

*Alyssum virgatum* Nyár. SULU EKSTRELERİNİN  
MUHTEMEL MUTAJENİK ETKİLERİNİN  
AMES TEST YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Emine Sevil ANAR  
DANIŞMANLAR  
Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU  
Prof. Dr. Muhsin KONUK  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
Ocak 2013

Bu tez çalışması 11.FEN.BİL.12 numaralı proje ile AKÜ-BAPK tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

*Alyssum virgatum* Nyár. **SULU EKSTRELERİNİN MUHTEMEL MUTAJENİK  
ETKİLERİNİN AMES TEST YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Emine Sevil ANAR**

**DANIŞMAN**

**I. Danışman: Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU**

**II. Danışman: Prof. Dr. Muhsin KONUK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Ocak 2013**

## TEZ ONAY SAYFASI

Emine Sevil ANAR tarafından hazırlanan “*Alyssum virgatum* Nyár. Sulu Ekstrelerinin Muhtemel Mutajenik Etkilerinin Ames Test Yöntemi ile Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 23/01/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji **Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

**İkinci Danışman** : Prof. Dr. Muhsin KONUK

**Başkan** : Prof. Dr. Cevdet UĞUZ İmza  
Afyon Kocatepe Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi,

**Üye** : Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU İmza  
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

**Üye** : Prof. Dr. Muhsin KONUK İmza  
Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi

**Üye** : Prof. Dr. İbrahim EROL İmza  
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

**Üye** : Doç. Dr. S. Elif KORCAN İmza  
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN

Enstitü Müdürü

## **BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI**

**Afyon Kocatepe Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

**23/Ocak/2013**

**Emine Sevil ANAR**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### *Alyssum virgatum* SULU EKSTRELERİNİN MUHTEMEL MUTAJENİK ETKİLERİNİN AMES TEST YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Emine Sevil ANAR

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

**I. Danışman:** Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

**II. Danışman:** Prof. Dr. Muhsin KONUK

Bilim ve teknolojinin gelişmesi sonucu son zamanlarda hayatımıza katılan fiziksel ve kimyasal maddeler bazı sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Günümüzde yeni kimyasal ürünler hala yaşamımıza katılmaktadır. Bu ürünleri kullanmadan önce insan sağlığına etkilerinin incelenmesi gerekir. Diğer taraftan, günümüzde alternatif tıbbın önemli bir kısmı olan bitkiler ve ekstraları antimutajenik etki gösterirler. Ancak bitki ekstralarının mutajenik etki de gösterdiği bilinmektedir. Çeşitli *in vitro* test sistemleri mutajenik etkilerin değerlendirilmesi için kullanılır. Bu araştırmada *Alyssum virgatum* bitkisinin sulu ekstralarının muhtemel mutajenik etkisi araştırılmıştır. Mutajenite *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile Ames test yöntemi kullanılarak hem metabolik enzimlerin kullanıldığı S9'lu ortamda hem de S9'suz ortamda araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile beraber karşılaştırılmıştır ve mutajenite belirlenememiştir.

2013, ix + 48 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Alyssum virgatum*, *Brassicaceae*, Mutajenite, Ames testi

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

### INVESTIGATION OF AQUEOUS EXTRACTS OF *Alyssum virgatum* MUTAGENIC EFFECTS BY AMES TEST

Emine Sevil ANAR

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Sciences

Biology Program

**I. Supervisor:** Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

**II. Supervisor:** Prof. Dr. Muhsin KONUK

Physical and chemical agents are joining to human life as a result of scientific and technological developments. These agents cause some health problems to human life. Nowadays newest chemical products still take part in our daily life. Before using these products, an investigation of the effects of these substances to humans health should be carried out. On the other hand nowadays it is well known that plants and their extracts are important part of alternative medical and they show antimutagenic effect against mutagenic chemicals and enviromental factors, so they prevent mutations. But, at the same time plant extracts show mutagenic effects. Various *in vitro* test systems have used for determination of their mutagenic effects. In the present study, possible mutagenic effects of water extracts of *Alyssum virgatum* have been investigated with Ames test. In this study, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 strains were employed. Therefore, both test strains were tested in the absence or presence of S9 metabolic activation. Results of experiments were compared with positive and negative control groups data. Consequently, the mutagenicity of water extracts of *Alyssum virgatum* was not observed in our study.

**2013, ix + 48 pages**

**Key Words:** *Alyssum virgatum*, *Brassicaceae*, Mutagenicity, Ames test

## TEŐEKKÜR

Bilimsel önderliği ile yolumuzu aydınlatan değerli hocam Prof. Dr. Muhsin KONUK'a teőekkür ederim.

Bu çalıőmanın, yürütülmesinde, bilgilerini, yardım ve önerilerini benden esirgemeyen ve bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU'na, çalışma konumun seçilmesinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Recep LİMAN'a, deneylerin yapılması, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aőamasında yapmış olduğu büyük katkılarında dolayı tezimin her aőamasında öneri ve eleőtirileriyle yardımını gördüğüm değerli hocam sayın Araő. Gör. Yasin EREN'e teőekkürü bir borç bilirim

Çalıőmanın laboratuvar aőamasında yardımcı olan ve emeği geçen Araő. Gör. Dilek AKYIL, biyolog arkadaşlarım İmren ÇALIK ve Harun ÜSTÜNOĞLU' na teőekkürlerimi sunuyorum.

Her konuda benden desteklerini esirgemeyen ve varlıkları ile bana güç veren aileme teőekkür ederim.

Emine Sevil ANAR

AFYONKARAHİSAR, 2013

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ÖZET .....	i
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VII
RESİMLER DİZİNİ .....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	IX
1. GİRİŞ .....	1
2.1. TOKSİK MADDELER VE BİTKİLERİN TOKSİK ETKİLERİ .....	4
2.2. MUTASYON .....	5
2.2.1. Gen Mutasyonları .....	5
Transisyon (Geçiş) .....	6
Transversiyon (Çapraz geçiş) .....	6
Anlamsız (Nosense) Mutasyonlar .....	6
Doğal (Neutral) Mutasyonlar .....	7
Sessiz (Silent) Mutasyonlar .....	7
2.3. MUTAJENİK VE KANSEROJENİK MADDELERİN SAPTANMASI .....	8
2.4. MUTAJENİTE TESTLERİ .....	9
2.4.1. Yapısal Kromozom Bozulma Testi (chromosome aberration = CA) .....	10
2.4.2. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Yöntemi .....	11
2.4.3. Mikronukleus (MN) Testi .....	11
2.4.4. UDS Yöntemi .....	12
2.4.5. Comet Yöntemi .....	12
2.4.6. S.O.S Kromotest .....	12
2.4.7. Transformasyon Yöntemi .....	12
Histidin gereksinimi kontrolü .....	14
UvrB mutasyonu kontrolü .....	15
Rfa mutasyonu kontrolü .....	15
R-faktörü .....	15
3. MATERYAL VE METOT .....	17
3.1. MATERYAL .....	17
3.1.1. Bitki Ekstraksiyonu Yöntemi .....	17
3.1.2. <i>Salmonella typhimurium</i> Test Suşları .....	17
3.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları .....	18
3.2. METOD .....	25
3.2.1. Salmonella Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması ....	25

