 µM/ml konsantrasyonlarında ise akridin tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonu arttırıcı yani komutajenik etki gösterdiği gözlenmiştir.

Apigenin-7-*O*- glukozit'in 2 µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda, 16µM/ml doz uygulamasında akridin tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda ve 2µM/ml ve 4 µM/ml konsantrasyonlarında EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda; Rosmarinik asitin ise 8µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda ve 8 µM/ml konsantrasyonda akridin tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda; Apigenin-7-*O*-rutinozitin 4 µM/ml ve 8µM/ml konsantrasyonlarında EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda ve 16µM/ml doz uygulamasında EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda komutajenik etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Geriye kalan etkenlerden Luteolin-7-*O*-rutinozit'in 4µM/ml ve 8µM/ml konsantrasyonlarında EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda, 8µM/ml ve 16µM/ml konsantrasyonlarında EMS tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda; Luteolin-7-*O*-glukuronit tüm konsantrasyonlarında EMS tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda, ve yine 4µM/ml, 8µM/ml, 16µM/ml konsantrasyonlarında akridin tarafından oluşturulan kromozom içi delesyonda, 4µM/ml

ve 16µM/ml konsantrasyonlarında ise sadece akridin tarafından oluşturulan kromozomlar arası rekombinasyonda komutajenik etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Luteolini de içine alan flavonoid grubu bileşiklerin mutajenik/komutajenik aktivitelerinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalarda bazı etken maddelerin belirli dozlarının komutajenik etki göstermesi literatür verilerine dayanarak şu sebeplerle açıklanabilir. Büyük olasılıkla mutajen maddelerin ve ilaçların metabolizması ile ilgili enzimlerin kararlığını devam ettiren süreçlerdeki dengeye olan etkilerinden kaynaklanmış olabileceği ifade edilmiştir. Mutasyonun oluşması, mutajenden bağımsız olarak kullanılan flavonoidin türüne ve dozuna bağlı olarak antimutajenik ve komutajenik etki gösterebilir (Snijman *et al*. 2007). Flavonoidlerin deneyde kullanılan EMS ve akridin mutajen maddelerinin aktivasyonundan sorumlu enzimleri indüklemesi, DNA da interkalasyon yapmaları ve P450 sitokrom enzimiyle etkileşimi sonucu oluşan bir ara ürünle bu etkiyi göstermiş olabilecekleri düşünülmektedir (Snijman *et al*. 2007).

Ames test sisteminde etken maddelerin antimutajenik aktivitelerini belirlemek için; sodyum azid uygulanan *S. typhimurium* TA1535 ve 9-AA uygulanan TA1537 suşları kullanıldı. Her bir etkenin stok çözeltisinden, 20µl/petri, 40 µl/petri, 60 µl/petri, 80µl/petri ve 100µl/petri olmak üzere dört ayrı doz uygulanmıştır.

Luteolin-7-O-glikozitin TA1535 suşu ile sodyum azide karşı yapılan antimutajenite deneyinde 40µl/petri doz uygulamasında %23,86; Apigenin-7-*O*-glikozit 60µl/petri konsantrasyonunda %31,19 ve Luteolin-7-*O*-rutinozoit 60µl/petri doz uygulamasında %23,76 inhibisyona sebep olduğu gözlenirken; bu suşun diğer etkenlere cevap vermediği belirlenmiştir.

TA1537 suşu ile 9-Amino akridin'e karşı yapılan antimutajenite deneylerinde, Luteolin-7-*O*-glikozitin 20µl/petri dozunda %84,03, Apigenin-7-*O*-glikozitin 80µl/petri dozunda %90,83, Rozmarinik asidin 40µl/petri dozunda %45,90, Apigenin-7-*O*-rutinozitin

80µl/petri dozunda %92,93, Luteolin-7-*O*-rutinozitin ise 40µl/petri dozunda %79,46 ve Luteolin-7-*O*-glukuronitin 80µl/petri dozunda %46,20 inhibisyona sebep olduğu gözlenmiştir.

Maya dellesyon test sisteminde EMS ve akridinin oluşturduğu kromozom içi delesyon ve kromozomlar arası rekombinasyona karşı etkenlerin antimutajenik etkisini belirlemek için her bir etkenin 2, 4, 8 ve 16 µM/ml konsantrasyonları kullanılmıştır.
EMS'nin oluşturduğu kromozom içi delesyona karşı etkenlerin göstermiş olduğu antimutajenik etki; Luteolin-7-O-glukozitin 16 µM/ml konsantrasyonunda %44,6, Apigenin-7-*O*-glukozitin 4 µM/ml de %6,9, Rozmarinik asidin 2 µM/ml de %37, Apigenin-7-*O*-rutinozitin 16 µM/ml de %6,5, Luteolin-7-*O*-rutinozitin 16 µM/ml de %50 inhibisyon olarak belirlenirken, kromozomlar arası rekombinasyon oranları ise; Apigenin-7-*O*-glukozitin 16 µM/ml de %40, Rozmarinik asidin 16 µM/ml de %51,6, Apigenin-7-*O*-rutinozitin 4 µM/ml de %53,9, Luteolin-7-*O*-rutinozitin 4 µM/ml de %47, Luteolin-7-*O*-glukuronitin 2 µM/ml de %67,5 şeklinde belirlenmiştir.