3.2.2. <i>Salmonella</i> Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması.....	25
3.2.3. <i>Salmonella</i> Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması .....	26
3.2.3.1. Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi .....	26
3.2.5. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması.....	28
3.2.6. S9 Karışımının Hazırlanması .....	28
3.2.7. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı .....	28
3.2.7.1. S9'suz Deney .....	29
3.2.7.2. S9'lu (+) Deney .....	29
4. BULGULAR .....	30
4.1. GENETİK İŞARETLERİN KONTROLÜ .....	30
4.2. SPONTAN OLARAK GERİYE GÖNÜŞ SIKLIĞININ KONTROLÜ.....	33
4.3. SIVI KÜLTÜRÜN ML 'SİNDEKİ BAKTERİ SAYISININ BELİRLENMESİ .....	33
4.4. TEST MADDELERİNİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN SAPTANMASI .....	33
4.5. AMES MUTAJENİTE TESTİNİN YAPILIŞI.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
6. KAYNAKLAR.....	39
7. ÖZGEÇMİŞ.....	48

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

---

°C	: Santigrad derece
ml	: Mililitre
Mg	: Miligram
g	: Gram
mμ	: Milimikron
μl	: Mikrolitre
dk	: Dakika
cm	: Santimetre
μg	: Mikrogram
sn	: Saniye

### Kısaltmalar

---

2-AA	: 2-aminoanthracene
2-AF	: 2-aminofluorene
CA	: Chromosome aberration
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
MGA	: Minimal Glukoz Agar
HBA	: Histidin/biyotin/ampisilin
NB	: Nutrient Broth
NA	: Nutrient Agar
HB	: Histidin/biyotin
rpm	: Rotation Per Minute
UV	: Ultra Viyole
LPS	: Lipopolisakkarit
WHO	: World Health Organization
MN	: Mikronükleus
NPD	: 4-nitro-o-fenilendiamine
SA	: Sodyum azid
SCE	: Sister Chromatid Exchange

---

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil4.1</b>	<i>S.typhimurium</i> TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları .....31
<b>Şekil4.2</b>	<i>S.typhimurium</i> TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları.....31
<b>Şekil4.3</b>	<i>S.typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suslarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçlar.....31
<b>Şekil 4.4</b>	<i>S.typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suslarının <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolü sonuçlar.....32
<b>Şekil 4.5</b>	<i>S.typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suslarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları.....32
<b>Şekil 4.6</b>	<i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suslarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları .....32

## RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

<b>Resim 1:</b> <i>Alyssum virgatum</i> Nyár görünümü .....	3
---	---

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 2.1</b> Kimyasal mutajen/kanserojen maddelerin saptanmasında kullanılan kısa zamanlı testlerden bazıları .....	10
<b>Çizelge 2.2</b> <i>Salmonella typhimurium</i> mutant suşlarının genetik özellikleri.....	14
<b>Çizelge 4.1</b> TA98 ve TA100 suşları ile yapılan AMES testi sonuçları.....	35

## 1.GİRİŞ

Ülkemiz, Asya ve Avrupa kıtaları arasında geçiş konumunda olması, yeryüzü şekilleri ve farklı bitki yaşama alanlarını içermesi nedeni ile zengin bir floristik yapıya sahiptir (Çırpıcı 1987). Ilıman kuşak içerisinde bulunan Türkiye, sahip olduğu bitki çeşitliliği açısından çevresinde yer alan birçok ülkeden farklılık gösterir. Türkiye’de yayılış gösteren bitki türlerinin sayısı, Avrupa kıtasında yayılış gösteren bitki türlerinin sayısına yakındır. Son yıllarda yeni türlerin keşfi ile Türkiye’nin 12.000 civarında bitki taksonuna sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Erik 2004). İklim özelliklerinde kısa mesafelerde ortaya çıkan değişiklikler, morfolojik özelliklerinden kaynaklanan çeşitlilikler, toprak tiplerinin farklılıkları gibi çok sayıda coğrafik faktör, bitki formasyonlarının farklılaşmasına ve tür içi çeşitlemesine yol açmaktadır (Avcı 2005).

Türkiye, endemik bitkilerinin zenginliği bakımından dünyanın önemli ülkelerinden birisidir. Endemik takson sayısı 3000’den fazladır ve endemizm oranı %34.4’dür (Özhatay *et al.* 2005). *Brassicaceae* familyasının üyelerinin çoğu ılıman kuzey yarıkürede yayılış gösterir. *Brassicaceae* familyası dünyada yaklaşık 338 cins ve 3700 türle temsil edilir (Avcı 2005).

*Brassicaceae* (*Cruciferae*) familyasının bazı üyeleri sebze ve yem bitkisi olarak, bazıları tohumlarından yağ elde etmek amacıyla, bir kısmı ise süs bitkisi olarak yetiştirebilme potansiyeline sahip olup ekonomik bakımdan değerli bitkilerdir (Kürşat 1999). Önemli cinsler ve türler içeren *Brassicaceae* familyası tek yıllık veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Tohumlarından yağ ve zehirli hardal gazı elde edilir. İlaç sanayinde de kullanılmaktadırlar (Yıldırım 2001).

Dünya Sağlık Örgütü’nün tahminlerine göre (WHO) temel sağlık ihtiyaçları için gelişmekte olan ülkelerin nüfusunun % 80’inin geleneksel ilaçları, çoğunlukla bitkisel ilaçlara dayanır (Alison and Flatt 1991; Blumental *et al.* 1998).

*Brassicaceae* familyasına giren *Alyssum* L. (Kuduz otu) cinsi Türkiye florası’nın büyük cinsleri arasında yer almakta ve 107 tür ve türaltı taksonla temsil edilmektedir. *Alyssum* cinsi sistematik olarak incelenmiş. Çok az sayıda Angiospermae (Kapalı Tohumlu) bitkisi kuru yapraklarında nikelin (Ni) 1000 µg/g (0,1 %) konsantrasyonundan fazlasını biriktirme kapasitesine sahiptir ki böyle türlere aşırı biriktiriciler denir. *Alyssum*

türlerinin çoğu Ni biriktirmektedir. Türlerin yoğunluğu Dogu Akdeniz'de fazladır (Babaoğlu 2004). Bazı *Alyssum* türlerinin kültürü yapılmış olup park ve bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Beckett 1985).

Bilim ve teknolojide özellikle son yıllarda yaşanan hızlı gelişme toksisite olarak adlandırdığımız, kimyasalların organizmada oluşturduğu hasarın belirlenmesi ve toksisite mekanizmalarının hücresel, biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılmasında da yardımcı olmuştur. Metabolizmaya giren tüm toksinler hedefledikleri doku ya da organlarda hasar yaparlar. Özellikle ağır metallerin insanda belirli dokularda etkilerini gösterdikleri bilinmektedir (Int. Kyn. 1).

Kısa zamanlı bakteriyel test sistemleri, karmaşık kimyasal örneklerdeki mutajenik bileşiklerin ve metabolik aktivasyon sonucu ortaya çıkan reaktif bileşenlerin saptanmasında analitik araçlar haline gelmişlerdir (Hedenstedt *et al.* 1977).

*Salmonella*-mikrozom testi başlıca iki varsayıma dayanmaktadır. Bunlardan birincisi, bakteri DNA'sı ile etkileşime girerek mutasyona neden olan ajanların, insan dahil diğer türlerde de muhtemel mutasyonlara yol açma yeteneğinde olabilecekleridir. Bu konudaki ikinci varsayım, mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur (Özbek 2006).

Deneyimizde kullanılan TA98 suşu çerçeve kayması mutasyonu, TA100 suşu ise baz değişimi mutasyonu içermektedir. *Salmonella*/mikrozom test sisteminde denenen kimyasal maddeye mutajen denilebilmesi için histidin prototroflarının sayısının, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katı olması gerekmektedir. Bu sayı, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının iki katından az olup, doza bağlı bir artış söz konusu olursa yine bu maddeye mutajen denilebilir (Dean 1985).

Çevremizdeki mutajen ve kanserojen maddelerin etkisinden korunmamız için bu özelliğe sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin belirlenmesi gerekir. Bitki ekstraktları farklı organizmalarda farklı mutajenik ve sitotoksik etkiler gösterebildiği gibi, mutajenik etki oluşturan etmenlere karşı da antimutajenik etki gösterebilmektedir.