Öte yandan akridinin oluşturduğu kromozom içi delesyona karşı etkenlerin göstermiş olduğu antimutajenik etki; Luteolin-7-*O*-glukozitin 16 µM/ml de %53,9, Apigenin-7-*O*-glukozitin 4 µM/ml de %29,8, Rozmarinik asidin 2 µM/ml de %63,3, Apigenin-7-*O*-rutinozitin 8 µM/ml de %59,8, Luteolin-7-*O*-rutinozitin 4 µM/ml de %35,3, Luteolin-7-*O*-glukuronitin 2 µM/ml de %62,2 olarak belirlenirken, kromozomlar arası rekombinasyon oranları ise; Luteolin-7-*O*-glukozitin 16 µM/ml de %76,7, Apigenin-7-*O*-glukozitin 2 µM/ml de %57,7, Rozmarinik asidin 4 µM/ml de %33,4, Apigenin-7-*O*-rutinozitin 8 µM/ml de %75, Luteolin-7-*O*-rutinozitin 8 µM/ml de %70, Luteolin-7-O-glukuronitin 2 µM/ml de %36,4 oranında inhibisyon şeklinde belirlenmiştir.

Gen mutasyonlarını azaltan bileşiklere antimutajen denir. Bunlar üstlendikleri rollere bağlı olarak desmutajen veya bioantimutajen olarak adlandırılır. Desmutajenler promutajenleri mutajenlere dönüşümünü azaltma veya engelleme, bir mutajeni kimyasal yolla degrede etme veya detoksifiye enzimleri teşvik ederek bu mutajenin hücre DNA'sına ulaşmasını engelleme gibi çeşitli mekanizmalarla DNA lezyon seviyelerini

azaltarak mutasyonu baskılarlar. Bununla beraber biyoantimutajenler olarak adlandırılan bileşikler ise hatasız DNA tamir seviyesini artırarak veya mutasyonu giderme ve replikasyonu erteleme şeklinde hareket ederek DNA tamiri için seçenekler yaratırlar, neticede mevcut DNA lezyonlarını azaltılabilirler (Nakamura *et al.* 2008).

Bitkilerden elde edilen desmutajen ve biomutajen bileşiklerin antikarsinojenik/antimutajenik etkileri daha birçok farklı etki mekanizmaları ile açıklanabilir. Genotoksik etkileri azaltmak, sinyal taşınımını düzenlemek, antioksidan aktivite göstermek, serbest radikalleri gidermek, detoksifikasyon enzimlerini indüklemek, hücre döngüsünü kontrol ederek ve apoptozisi indükleyerek hücre proliferasyonu engellemek, mitoz bölünme de hayati öneme sahip hücre iskelet proteinlerini düzenlemek ve topo I ve II izomeraz enzimlerini inhibe etmek bu mekanizmalardan bazılarıdır. Bitki kökenli bu bileşikler DNA'yı direk etkileyen mutajenlerin etkilerini engelleme, onları inaktive etme gibi etkilerinin yanı sıra DNA'yı dolaylı etkileyen promutajen/prokarsinojenlerin metabolik aktivasyona uğramalarını engelleyerek bu bileşikler tarafından oluşabilecek olası hasarları önlemektedirler (Miadokova 2002).

Nichenam ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmalar sonucunda fenolik asitlerin koruyucu mekanizmalarını karsinojen maddenin alınımını, karsinojen oluşumunu ve aktivasyonunu engelleme, karsinojenleri detoksifiye veya deaktive etme, karsinojenin DNA'ya bağlanmasını engelleme ve DNA tamirinin doğruluğunu güçlendirme olarak tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra flavonoidler de karsinojenleri metabolik olarak aktive veya deaktive eden sitokrom p450 enzim sistemini (CYP450) düzenlerler. CYP450 enzimleri farklı metabolitik yolları indükleyerek kimyasal maddelerin karsinojenik özelliklerini CYP450 enzimleriyle baskılar. Yapılan *in vivo* çalışmalarda CYP450 enzim aktivitelerinin artışına bağlı olarak kimyasal kanserojenlerin kanser oluşturma etkisinde bir azalma olduğu ifade edilmiştir (Moon *et al.* 2006). DNA'ya kovalent bağlanarak karsinojen etki gösteren biyolojik olarak inaktif metabolitler ve kimyasal reaktif elekrofilik metabolitler CYP450 enzimleri ile metabolize edilirler. Sitokrom p450 enzimleri (faz I monooksijenaz enzimleri), ilaçların ve diğer yabancı bileşiklerin

metabolizmalarındaki rolleri nedeniyle çok iyi araştırılmışlardır. Bu enzim sisteminin düzenlenmesi farmakolojik ve toksikolojik etkiler üreten ksenobiyotiklerin metabolizmasını etkileyebilir. Son zamanlarda flavonoidlerin CYP450 sistemi üzerine olan düzenleyici etkisi hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (Lee *et al.* 2003).