Bu çalışmamın amacı ülkemizde endemik olarak bulunan *Alyssum virgatum* bitki ekstralarının kısa zamanlı test sistemlerinden olan *Salmonella*/mikrozom testi ile mutajenik etkilerini araştırmaktır. *A. virgatum* görünümü Resim 1’de verilmiştir.



**Resim 1:** *Alyssum virgatum* Nyár görünümü

## 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

### 2.1. Toksik Maddeler ve Bitkilerin Toksik Etkileri

Bir gen içerisinde DNA dizisinde meydana gelen herhangi bir değişim mutasyon olarak adlandırılmaktadır. Fenotipte meydana getirdiği değişimler nedeniyle morfolojik olarak tanımlanabilir niteliktedir. Mutasyonların anlaşılması aynı zamanda bir genin anlaşılmasına yardımcı olacağından önem taşımaktadır. Mutasyonlar doğal olarak ortaya çıkabildiği gibi yapay olarak da oluşturulabilir (Ahloowalia *et al.* 2004).

DNA molekülünde mutasyonlara yol açan ajanlar ya da mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır (Kirsch-Volders *et al.* 2003, Mateuca *et al.* 2006).

Birçok bitki ve hayvan korunma veya saldırı amacıyla toksik maddeler üretmektedirler. Hayvan, bitki ve bakteri orjinli doğal toksinler, farklı toksik etkileri bulunan ve insan zehirlenmesinde önemli bir sebep olan çeşitli kimyasal tipleri kapsar. Bazı insanlar doğa güvenlidir teorisini öne sürerler fakat bu gerçekten çok uzaktır. Doğal toksinler yeme yoluyla, yiyeceklerde kontaminasyon oluşturarak veya bazı canlıların sokmasıyla toksik etkisini gösterir (Timbrell 2002).

Bitkiler yanlışlıkla temas yoluyla veya bitkilerin yenmesiyle toksik etki oluşturabilirler. Toksisitenin diğer bir kaynağı ise bile bile bazı bitkilerin yenmesidir. Toksisite olasılığı ayrıca reçete ile satılan ilaçlarla bitkisel ilaçların interaksiyona girmelerinden oluşabilir. Mesela bazı bitkiler hepatik sitokrom enzimlerini etkilemektedir (Izzo and Ernst 2001).

Bitkilerde, sebzelerde ve köklerde bulunan doğal bileşiklerin sağlık üzerindeki yararlı etkileri insanlarda çok eski zamanlardan beri geleneksel olarak bilinmektedir (Signorelli and Ghidoni 2005). Evrimsel süreç içinde bitkiler virüsler, bakteriler ve funguslar tarafından saldırıya uğramış ve hayvanlar tarafından yenilmişlerdir. Buna karşılık bitkiler de antimikrobiyal kimyasallar ve hayvanları defetmek için çeşitli kimyasallar üretmek gibi birçok savunma mekanizması geliştirmişlerdir (Klaassen 2008).

Genotoksisite araştırmalarında mutajenlerin DNA'da meydana getirdiği hasar, bakteriyel mutasyonları ölçebilen kısa zamanlı testler ile saptamaktadır. Bu testler de mutajenik etkileri ve geri mutasyonları belirleyen yöntemlerle ölçülebilmektedir. Bu testler içerisinde en yoğun kullanılan kısa zamanlı ve geri mutasyon testi olan Ames / *Salmonella*/Mikrozomal mutajenite testidir (Ayaz 2000).

## **2.2. Mutasyon**

Birçok genetik kavramın geliştirilmesinde, kalıtsal materyalin yapı ve içeriğinin dölden döle geçerken değişmediği kabul edilir. Her ne kadar, genler dikkati çekecek kadar kararlı ve yeni döllere bütün özelliklerini koruyarak katılıyorsa da zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında mutasyon dediğimiz değişikliklere uğrarlar (Akman 1983, Bağcı 1985, Temizkan 1996).

Mutasyon terimi ilk kez 1901 yılında, Hugo De Vries tarafından *Oenothera lamarckiana* Ser. (aksamsefası) ile yaptığı çaprazlamalarda gözlemlediği varyasyonu tanımlamak için kullanılmıştır (Öner 2003). Birçok araştırmacı çok çeşitli mutasyon tanımları yapmışlardır. Genlerin nükleotid dizisinde herhangi bir nedenle meydana gelen ve kalıtsal olan değişiklere (Ateş 2002), canlılarda, gen rekombinasyonu dışındaki nedenlerle meydana gelen kalıtsal değişiklere (Bahçeci 2002), genetik materyali oluşturan nükleotidlerin sıralanması, sayısı ya da çeşidinde ortaya çıkan kalıtsal değişikliklere mutasyon denir (Oraler 1990, Demirsoy 1991).

Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana gelebildiği gibi mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana gelebilirler. Genelde mutasyonun kendiliğinden meydana gelebilme olasılığının çok düşük olmasına karşın mutajenlerin etkisi ile mutasyon frekansı oldukça yükselmektedir. Normal koşullarda kendiliğinden olan mutasyon frekansı her kuşakta 10<sup>-5</sup>-10<sup>-10</sup> gibi düşüktür. İki ayrı gende aynı anda iki ayrı mutasyonun oluşma olasılığı ise 10<sup>-10</sup> -10<sup>-20</sup> gibi çok daha düşüktür (Oraler 1990).

### **2.2.1. Gen Mutasyonları**

Gen mutasyonları veya diğer bir deyişle 'Nokta Mutasyonları' kromozomların yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olmaz ve mikroskoplarda görülmezler.

DNA'da bulunan nükleotit dizisinin ya da bazlarının değişmesinden ileri gelir. Baz sırasının veya AT / GC oranının değişmesi, o gene özgü enzimin tamamen kaybolmasına ya da etkisinin azalmasına neden olur. Bir gen, binlerce baz çiftinden meydana gelmiş bir birim olduğundan ve kurumsal olarak her bazda mutasyon olabileceğinden dolayı, bir genin en azından baz çifti kadar mutasyon çeşitli olabilir (Demirsoy 1992).

Kromozom mutasyonlarında birden fazla gen söz konusu iken, gen mutasyonlarında değişiklik bir gen ile sınırlıdır. Genetik materyale etkilerine göre gen mutasyonları çeşitli alt sınıflara ayrılır (Ateş 2002).

### **Transisyon (Geçiş)**

Bir baz çiftinin başka bir baz çiftine değişmesidir. En çok rastlanılan mutasyon tipidir. Bu değişimde, bir pürin bazının yerine başka bir pürin bazı (A'nın yerine G, G'nin yerine A), bir pirimidin bazı yerine başka bir pirimidin bazı (T'nin yerine C, C'nin yerine T) geçer (Ateş 2002, Falakalı 1993).

### **Transversiyon (Çapraz geçiş)**

Transversiyonda bir pürin bazı ile bir pirimidin bazı veya bir pirimidin bazı ile bir pürin bazı (A veya G yerine T veya C'nin geçmesi ya da bunun tersi) birbirlerinin yerine geçer (Ateş 2002, Bahçeci 2002).

### **Yanlış anlamlı (Missense) Mutasyonlar**

DNA dizisindeki nükleotid değişiklikleri genetik kodu değiştirerek farklı amino asidin sentezlenmesine neden olurlar. Bu tip mutasyonlara yanlış anlamlı mutasyonlar denir.