Etken maddelerin Ames/*Salmonella* ve maya delesyon test sistemleriyle yapılan mutajenite/antimutajenite deneylerinde farklı sonuçların alınmış olması şu sebeplere bağlanabilir; Ames test sisteminde çalışılan bir etken maddenin sadece gen düzeyindeki mutajenik ve antimutajenik özellikleri araştırılabilinirken maya test sisteminde hem kromozom içi delesyon hem de kromozomlar arası rekombinasyon gözlenebilmektedir. Ayrıca Ames test sisteminde kullanılan *Salmonella* TA1535 ve TA1537 suşlarının tamir mekanizmaları hasarlıyken, mayada var olan tamir mekanizması nedeniyle kullanılan bir mutajen/antimutajen maddeye bakterilerin ve mayanın vereceği cevaplar da farklı olacaktır. Çünkü Ames testinde kullanılan bir mutajen madde tamir mekanizmasıyla değil, sadece eksojen bir faktör tarafından zararsız hale getirilebilir. Buna karşın Maya delesyon test sisteminde sorunsuz çalışan tamir mekanizması mutajen maddenin zararlı etkisini gidermede kullanılacağı için, eksojen orjinli olan antimutajenin mutajenle muamelesi sonucunda mutajen hasarının giderilmesi tamir mekanizmasıyla beraber veya tamir mekanizmasından bağımsız olarak gerçekleşebilir. Kullanılan organizmaların prokaryot ve ökaryot olmaları, dolayısıyla genom organizasyonlarının ve yerleşimlerinin farklı olması nedeniyle iki test sisteminin verdiği sonuçlar birbirinden farklı olabilmektedir. Bakteri genomu çıplak olduğundan sitoplâzmadaki kimyasal ajanların tümüne açıkken, maya genomu nükleus zarı ile çevrili olduğundan sitoplâzmadaki kimyasal ajanlara doğrudan maruz kalmaz. Dolayısıyla, bu iki test sistemlerinin yapıları gereği bir etken maddenin gen düzeyinde ve kromozom düzeyindeki etki mekanizmalarının farklı olması beklenen bir durumdur.

Cals ve arkadaşları (1993) yılında Ames ve Maya delesyon test sistemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada, bazı kimyasalların mutajenik özelliklerini tespit edebilme yeteneklerini Ames test sisteminde %20, Maya delesyon test sisteminde %60

olarak rapor etmişlerdir. Elde ettiğimiz mutajenite ve antimutajenite deney sonuçları yapılan literatür taramalarıyla da desteklenmektedir.

5.1. Öneriler

Flavonoidlerin aracı olduğu genotoksik ve antigenotoksik etkiler birçok farklı mekanizmayla gerçekleşebilir. Bu mekanizmaları tepit etmek için ilk olarak flavonoidlerin yapılarının zorunlu olarak bilinmesi gereklidir (Noel *et al.* 2006). Yaptığımız çalışmada kullanılan etkenlerin yapıları bilinmekle beraber, bu yapıların sahip oldukları fonksiyonel gruplar ve bu fonksiyonel grupların etki mekanizmasıyla ilgili elimizde mevcut bilgi bulunmamaktadır. Bu konuyla ilgili daha kapsamlı bilgi elde etmek etken maddelerin etki mekanizmasının aydınlatılmasında faydalı olacaktır.
Bunun yanı sıra yaptılan literatür taramaları sonucunda EMS ve Akridinin oksidatif strese neden olduğu tespit edilmiş olup (Buryskova *et al*. 2006; Titmenstein *et al.* 2000), EMS ve akridinin etkilerinin bertarafında etken maddelerin antioksidan özelliklerinin de etkili olduğu düşünülmektedir. Bu konuda kesin bilgi elde edebilmek için; Kullanılan etkenlerin Antioksidan özelliklerinin tespit edilmesi ve hiçbir madde uygulanmamış mayanın, sadece mutajen madde uygulanmış mayanın, mutajenle birlikte etken uygulanmış mayanın sahip olduğu antioksidan enzim seviyelerinin ölçülmesi faydalı olacaktır.