### **Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar**

Protein sentezini sonlandıran STOP kodonunun kodlanmasına sebep olan ve protein sentezini yarıda bırakan mutasyon türüdür. Yani proteinin yapısal kısmı oluşmadan protein sentezi durdurulur. Glutamini kodlayan CAG kodonunun UAG kodonuna dönüşmesi gibi mutasyonlar buna örnektir. Bir gene bir, iki veya üçün katları olmayan nükleotidlerin eklenmesinin verdiği mRNA, çeviride bozukluk gösteren bir okuma

çerçevesine neden olur ve kopmalarda görülenlere benzer aynı etkiler mRNA çevirisine yansır. Bu olay yerleştirme noktasının distalinde kalan yararsız bir amino asit dizgisine neden olabilir ve yerleşme noktası veya bunun distalinde kalan bir anlamsız kodon' un üretilmesine veya olasılıkla normal sonlandırma kodonunu aşan bir okumaya neden olabilir. Bir gende, bir kopmanın ardından gelen bir eklenme (veya bunun aksi) doğru okuma çerçevesini yeniden kurabilir. Buna karşılık gelen mRNA, çeviriye uğradığında ekleme ve kopma noktaları arasında yararsız bir amino asit dizgi içerecektir. Yeniden kurgulanmış okuma çerçevesinin ötesinde amino asit dizgisi doğru olacaktır. Kopma, ekleme veya kopma ve eklemenin farklı bileşimleri, öngörülebileceği gibi bir bölümü anormal olup bu anormal bölümü normal amino asit dizgilerinin sardığı bir protein üretimi ile sonlanır. (Int. Kyn. 2).

### **Doğal (Neutral) Mutasyonlar**

Nötral mutasyonlar, mutasyon meydana gelirken canlının bulunduğu ortamda bireye bir zarar ya da yarar getirmeyebilir. Fakat yeni bir ortamda veya gelecekte, bu nötral mutasyonlar değer kazanabilir. Nötral mutasyonlar amino asit diziliminde ve evrimsel uyumun kalbi olan varyasyonların oluşumunda büyük öneme sahiptir. Birçok insanın hemoglobindeki amino asitlerin incelenmesiyle beta zinciri içerisindeki 146 amino asidin ve alfa zinciri içerisindeki 141 amino asidin her birinin değişebildiği gösterilmiştir. Bu değişiklikler hemoglobini daha etkin veya daha az etkin yapamaz. Fakat meydana gelen varyasyonları ilerideki bir değişikliğe uyum yapacak yeteneği kazandırabilir. Örneğin hava kirlenmesine bu şekilde bir uyum yapılabilir (Demirsoy 1988).

### **Sessiz (Silent) Mutasyonlar**

DNA baz dizisinde meydana gelen bir başkalaşım mRNA kodonunda değişikliğe neden olur fakat değişen kodon da aynı aminoasiti kodladığından protein dizisinde bir değişiklik meydana gelmez. Örneğin, AGA kodonu AGG olarak değişmesine rağmen her iki kodon da arginin'i kodlamaktadır (Int. Kyn. 3).

## **Çerçeve Kayması (frameshift) Mutasyonları**

DNA molekülüne fazladan bir veya daha fazla baz çiftinin girmesi ya da çıkmasıyla oluşan mutasyonlara çerçeve kayması mutasyonları ismi verilir. Bu mutasyonlarda bir veya daha fazla baz çiftinin ilavesine insersiyon (addition), ayrılmasına ise delesyon ismi verilir. Bu durum ise okunan çerçevenin translasyonunu değiştirir. Böylece translasyon sırasında tRNA'ların tanıdığı üçlü baz dizileri değişir. Çerçeve kayması mutasyonları, replikasyon, onarım veya rekombinasyon sırasında DNA'da oluşan boşluklarda ortaya çıkar. Bu işlemler sırasında bir zincirin diğerine göre kayması ve uygun olmayan bir tarzda baz eşleşme olasılığı vardır (Bahçeci 2002, Ates 2002).

### **2.3. Mutajenik ve Kanserojenik Maddelerin Saptanması**

Mutasyona neden olan ajanlara mutajen denir. Kansere neden olan ajanlar ise kanserojen olarak ifade edilir ve bunlar da mutajendir. (Bağcı 1985). Kansere, belirli genlerde bir takım etkilerle oluşan mutasyonlar sonucu veya gen ifadesinin miktarında ve zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur. Bu bozukluk neticesinde hücre döngüsünün bozularak sürekli olarak yeni kanser hücrelerinin meydana gelmesi ve yok edilememesi ile karakterize bir hastalıktır (Cumming and Klug 2002).

Karsinojenlerin araştırılmasında mutajenitenin temel teşkil etmesinin iki önemli nedeni vardır:

- 1- Genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu.
- 2- Karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşu (de Serres 1976, Ramel and Rannug 1980).

Genellikle doğrudan veya metabolize edildikten sonra karsinojenik etki gösteren tüm maddelerin, aynı zamanda mutajenik etki gösterecekleri kabul edilmektedir. Tüm mutajenik maddelerin karsinojenik etki göstermeleri beklentisi ise bazen gerçekleşmemektedir. Bakteriyel test sistemlerinde mutajen olduğu saptanan birçok bileşiğin aynı zamanda karsinojen olup olmadığı 300 kimyasal madde kullanılarak, *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile Mc Cann vd. (1976), tarafından araştırılmış;

karsinojen etki gösteren bileşiklerin % 90'ının mutajenik, karsinojen olmayan bileşiklerin % 87'sinin de mutajenik etki göstermediği bulunmuştur.

Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir (Bedir *et al.* 2004).

Fazla sayıda kalifiye iş gücü gerektirmeleri, besinlerdeki doğal kimyasal maddelerle su ve hava kirleticileri gibi kompleks bileşiklerin testine uygun olmamaları ve kullanılan hayvan sayısının azlığı nedeniyle, test duyarlılığının düşük oluşu gibi dezavantajlarından dolayı kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için, canlı hayvan deneyleri yerine birçok *in vitro* test sistemi geliştirilmiştir. Kısa zamanlı testler (short-term tests) diye bilinen bu testlerle kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Asal 1983 ve Bağcı 1985).

#### **2.4.Mutajenite Testleri**

Zaman açısından en pratik ve hızlı cevap veren test sistemleri genellikle bakteriyel testlerdir. Bu testlerin tercih edilme nedeni; bakterilerin kolayca sağlanabilen vasatlarda hızlı üremeleri, üretim maliyetlerinin düşük olması ve uygulama kolaylıkları sunmasıdır (Hofnung and Quillardet 1986). Bakteriyel test sistemlerinin kullanım amaçlarından bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

- Çeşitli kimyasalların potansiyel karsinojenitelerinin incelenmesinde,
- Kompleks karışımlardan, biyolojik olarak etkin bileşiklerin belirlenmesinde,
- Prokarsinojenlerin öncül ya da son metabolitlerinin saptanmasında,
- Vücut sıvılarının ve atıklarının test edilmesiyle insanların mutajen ve karsinojenlere maruz kalma düzeylerinin izlenmesinde,
- Kimyasalların mutajenik etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda,
- Konakçılar üzerinde yapılan deneylerde,
- Karsinojen ve mutajenlerin neden olduğu özgül DNA hasarlarının tiplerini saptamada bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır (Öksüzoğlu 2000).

Mutajenleri tanımlamakta kullanılan test sistemlerinin her biri farklı bir mutasyonu gösterdiği için değişik test sistemleri geliştirilmiştir. Mutajen/kanserojen maddelerin saptanmasında kullanılan kısa zamanlı testlerden bazıları çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Kimyasal mutajen/kanserojen maddelerin saptanmasında kullanılan kısa zamanlı testlerden bazıları (Bağcı 1985).

Test	İzlenen Genetiksel Biyokimyasal Yollar	Metabolik aktivasyon	Literatür
<i>Salmonella typhimurium</i>	Histidin okzotrofları	Post- mitokondriyal karaciğer fonksiyonları (S9, mikrozoimler )	Ames vd. 1973a, Maron and Ames 1983.
<i>Escherichia coli</i>	Arginin-triptofan okzotrofları Profaj induksiyonu Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu SOS cevabı	Sıçan karaciğer hücreleri	Green and Murial 1976 Elesperu and Yarmolinsky 1979 Moreu vd. 1976 Rosenkranz and Mermelstein 1980 Slater <i>et al.</i> 1971 Quillardet ve Hofnung 1985 Quillardet <i>et al.</i> 1985
<i>Bacillus subtilis</i>	DNA onarımı hatalı suşlar	–	Kada and Hirano 1980
<i>Neurospora crassa</i>	Adenin okzotrofları	–	Brockman 1984
Çin hamsteri ovaryum ve akciğer hücreleri	HGPRT (Hipoksantinguanin fosforiboziltransferaz) lokusunda mutasyonlar	–	Beaudet 1973
Fare karaciğeri epitel hücreleri	8-Azaguanine dirençlilik	–	Vogel and Sobels 1976
<i>Drosophila melanogaster</i>	Kromozomal hatalar	–	Vogel and Sobels 1976
Suriye hamsteri embriyo hücreleri	Morfolojik transformasyonlar	–	Pienta <i>et al.</i> 1977
Çin hamsteri hücreleri	Kardeş kromatid değişimi	–	Perry and Evans 1975
İnsan periferel kan lenfositleri testi	Kromozomal hatalar	–	Preston <i>et al.</i> 1981

#### 2.4.1. Yapısal Kromozom Bozulma Testi (chromosome aberration = CA)

Bu test tekniğinde mutasyon sonucu kromozomda oluşmuş olan kromatite dislokasyonlar olmadan oluşan akromatid lezyonlar, kırıklar, yer değiştirmeler ve fragmentler sayılır (Ribas *et al.* 1996).

#### **2.4.2. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Yöntemi**

DNA'da bir kırılma meydana geldiğinde DNA'nın kendi onarım mekanizması çalışmaya başlar. Bazen bu onarım sürecinde, bir kromozomda bulunan iki karşılıklı kromatidlerin (sister chromatids) eş parçaları yer değiştirir. Özel boyama teknikleriyle bu kromatidlerin biri daha koyu, diğeri daha açık boyanarak tam olarak meydana gelen yer değişikliği saptanabilir. Böylece, SCE tehlikeli maddelere maruz kalan hücreler için duyarlı bir indikatör olarak iş görür. SCE testi, toksik madde-DNA etkileşimini açığa çıkarmadaki duyarlılığı ve genotoksik kimyasalların kültüre edilmiş ya da muamele edilmiş hayvanlardan alınan hücre örneklerinde SCE sayısını önemli ölçüde arttırması sebebi ile bireysel olarak maruz kalınan genotoksik karsinojenlerin kan lenfositlerinde yarattığı DNA hasarını belirleyen bir test tekniğidir (Ayaz 2001). Antimikrobiyal ilaç olarak kullanılan Trimethoprim'in insan lenfosit kültürlerinde SCE sıklığını arttırdığı bildirilmiştir (Rıbas *et al.* 1996).

#### **2.4.3. Mikronukleus (MN) Testi**

Mikronukleus hücre bölünmesi sırasında; kromozom, kromozom parçası, kromozom ve kromatid tipi kırıklardan oluşabileceği gibi asentrik fragmentlerden de meydana gelebilir. Mikronukleus; mitotik bölünme sırasında serbest kalan kromozom fragmenti veya serbest kalan kromozomların ortamda varlığını sürdürmesidir. Bunlar bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içersinde ana nükleusun yanında yer alan bir nüklear materyaldir. Mikronukleus oluşumunun temelini DNA hasarı oluşturur. DNA hasarı; oksidasyon sonucu serbest oksijen radikallerinin oluşumu, DNA metilasyonunun normalden az ya da fazla olması, organizmanın çeşitli mutajenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması vb. nedenler sayılabilir (Abou-Eisha *et al* 1999).

DNA değişimlerine neden olan etkenler incelenirken, bunların DNA'da ne gibi değişimlere yol açtığını belirtmek ve analiz edebilmek için laboratuvar tekniklerine gerek duyulmuştur. DNA düzeyindeki incelemeyi sağlayabilen bu teknik mikronukleus testidir. Tekniğin basit oluşu, kısa zamanda sonuca ulaşılması ve DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi vermesi önem taşımaktadır. Mikronukleus tekniği, insan periferik kan lökositlerinde, daha sonra kemik iliğinde ve yanak mukoza hücresinde

kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Fenech 2000).

#### **2.4.4. UDS Yöntemi**

‘Programlanmamış DNA sentezi’ testi olarak adlandırılır. Bu yöntemin prensibi, primer rat hepatositlerinde DNA tamirinin uyarılmasına dayanmaktadır. UV ile pozitif kontrol deneyleri yapıp otoradyografik olarak değerlendirilmektedir (Norppo *et al.* 2003, Trosko 1997).

#### **2.4.5. Comet Yöntemi**

Bu yöntemde ise hücreler metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir (Norppo *et al.* 2003, Trosko 1997).

#### **2.4.6. S.O.S Kromotest**

Temeli, *E.coli*’de hasarlı DNA da S.O.S. cevabının uyarılması yöneliktir. *E.coli*’de S.O.S. sisteminin genel reseptörleri ile gen kontrol edildiğinden dolayı S.O.S. kromotest, DNA hasarlarını tespit etme olanağı sağlar (Kasamatu *et al.* 1996).

#### **2.4.7. Transformasyon Yöntemi**

Bu yöntemde, M2-C3H fare fibroblast hücrelerinde malignant transformasyonun uyarılmasıyla kimyasal maddelerin mutajenik ve tümorojenik etkileri ölçülür. Kanserojenik maddelerin tespiti için daha uygun bir testtir (Wyszynska 1991).

#### **2.4.8. Ames/Salmonella / Mikrosom Test Yöntemi**

Ames testi, 1970’lerin başında Bruce Ames tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanım alanı bulmuş olan kısa zamanlı, bir geri mutasyon testidir (Maron and Ames 1983). *Salmonella/Mikrozom* testi bakteriyel mutasyon testleri içinde mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen ve karakterilize edilen geçerliliği, uygulama kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Gathouse *et al.* 1998).

Bu testin temeli, yapay mutasyonla oluşturulmuş olan *Salmonella typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (his-) olan suşlarının test bileşeni ile muamelesinden sonra tekrar bir mutasyon geçirip his+ haline dönüşmesi esasına dayanır (Ames 1973a). Genel mutajenite testleri için en çok kullanılan test suşları; TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 ve TA 1538'dir. Her bir test suşu histidin operonunda değişik tipte mutasyonlar içermektedir (Maron and Ames 1983).

Ames testinde kullanılan suşlar ve onların genetik özellikleri Çizelge 1.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2.** *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri (Öksüzoğlu 1997).

TA 1535	His G46	Rfa	$\Delta uvrB$	-	AT→GC transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA 1537	His C3076	Rfa	$\Delta uvrB$	-	C.....C yanına +1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 1538	His D3052	Rfa	$\Delta uvrB$	-	CG.....CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 98	His D3052	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 100	His G46	Rfa	$\Delta uvrB$	+	AT→CG transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA 97	His D6610	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CCC yanına +4	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 102	PAQ1 His G428 $\Delta$ his	Rfa	$\Delta uvrB$	-	G Ochre AT	Oksidantlar, X-Işınları, U.V., mitomisin C, bleomisin, H O ve kinonlar...