Ames test sisteminin ve Maya delesyon test siteminin verdiği sonuçların birbirinden farklı olmasının sebeplerinden biri de; Ames test sisteminin DNA tamir mekanizmasından yoksunken, Maya delesyon test siteminin DNA tamir mekanizmasına sahip olmasıdır. Bu yüzden, maya delesyon test sistemindeki deney gruplarının her birinde DNA tamirinden sorumlu enzimlerin seviyelerini ölçmek, etkenlerin etkilerinin ne kadarını DNA tamir mekanizmasına etki ederek gerçekleştirdikleri konusunda fikir verecektir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, kullanılan etkenlerin mutajenik, komutajenik ve antimutajenik etkilerinin olduğu gözlendi. Bu sonuçların hücre kültürü ortamında da uygulanarak antimutajenik maddelerin canlıda kullanımının güvenilirliğinin yanısıra antimutajen ve antimutajen olmayan etkenlerin antikanser özellikleri sorgulanmalıdır. Bu nedenle hücre kültüründe uygulamalarını yapmak faydalı olacaktır. Böylece etken maddenin antimutajen olmasa bile antikanser olma potansiyeli belirlenebilecektir.

KAYNAKLAR

Abbaszadeh, B., Valadabadi S. A., Farahani H. A.and Darvishi H. H., 2009. Studying of essential oil variations in leaves of *Mentha* species. African Journal of Plant Science, 3 (10), 217-221.

Acamovic, T., and Brooker, J. D., 2005. Symposium on 'Plants as animal foods: a case of catch 22?'Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. Proceedings of the Nutrition Society. 64, 403-412.

Alamed, J., Chaiyasit W., Mcclements D. J. and Decker E.A., 2009. Relationships Between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 2969-2976.

Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E., 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. The Proceedings of the National Academiy of Sciences, U.S.A., 70, 782-786.

Ames, B. N. Durston, W. E., Yamasaki, E., and Lee, F. D., 1973. Carcinogens aremutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. The Proceedings of the National Academiy of Sciences,U.S.A., 70. 2281-2285.

Archivio, M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. and Masella R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 43 (4), 348-361.

Askun, T., Tumen G., Satil F., Ates M., 2009. In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. Food Chemistry, 116, 289–294.

Aubrecht, J., Narla R. K., Ghosh P., Stanek J. and Uckun F.M., 1999. Molecular Genotoxicity Profiles of Apoptosis-Inducing Vanadocene Complexes. Toxicology and Applied Pharmacology, 154, 228–235.

Baba S, Osakabe N, Natsume M, Yasuda A, Muto Y, Hiyoshi K, Takano H, Yoshikawa T, Terao J. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of Perilla frutescens extract in humans. Europe Journel Nutrient. 44:1-9, 2005.

Backhouse , N., Rosales L., Apablaza C., Goity L., Erazo S., Negrete R., Theodoluz C., Rodriguez J., Delporte C., 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. Journal of Ethnopharmacology, 116, 263-269.

Bahçeci, Z., 2007. Moleküler Biyoloji. Göktuğ Basın Yayın Dağıtım ve Pazarlama, 323 s, Amasya.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Baudoux, D., Idaomar, M., 2006. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS.Mutation Research. 606,27-38.

Bandale, O. J., and Osheroff, N., 2007. Bioflavonoids as Poisons of Human Topoisomerase IIα and IIβ. Biochemistry 46, 6097-6108.

Bathurst, I. C., 1994. Protein Expression in Yeast as an Approach to Production of Recombinant Malaria Antigens. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 50, 20-26.

Baytop, T., 1984. Türkiyede bitkiler ile tedavi. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. No:40.

Bilgiçli, N., 2000. Melaslı Besin Ortamında Ekmek Mayası Üretim Parametrelerinin Tespiti Ve Sıvı Mayanın Likit Ferment Sistemi İle Ekmek Yapımında Kullanılma İmkanları.Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi, Konya.

Bovy, A., Schijlen, E., Hall, R. D., 2007. Metabolic engineering of flavonoids in tomato (Solanum lycopersicum): the potential for metabolomics. Metabolomics. 3, 399-412.

Brandsteterova, E., Caniova A. Z., 2009. Phenolic Acids in Natural Plants: HPLC Analysis Encyclopedia of Chromatography, 2, 1250-1265.

Brennan, R. J., and Schiestl, R.H., 2004. Detecting Carcinogens With the Yeast DEL Assay. Methods in Molecular Biology. 262. 111-24.

Briskin D. P., 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology*, 124(2), 507-514.

Buryskova, B., Hilscherova , K., Blaha, L., Marsalek, B.,Holoubek, I., 2006. Toxicity and Modulations of Biomarkers in Xenopus laevis Embryos Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their N-Heterocyclic Derivatives. Environmental Toxicology. 21(6).590-598.

Caligo, M. A., Bonatti F., Guidugli L., Aretini P. and Galli A. 2009. A Yeast Recombination Assay to Characterize Human BRCA1 Missense Variants of Unknown Pathological Significance. Officıal Journal Human Genome Variation Society, 30(1):123-33.

Campillo, M. S., Gabaldon J.A., Castillo J., García O. B., Del Baño M.J., Alcaraz M., Vicente V., Alvarez N., Lozano J.A., 2009. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. Food and Chemical Toxicology, 47, 386–392.

Carls, N., and Schiestl, R. H., 1994. Evaluation of the yeast DEL assay with 10 compounds selectedby the International Program on Chemical Safety for the evaluation of short-term tests for carcinogens. Mutation Research, 320. 293-303.

Caumont, A. B., Gordon A., Pichuantes, S., Nguyen, A. T., Litvak, S., Dupont C. H., 1996. Expression of functional HIV-1 integrase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* leads to the emergence of a lethal phenotype: potential use for inhibitor screening. Current Genetics, 29, 503-510.

Chizzola, R., Michitsch H. and Franz C., 2008. Antioxidative Properties of *Thymus vulgaris* Leaves: Comparison of Different Extracts and Essential Oil Chemotypes. Journal Of Agricultural Food Chemistry, 56, 6897-6904.

Cimanga, R. K., Kambu K., Tona L., Hermans N., Apers S., Tott´e J., Pieters L., Vlietinck A. J., 2006. Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. Journal of Ethnopharmacology, 107 (1), 83-90.

Clare, C., 1995. Mutation Assays in Bacteria. Methods in Molecular Biology. In Vitro Toxicity Testing Protocols. 43. 297-306.

Cragg, G. M., and Newman, D. J., 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure and Applied Chemistry. 77 (1). 7-24.

Craker, L. E., 2007. Medicinal and Aromatic Plants-Future Opportunities Reprinted from: Issues in New Crops and New Uses. J. Janick and A. Whipkey (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA.

Dastmalchi, K., Ollilainen V., Lackman P., Gennäs G. B., Dorman H. J. D., Järvinen P. P., Kauhaluoma J. Y. Hiltunen R., 2009. Acetylcholinesterase inhibitory guided fractionation of *Melissa officinalis* L. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17, 867–871.

Dilsiz, N., 2004. Moleküler Biyoloji. Palme Yayıncılık No: 279, 220 s, Ankara.

Dukic, M., Jakovljeviç, V., Mira, P., Gasiç, O., Szabo, A., 1996 Pharmacological Study of *Mentha longifolia* Phenolic Extracts. Pharmaceutical Biology 34 (5), 359-364.

Edenharder, R., Grünhage, D., 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. Mutation Research, 540, 1-18.

Edenharder, R., Grünhage, D., 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. Mutation Research, 540, 1-18.

Erkan, N., Ayranci G., Ayranci E., 2008. Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry, 110, 76-82.

Ersoya, S., Orhan I., Turan N. N., Sahann, G., Ark M., Tosun F., 2008. Endothelium-dependent inductionofvasorelaxationby *Melissa officinalis* L. ssp. officinalis in ratisolated thoracicaorta. Phytomedicine, 15, 1087–1092.

Fecka, I. and Turek S., 2007. Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage Journal Of Agricultural Food Chemistry, *55*, 10908–10917.

Fenech ,M., 2008. The Micronucleus Assay Determination of Chromosomal Level DNA Damage Methods in Molecular Biology, 410, 185-216.

Ferguson, L. R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability Mutation Research 475, 89-111.

Ferguson, L. R., Philpott, M., and Karunasinghe, N., 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. Toxicology. 198, 147-159.

Fratianni, F., Luccia,A. D., Coppola, R., Nazzaro, F., 2007. Mutagenic and antimutagenic properties of aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated Tuber aestivum black truffle: A preliminary study. Food Chemistry 102. 471-474.

Fritsche , J., Beindorff C.M., Dachtler M., Zhang H., Lammers J. G., 2002. Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. European Food Research And Technology, 215, 149–157.

Furtado, M.A., Fernandes de Almeida L. C., FurtadoR. A., CunhaW. R., Tavares D. C., 2008. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. Mutation Research, 657, 150-154.

Georgiev, M. I.,Weber, J., and Maciuk, A., 2009. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. Applied Microbiology and Biotechnology. 83,:809-823.

Gönlüm, A., 1994. Maya ve Maya Benzeri Fungusların Klasik Yöntemler ve Hazır Kit Sistemleri ile Karşılaştırmalı İdentifikasyonu. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Başkanlığı. Ankara.

Gu, L., Wua T., Wang Z., 2009. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. Acuta. LWT - Food Science and Technology, 42,131–136.