### Histidin gereksinimi kontrolü

Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar, ya DNA'daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri ya da bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır (Ames *et al.* 1973b).

*Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA 1535 suşlarında bulunan His G46 mutasyonu, histidin biyosentezinin ilk enzimini kodlayan hisG geni üzerindedir. Bu mutasyon,

histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende lōsin kodonu  $\begin{matrix} \text{-GAG-} \\ \text{-CTC-} \end{matrix}$  yerine

prolin kodonunun  $\begin{matrix} \text{-GGG-} \\ \text{-CCC-} \end{matrix}$  gelmesine yol açar. His D3052 mutasyonu, *S. typhimurium*

TA 1538 ve *S. typhimurium* TA 98 suşlarında bulunur. His D<sup>+</sup> geni histidinol dehidrogenaz enzimini kodlar. His D3052 mutasyonu (-1) çerçeve kayması şeklinde bir mutasyondur ve nükleotid eksikliği his D<sup>-</sup> geni içinde 8 defa tekrarlanan -GCGCGCGC- bölgesindedir. Bu nedenle bu suş daha çok çerçeve kayması tipi mutasyonlara neden olan mutajenik/kanserojenik kimyasallar ile his<sup>+</sup> hale dönüşmektedir.

### **UvrB mutasyonu kontrolü**

DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan uvrB genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. uvrB mutasyonu, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak, teknik nedenlerden dolayı uvrB geninin kesilerek uzaklaştırılması sırasında bu delesyon biotin genine kadar uzanmaktadır. Biotin geni ise vitamin H denilen biotin sentezinden sorumludur. Bu nedenle bakteriler üreyebilmeleri için histidinin yanında biotine de gereksinim duyarlar (Ames *et al.* 1973b).

### **Rfa mutasyonu kontrolü**

Bu mutasyon, bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit (LPS) tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir. Bu engelin kalkması, yani LPS kusurları mutajenin bakteri içerisine girmesini kolaylaştırarak, hücrenin daha duyarlı olmasına yol açmaktadır. Rfa mutantları, polisakkaritlerin sentezinden sorumlu bir enzim bakımından kusurludurlar. Bu nedenle de büyük moleküllere karşı duyarlıdırlar. *S. typhimurium*'un his<sup>-</sup> ve onarım sistemlerinde mutasyon taşıyan test suşlarından, LPS kusurlu türevler elde edilmiş bu şekilde de sistemin mutajenlere duyarlılığı arttırılmıştır (Ames *et al.* 1973b).

### **R-faktörü**

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. typhimurium* TA 1538 ve TA 1535 suşlarına, ampisiline dirençlilik geni taşıyan pKM 101 R 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, orjinal 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 ( Barış 2007).

Bunların dışında son olarak Salmonella/mikrozom test sistemine daha sonra rat karaciğeri 9000xg süpernatantını ve kofaktörleri içeren metabolik aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır. Önceki çalışmalarda mutajenik aktivite göstermeyen birçok prokarsinojenler, test sisteminin metabolik aktivasyonu içeren bu uygulaması ile pozitif sonuç vermişlerdir (Ames *et al.* 1973b).

### **3. MATERYAL ve METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Bitki Ekstraksiyonu Yöntemi**

Ekstraksiyon işleminin en uygun şartlarda ve istenilen en yüksek verimle gerçekleştirilebilmesi için dikkat edilmesi gereken birçok kriter bulunmaktadır. Bu ölçütlerin en önemli olanları: sıcaklık, basınç, çözücü, parçacık büyüklüğü, süre, karıştırma hızı, karıştırıcı tipi ve nem olarak sayılabilir.

Çözücü seçimi ekstraksiyon işlemlerindeki en önemli unsurdur. Çözücü seçiminde öncelikle ekstre edilecek olan maddeyi çözücünün tam olarak çözebilmesi aranan en önemli özelliktir. Çözünmesini istediğimiz madde polar bir yapıdaysa, ekstraksiyon için kullanılacak olan çözücünün de polar olması gerekir. Çünkü benzer benzeri çözer.

*Alyssum virgatum* bitkileri Muratdağı (Afyonkarahisar) bölgesinden toplandıktan sonra Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda taksonomik sınıflandırılması Doç. Dr. Mustafa Kargıoğlu tarafından yapılmıştır. Oda şartlarında kurutulmuş bitkilerin toprak üstü kısımları toz haline getirilmiştir. Çözücü olarak bu çalışmada distile su kullanılmıştır. Distile su ekstraksiyonu Sofowora (1999)'ya göre yapılmıştır. Kapalı şişelere konulan toz halindeki 25'er gramlık bitki örneklerine 250 ml distile su eklendikten sonra toz halindeki bitkiler 80°C'de 30 dakika su banyosunda bekletilmiş ve daha sonra ekstreler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kısım alınıp filtre kağıdından geçirilmiştir. En son elde edilen ekstrelerin çözücüleri, 45°C'deki rotary cihazında vakumla uçurulmuştur. Hazırlanan 100 g/L çözelti stok olarak kullanılmış ve deneylerde kullanılan çözeltiler deney esnasında bu stok çözeltilerden taze olarak hazırlanmıştır.

##### **3.1.2. *Salmonella typhimurium* Test Suşları**

Deneyde, Prof. Dr. Ames ve arkadaşları tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla geliştirilmiş TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Hacettepe Üniversitesinden Prof. Dr. Nuran Diril'den sağlanmıştır. TA 98 suşu

kodon kayması, TA 100 ise baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmışlardır.

### 3.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan kimyasallardan nutrient broth no:2, Oxoid markalı olup diğer kimyasallar, magnezyum sülfat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), sitrikasit monohidrat, potasyum fosfat ( $K_2HPO_4$ ), sodyum amonyum fosfat ( $NaH_2NH_4 PO_4 \cdot 4H_2O$ ), D-Biyotin, L-Histidin-HCl, ampicilin trihidrat, sodyum hidroksit, kristal viyole, glikoz, agar, NaCl, sodyum azid, 2-aminoantrasen, 4-NPD, 2-aminofluoren, potasyum klorür, magnezyum klorür, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, -NADP, glikoz-6-fosfat ve S9 fraksiyonu Sigma'dan alınmıştır.

#### Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Kullanım: MGA ve HBA (master) plakları

	1000 ml için
Magnezyum sülfat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	10 g
Sitrikasit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat ( $K_2HPO_4$ )	500 g
Sodyum amonyum fosfat ( $NaH_2NH_4 PO_4 \cdot 4H_2O$ )	175 g
Distile su (45 °C)	670 ml

Temiz bir erlen içine dH<sub>2</sub>O konularak ısıtıldı. Kaynama seviyesine gelmeden yukarıdaki maddeler sırayla sıcak suyun içine eklendi. Kristallenmeyi önlemek için bir madde iyice çözünmeden diğeri eklenmemelidir. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilize edildi.

#### (0.5 mM) Histidin/Biyotin Solüsyonu

Kullanım: Mutajenite deneyi (100 ml top agara 10 ml olarak)

	250 ml için
D-Biyotin (F.W. 247,3)	30,9 mg
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	24,0 mg

Distile su 250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözüldü ve daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edildi. +4°C’de saklandı.

### **(% 0.8/0.02 NaOH) Ampisilin Solüsyonu**

Kullanım: Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolü ve R-faktör plazmidi taşıyan suşların master plakları

	100 ml için
Ampisilin trihidrat	0,8 g
0.02 N Sodyum hidroksit	100 ml

Ampisilin trihidrat, 0.02 N NaOH içinde çözüldü ve sterilizasyon için 0.22 mµ çaplı filtreden geçirildi ve +4°C’de saklandı.