Gulluce, M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. Food Chemistry, 103, 1449-1456.

Hitzeman, R. A., Hagie F. E., Levine H. L., Goeddel D. V., Ammerer G., and Hall B. D., 1981. Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature, 293 (5835), 717-22.

Hollis, R. P., Killham K. and Glover L. A., 2000. Design and Application of a Biosensor for Monitoring Toxicity of Compounds to Eukaryotes. Applied and Environmental Microbiology, 66, (4),1676–1679.

Hossain, M. A., Salehuddin S. M., Kabir M. J., Rahman S.M.M., Rupasinghe H.P.V., 2009. Sinensetin, rutin, 30-hydroxy-5, 6, 7, 40-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit. Food Chemistry, 113, 185-190.

Howlett, N. G., Schiestl,R.H., 2004. Nucleotide excision repair deficiency causes elevated levels of chromosome gain in *Saccharomyces cerevisiae*. DNA Repair 3.127-134.

Inoue, T., Sugimoto Y., Masuda H. and Kamei C., 2002. Antiallergic Effect of Flavonoid Glycosides Obtained from *Mentha piperita* L. Biological & Pharmaceutical Bulletin**,** 25 (2), 256-259

Jeong , C. H., Choi G. N., Kim J. H., Kwak J.H., Kim D. O., Kim Y. J., Heo H. J., 2010. Antioxidant activities from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum*. Food Chemistry, 118, 278–282.

Jeong, J. Y. and Jue D. M., 2000. Murine pro-tumor necrosis factor expressed in *Saccharomyces cerevisiae* HF7c localizes to membrane/particulate. Experimental and molecular medicine, 32, (2), 61-66.

Jhoo, J. W., Ang, C. Y. W., Heınze, T. M., Deck, J., Schnackenberg, L. K., Beger, R. D., Dragull, K., And Tang, C. S., 2007. Food chemistry and toxicology. 72(2):120-125.

Jin, M., Yang J. H., Lee E., Lu Y., Kwon S., Son K.H., Son J. K. and Chang H. W. 2009. Antiasthmatic Activity of Luteolin-7-*O*-glucoside from *Ailanthus altissima* through the Downregulation of T Helper 2 Cytokine Expression and Inhibition of Prostaglandin E2 Production in an Ovalbumin-Induced Asthma Model. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 32 (9), 1500-1503.

Jorgensen, K. V. Clayton, J.W. and Price, R. L., 1987. Evaluation of aflotoxin B mutagenesis: Glutathione-S-transferase to the *Salmonella* mutagenicity assay. Environ. Mutagen., 9, 411-419.

Kadıoğlu, A., Demirbağ, Z., Şahin, B., 2008.Temel Biyoloji, Gündüz Ofset Matbaacılık Trabzon.

Kaleeswaran, S., Sriram, P., Prabhu, D., Vijayakumar, C., and Mathuram, L. N., 2009. Anti- and Pro-Mutagenic Effects of Silymarin in the Ames Bacterial Reverse Mutation Assay. Phytotherapy Research. 23, 1378-1384.

Kanatt, S. R., Chander, R. and Sharma, A. 2007. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. Food chemistry, 100(2), 451-459.

Kaya, A., 2009. Yumurtacı Tavuk Rasyonlarına Değişik Oranlarda Katılan Adaçayı (*Salvia Officinalis*), Kekik (*Thymbra Spicata*), Nane (*Menthae Piperitae*) Ekstraktları İle Vitamin E' Nin Performans, Yumurta Kalitesi, Duyusal Özellikler, Yumurta Sarısı Tbars Değerleri Ve Dışkıda *Escherichia Coli* Yoğunluğu Üzerine Etkileri. D. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kim, N. M. Kim J., Chung H.Y. and Choi J. S., 2000. Isolation of Luteolin 7-*O*-rutinoside and Esculetin with Potential Antioxidant Activity from the Aerial Parts of *Artemisia montana* Archives of Pharmacal Research, 23, (3), 237-239.

Kirpnick, Z., Homiski, M., , Rubitski, E., Repnevskaya, M., Howlett,N., Aubrecht, J., Schiestl, R. H., 2005. Yeast DEL assay detects clastogens. Mutation Research 582, 116–134.

Kjeldsen, T., 2000. Yeast secretory expression of insulin precursors. Applied Microbiology and Biotechnology**,** 54 (3), 277-86.

Ko, F. N., Huag T. F., and Teng C. M., 1991. Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from Apium graveolens in rat thoracic aorta. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1115 (1). 69-74.

Kobayashi, K., Kuwae S., Ohya T., Ohda T., Ohyama M., Ohi H., Tomomitsu K. and Ohmura T., 2000. High-Level Expression of Recombinant Human Serum Albumin from the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris* with Minimal Protease Production and Activation Journal Of Bioscience and Bioengineering 89, (1), 55-61.

Konuk, M., 2004. Moleküler biyoloji : önemli notlar. nobel yayınları. 613.

L. Z., Liu, Fang, J., Zhou, Q., Hu, X., Shi, X., and Jiang B. H., 2005. Apigenin Inhibits Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in Human Lung Cancer Cells:Implication of Chemoprevention of Lung Cancer. Molecular Pharmacology. 8.635–643.

Lawrence, B. M., 2007. Mint The Genus *Mentha*.

Lee, J., Jung E., Koh J., Kim Y. S., Park D., 2008. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis Journal of Dermatology, 35, 768-771.

Lee, A. J. Caı, M. X. Thomas, P. E. Conney, A. H. And Zhu, B. T. 2003. Characterization of the oxidative metabolites of 17 beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome P450 isoforms. Endocrinology, 144(8). 3382-3398.

Lee, H. Y., Cho H. S., Park E., Kim S., Leeb S. Y., Kim C.S., Kim D. Y., Kima S.Y., Chun H. S., 2008. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. Toxicology, 250, 109-115.

Levin, D. E., Yamasaki, E., Ames, B.N., 1982, A new *Salmonella* tester strain, TA97for the detection of framshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hotspot, Mutat. Res., 94, 315-330.

McCann, J., and Ames, B. N., 1976. Dıscussıon Paper: The Detectıon Of Mutagenıc Metabolıtes Of Carcınogens In Urıne Wıth The Salmonella/Mıcrosome Test. Annals of the New York Academy of Sciences.269, 21-25.

Miadokova, E., Nadova, S., Vlckova, V., Duhova, V., Kopaskova, M., Cipak, L., Rauko, P., Mucaji, P., and Grancai, D., 2008. Phytotherapy Research. 22. 77-81.

Miadokova, E., Masterova, I., Vlckova, V., Duhova, V., Toth, J., 2002. Antimutagenic potential of homoisoflavonoids from Muscari racemosum. Journal of Ethnopharmacology. 81.381-386.

Miyanohara, A. L., Imamura T., Araki M., Sugawara K., Ohtomo N., and Matsubara K., 1986. Expression of Hepatitis B Virus Core Antigen Gene in *Saccharomyces cerevisiae*: Synthesis of Two Polypeptides Translated from Different Initiation Codons. Journal Of Virology, 59 (1), 176-180.

Miyazawa, M., and Hisama, M., 2003. Antimutagenic Activity of Flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 67 (10) 2091-2099.

Moon,Y.J., Wang, X., Morris, M. E., 2006. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicology in Vitro. 20.187-210.

Moreno, L., Bello R., Yufera E.P. and Esplugues J., 2002. Pharmacological Properties of the Methanol Extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. Phytotherapy Research, 16, 10-13

Nakamura, Y., Matsuo, T., Okamoto, S., Nishikawa, A., Imai, T., Park, E.Y., and Sato, K., 2008. Antimutagenic and Anticarcinogenic Properties of *Kyo-yasai*, Heirloom Vegetables in Kyoto. Genes and Enviroment. 30, 41-47.

Negi, P. S., Jayaprakasha, G.K., Jena, B. S., 2003. Antioxidant ve antimutagenic activities of pomogrenate peel extracts. Food Chemistry, 80, 393-397.

Noel, S., Kasinathan, M., and Rath, S. K., 2006. Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. Toxicology in Vitro 20,1168-1172.

Öner, C., Sümer, S., Öner, R., Öğüş, A. ve Açık, L., 2009. Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık No: 506, 677 s, Ankara.

Özbek, T., 2006. Doğuanadolu Tıbbı Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/*Salmonella* Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması.Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.

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.

Patel, D., Shuklaand S., Gupta S., 2007. Apigenin and cancer chemoprevention:Progress, potential and promise (Review). International Journal Of Oncology, 30, 233-245.

Rahimuddin, S. A., Khoja SM., Zuhair M. M., Howell N. K., Brownb J.E., 2007. Inhibition of lipid peroxidation in UVA-treated skin fibroblasts by luteolin and its glucosides. European Journal Of Lipid Science And Technology, 109, 647-655.

Ramawat K. G., Dass S., Mathur M., 2009. The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine. Springer, Berlin, 7-32.

Rispail, N., Nash, R., and Webb, K. J., 2005. Secondary metabolite profiling. Lotus japonicus Handbook. 341-348.

Rodriguez, C. E., Sobol, Z., Schiestl, and R. H., 2008. 9,10-Phenanthrenequinone induces DNA deletions and forward mutations via oxidative mechanisms in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Toxicology in Vitro. 22, 296-300.

Romano , C. S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A. A., Moreno S., 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives Food Chemistry, 115, 456-461.