### **(%1) Kristal viyole Solüsyonu**

Kullanım: Suşların kristal viyoleye duyarlılıkları, dolayısıyla rfa mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının kontrolü

	100 ml için
Kristal viyole	0,1 g
Distile su	100 ml

Kristal viyole ve distile su karıştırıldı ve solüsyon ışık geçirmeyen bir kaba konup +4°C’de saklandı.

### **(% 0.13) Biyotin Çözeltisi**

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	50 ml için
D-biyotin	0.65 mg
Distile su	50 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözüldü ve otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edildi.

### **(% 0.5) Histidin Çözeltisi**

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	400 ml için
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	2 g
Distile su	400 ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile su içinde çözüldü ve otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edildi.

### **(%20) Glukoz Çözeltisi**

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

	100 ml için
Glikoz	20 g
Distile su	100 ml

Glukoz distile su içinde çözümlenerek otoklavda 110°C’de 15 dakika sterilize edildi ve 0–4°C’de saklandı.

### **(2µg/µl) 2-aminofluorene (2AF)**

Kullanım: Pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere dimetilsülfoksitde (DMSO) çözülerek kullanıldı. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır. 0–4°C’de saklandı.

### **(2µg/µl) 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)**

Kullanım: Pozitif kontrol

200 µg/petri olmak üzere DMSO’da çözülerek kullanıldı. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu gerektirmeyen kimyasaldır. Oda ısısında saklandı.

### **(0.15 M) KCl çözeltisi**

Kullanım: Mikrozom izolasyonu

	1000 ml için
KCl	11.275 g
Distile su	1000 ml

KCl, bir miktar distile suda çözüldü ve toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavda sterilize edildi ve 0–4°C'de saklandı.

### **Top agar**

Kullanım: Mutasyon deneyi

	1000 ml için
Agar	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

Agar-su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözüldü ve otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi.

### **Histidin/Biyotin plakları (HB Agar)**

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

	1000 ml için
Agar	15 g
% 20 glukoz	50 ml
Histidin HCl. H <sub>2</sub> O	10 ml
0.5 mM Biyotin	6 ml
50XVB	20 ml
Distile su	914 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edildi. 45°C'ye soğutulup % 20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklendi, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin eklendi, karıştırılıp petri kutularına 30 ml olarak dağıtıldı.

### **Histidin/Biyotin/Ampisilin plakları (HBA Agar)**

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanması

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	910 ml
50XVB tuzları	20 ml
% 20 glukoz	50 ml
Histidin HCl.H <sub>2</sub> O	10 ml
0.5 mM Biyotin	6 ml
(%0.8/0.02 NaOH) Ampisilin	3.15 ml

Agar ve su otoklavlandı, 45°C'ye soğutulup % 20 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırıldı ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin eklenip plaklar petrilere 30 ml olarak aktarıldı. Bu plaklarda bakteriler 4°C'de 2 ay saklanabilir.

### **Minimal Glukoz Agar Plakları (MGA)**

Kullanım: Mutajenite deneyi

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	930 ml
50X VB	20 ml
% 20 glukoz	50 ml

Agar ve su 1 litrelik kaptaki karıştırılıp çözülür ve otoklavlanarak sterilize edildi, 45°C'ye soğutulup % 20 glikoz ve 50X VB tuzları eklenir ve besiyeri çalkalanarak karıştırılır. Daha sonra besiyeri, petri kutularına 30 ml olarak aktarıldı.

### **Nutrient agar plakları (NA)**

Kullanım: Gecelik kültürün ml'indeki bakteri sayısını belirleme ve genotip kontrolü

a. Kristal viyole b. UV duyarlılığı

	1000 ml için
Oxoid nutrient broth no:2	25 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Agar, broth ve su 2 litrelik kapta karıştırılıp otoklavlandı ve petri kutularına 30 ml olacak şekilde aktarıldı.

### **Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)**

Kullanım: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

	200 ml için
Oxoid nutrient broth no:2	5 g
Distile su	200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121°C'de 20 dk sterilize edildi ve 4°C'de saklandı.

### **Tuz Çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M MgCl<sub>2</sub>)**

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	500 ml için
Potasyum klorür (KCl)	61.5 g
Magnezyum klorür	40.7 g
Distile su	500 ml

Maddeler distile suda çözüldü ve 121°C'de 20 dk otoklavlanarak sterilize edildi ve 4°C'de ya da oda sıcaklığında saklandı.

### **0.2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH=7,4)**

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	500 ml için
0.2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	13.82 g
0.2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	14,2 g

Distile su 500 ml

Karışım pH 7.4'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dk otoklavda sterilize edildi.

### **M $\beta$ -NADP çözeltisi**

Kullanımı: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	5 ml için
$\beta$ -NADP (F.W. 765,4)	383 mg
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0.22  $\mu$ m delik çaplı filtrelerle yapıldı.

### **M Glukoz-6-Fosfat çözeltisi**

Kullanım: Mutajenite deneyi için S9 karışımı

	10 ml için
Glukoz-6-fosfat	2.82 g
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0.22  $\mu$ m delik çaplı filtrelerle yapıldı.

### **S9 Karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörler)**

Kullanım: Mutajenite deneyi

	50 ml için
Steril distile su	19.75 ml
0.2 M fosfat tamponu pH=7,4	25 ml
0.1 M $\beta$ -NADP	2 ml
1 M Glukoz-6-fosfat	0.25 ml
MgCl <sub>2</sub> -KCl tuz çözeltisi	1 ml
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml

Maddeler yukarıdaki sıra ile daima buz içinde tutulan 100 lük erlene dikkatli bir şekilde konur. Karışım, her zaman taze olarak ve yeterince hazırlandı. İçerikler daima buz içinde tutuldu.

#### **3.1.4. Test Maddeleri (dozları ve hazırlanışı)**

Alyssum virgatum türü distile su ekstralarının 50 µg/plak, 25 µg/plak, 12.5 µg/plak, 6.25 µg/plak ve 3.125 µg/plak konsantrasyonları hazırlanmıştır. AMES testi çalışmasında bu dozlar kullanılmıştır.

### **3.2. Metod**

Çalışmamızda, Moran ve Ames'in (1983) plak inkorporasyon metodu uygulanmıştır. Deneysel S9'lu ve S9'suz olarak iki grup halinde çalışılmıştır. Uygulanan her doz için 3 plak kullanılmış ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, negatif kontrol ve spontan kontroller de belirlenmiştir. Çalışma Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.1. Salmonella Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması**

Bakteri kültürleri HBA plaklarına paralel ekimleri yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml NB içerisinde süspanse edilerek bir gece (12–16 saat) 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra steril bir öze ile bir öze dolusu dolusu sıvı kültür alınıp HBA üzerine çizgi ekimi yapılmıştır. Plaklar 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 4°C'de saklanmıştır. Bu şekilde hazırlanan plaklar 2 ay süresince yeniden kültür hazırlamak için kullanılmıştır.

#### **3.2.2. Salmonella Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması**

Test suşlarının canlılığını ve mutant özelliklerini uzun süre koruyabilmesi için stoklanması gerekir. Genetik kontrolleri yapılarak HBA'da üremiş olan Salmonella suşlarından iyi izole olmuş bir koloni öze ile alınarak alınarak 2 ml NB içinde 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüplerinin içerisine 1 ml bakteri kültürü ve 90 µl DMSO ilave edilmiş sonra da kapakları sıkıca kapatılarak sıvı azot içerisine daldırılıp çıkartılmış ve böylece şok donmaları sağlanmıştır. Şok

dondurulan kültürler stok olarak kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırılmıştır. Bu stok kültürler 1–2 yıl süre ile tazeliklerini korur.