Saxena, V., and Dhole, T. N., 2008. Preventive strategies for frequent outbreaks of Japanese encephalitis in Northern India. Journal of Biosciences. 33(4) 505-14.

Schiestl, R. H. 1993. Nonmutagenic Carcinogens Induce Intrachromosomal Recombinationin Dividing Yeast Cells. Environ Health Perspect. 101. 179-184.

Sherman F., 2002. Getting Started with Yeast. Methods Enzymology. 350, 3-41.

Silva, J. P., Gomes A. C., Coutinho O. P., 2008. Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells, European Journal of Pharmacology, 601, 50-60.

Slusarczyk, S., Hajnos, M., Wozniak, K. S., and Matkowski, A., 2009. Antioxidant activity of polyphenols from Lycopus lucidus Turcz. Food Chemistry. 113.134-138.

Snijman, P. W., Swanevelder, S., Joubert, E., Green, I. R., and Gelderblom, W.C.A., 2007. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose–response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. Mutation Research 631, 111-123.

Snyder, R. D., and Gillies, P.J., 2002. Evaluation of the Clastogenic, DNA Intercalative, and Topoisomerase II-Interactive Properties of Bioflavonoids in Chinese Hamster V79 Cells. Environmental and Molecular Mutagenesis. 40,266-276.

Sobol, Z., Engel, M. E., Rubitski, E., Ku, W.W., Aubrecht, J., and Schiestl, R.H., 2007.Genotoxicity profiles of common alkyl halides and esters with alkylating activity. Mutation Research 633. 80-94.

Srivastava, J. K. and Gupta S., 2007. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Chamomile Extract in Various Human Cancer Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 9470-9478.

Sroka, Z., Fecka, I., and Cisowski W., 2005. Antiradical and Anti-H2O2 Properties of Polyphenolic Compounds from an Aqueous Peppermint Extract. Zeitschrift für Naturforschung C, 60 (11-12), 826-32.

Stopper, H., Schmitt, E., Kobras, K., 2005. Genotoxicity of phytoestrogens. Mutation Research 574,139-155.

Strandberg, G.W,. Shumate S. E. and Parrott J. R., 1981. Microbial Cells as Biosorbents for Heavy Metals: Accumulation of Uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Applied And Environmental Microbiology, 41 (1), 237-245.

Swarup, V., Ghosh J., Ghosh S., Saxena A. and Basu A., 2007. Antiviral and Anti Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid in an Experimental Murine Model of Japanese Encephalitis. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 51, (9) 3367-3370.

Terziyska, A., Waltschewa, L., Venkov, P., 2000. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental Pollution. Environmental Pollution 109. 43-52.

Tirmenstein, M. A., Nicholls-Grzemski, F. A., Zhang J. G., and Fariss, M. W., 2000. Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. Chemico-Biological Interactions. 127(3). 201-217.

Tomić, A., Petrović S., Pavlović M., Trajkovski B., Milenković M., Vučićević D. and Niketić M., 2009. Antimicrobial and antioxidant properties of methanol extracts of two *Athamanta turbith* subspecies. Pharmaceutical Biology. 47(4), 314-319.

Van Lanen, J. M., Broquist H.P., Johnson M.J., Baldwix I.L. and Peterson W.H., 1942. Synthesis of Vitamin B, by Yeast. Journal Of Industrial And Engineering Chemistry,34 (10), 1244-1247.

Vattem, D. A., Jang, H. D., Levın, R., and Shetty, K., 2005. Synergism Of Cranberry Phenolıcs With Ellagic Acid And Rosmarinic Acid For Antimutagenic And DNA Protection Functions. Journal of Food Biochemistry. 30. 98-116.

Wallace, R. J., 2004. Symposium on 'Plants as animal foods: a case of catch 22?'Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proceedings of the Nutrition Society. 63, 621-629.

Zhou, J. L., Qian Z.M., Luo Y. D., Tang D., Chen H., Yi L. and Li P., 2008. Screening and mechanism study of components targeting DNA from the Chinese herb *Lonicera japonica* by liquid chromatography/mass spectrometry and fluorescence spectroscopy. Biomedical Chromatography, 22, 1164-1172.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Malatya Akçadağ ilçesinde doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Malatya'da tamamladı. 2000 yılında Malatya Meslek Yüksek Okulu Endüstriyel Elektronik programından mezun oldu. Aynı yıl MEB'e bağlı çeşitli ilköğretim okullarında ücretli İngilizce öğretmenliği yaptı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden bölüm birincisi olarak mezun oldu. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsün'de yüksek lisans eğitimine başladı. ERASMUS öğrenci değişim programı kapsamında 2008 yılında 6 ay süreyle Lund Üniversitesinde (İsveç) çalışmalarda bulundu.