### **3.2.3. *Salmonella* Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması**

#### **3.2.3.1. Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi**

Mutasyon testlerinde test maddesinin mutant suşu atasal tipe döndürme gücü ölçüldüğü için, suşun genotip bakımından mutant karakterlere sahip olup olmadığının kontrol edilmesi, testin güvenilirliği açısından gereklidir. Bu nedenle, bakterilerin genotipleri çeşitli testler ile kontrol edilmiştir.

#### **Histidin gereksinimi kontrolü**

Bakterilerin his- yapısından his+ yapısına geçişi MGA üzerine ekilmeleri sonucu ayırt edilmiştir. Bu kontrol için, bir gece NB içerisinde büyütülen kültürlerden steril öze ile alınan his- bakteriler MGA ve histidin/biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılmış ve 37 °C'de 48–72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir.

#### **UvrB mutasyonu kontrolü**

Bu mutasyon ile bakterilerin ultraviyole (UV) ışınlarının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizması engellenmiştir ve bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testiyle kanıtlanmıştır. Bu test için, NB'de bir gece büyütülen bakteri kültüründen steril bir öze yardımıyla bir öze dolusu alınıp NA plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı plastik bir plaka ile kapatılıp 33 cm. yüksekten 8 sn süre ile 15 watt gücündeki UV lambasına maruz bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda plaklar kapatılıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek bakterilerin üreme durumlarına bakılmıştır.

#### **Rfa mutasyonu kontrolü**

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuş olup hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Rfa mutasyonun varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için 45 °C' deki su banyosunda tutulan 2 ml

top agara 0,1 ml. gecelik bakteri kültürü ilave edildikten sonra NA plaklarına karışımın homojen dağılması için 8 işareti yapılarak ekilmiştir. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0.5 cm çaplı steril disk yerleştirilip diskin ortasına %0.1'lik 10 µl kristal viyole damlatılmıştır. Disk boyayı emdikten sonra plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir.

### **R-faktör varlığı kontrolü**

Deneyde kullanılan her iki test suşuda ampisiline dirençlilik geni içeren R-faktör taşıyan pKM 101 plazmitini içermektedir. Bu plazmitin varlığı suşların ampisiline dirençliliklerinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, NB içerisinde büyütülen bakteri kültürleri ampisilin (%0,8 Ampisilin/0.02 M NaOH) içeren HBA plaklarına çizgi şeklinde ekimleri yapılmış ve daha sonra 37 °C'deki etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda plazmit içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdükleri gözlenmiştir.

### **Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü**

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his- fenotipinden his+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20–50 revertant/plak; TA 100 için 75–200 revertant/plaktır. Bu test için, 37 °C'deki etüvde 110 rpm'de NB'de büyütülen bir gecelik kültürlerden 0,1 ml alınıp, 45 °C'deki su banyosunda tutulan 0.25 ml 0,5 M histidin-biyotin solüsyonu içeren 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C'deki etüvde 48–72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. Normal sınırlarda revertant sayı gösteren kültürler deneyde kullanılmıştır.

### **3.2.4. Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi**

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını belirlemek için HBA plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml NB içerisine eklenmiştir. Daha sonra, kültür çalkalamalı inkübatörde 37 °C' de 110 rpm' de 12–16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gecelik kültürden 100 µl alınıp 20 ml NB içerisine eklenerek taze kültürleri hazırlanarak 140 rpm'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda taze kültürün %0,9 serum fizyolojik ile 100, 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5 ve 10-6 olacak şekilde sulandırılmaları hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına her bir konsantrasyondan 3 petri olacak şekilde 100 µl' lik miktarlarda alınarak 45 °C' deki su banyosunda tutulan 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü çalkalanarak NA plaklarına 8 işareti yapılarak yavaşça yayılmış ve 37 °C' de 24 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır.

### **3.2.5. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması**

Test bileşenlerinin sitotoksik etkilerinin saptanması Dean vd. (1985) göre yapılmıştır. Buna göre, 2 ml top agara TA100 suşunun gecelik kültüründen 100 µl ve distile su içerisinde çözülmüş test bileşiklerinin değişik konsantrasyonlarından 100 µl ilave edilerek NA plaklarına ekilmiştir. Plaklar 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı belirlenmiş ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Her bir doz için 3 plak kullanılmıştır. Deneme plaklarındaki koloni sayısı, kontrol plağındaki koloni sayısının yarısının altında olmamalıdır.

### **3.2.6. S9 Karışımının Hazırlanması**

*Salmonella*/mikrozom test sistemi için standart S9 karışımı bileşenleri 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl, 5 mM glukoz-6-fosfat, 4 mM β-NADP, 100 mM Na-fosfat pH:7,4 ve bu karışımın her ml'si için 0.04 ml. derişimindeki S9 fraksiyonudur. Karışım daima her mutajenite deneyi için taze hazırlanmış ve deney süresince buz içerisinde tutulmuştur.

### **3.2.7. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı**

Deneydeki amacımız, daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan mutant oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüştürme gücünü ölçme temeline dayanmaktadır. Ayrıca test bileşenlerinin etkilerinin metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacı ile deneyler S9' lu ve S9' suz olmak üzere iki grup halinde yapılmıştır.

### 3.2.7.1. S9'suz Deney

Bu deneyde, 45 °C'lik su banyosunda tutulan ve içerisinde 0.25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml'lik top agara test maddelerinin değişik konsantrasyonlarından 100 µl ve 5 saatlik taze bakteri kültürlerinden 100 µl eklenmiştir. Tüpler düşük hızdaki vorteks ile yavaşça karıştırılarak daha önce 37 °C'de bekletilen MGA plaklar üzerine 8 işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. 15 dakika agarın donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48–72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney TA98 ve TA 100 için her bir doz 3 ayrı plağa ekilmiştir. Bağımsız iki deney yapılmış ve sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol (distile su) ve pozitif (diagnostik) kontrol olarak TA 100 suşu için 0,1 µg/µl sodyum azid (NaN<sub>3</sub>), TA 98 suşu için ise 2 µg/µl 4-nitro-o-fenilendiamine (NPD) kullanılmıştır.

### 3.2.7.2. S9'lu (+) Deney

Bu deneyde, 45 °C'lik su banyosunda tutulan ve içerisinde 0.25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml'lik top agara test maddelerinin değişik konsantrasyonlarından 100 µl, 5 saatlik taze bakteri kültürlerinden 100 µl ve S9 karışımından 0,5 ml eklenmiştir. Tüpler düşük hızdaki vorteks ile yavaşça karıştırılarak daha önce 37 °C'de bekletilen MGA plaklar üzerine 8 işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. 15 dakika agarın donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48–72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney TA98 ve TA 100 için her bir doz 3 ayrı plağa ekilmiştir. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol (distile su) ve pozitif (diagnostik) kontrol yapılmıştır. TA 100 suşu için 0,05µg/µl 2-aminoanthracene (2-AA), TA 98 suşu için 2 µg/µl 2-aminofluorene (2AF) kullanılarak, pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve iki bağımsız deney yapılmıştır.

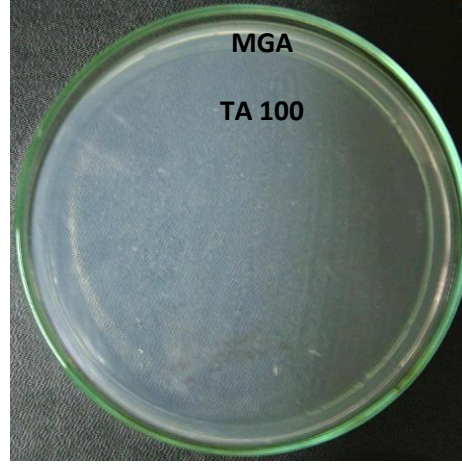
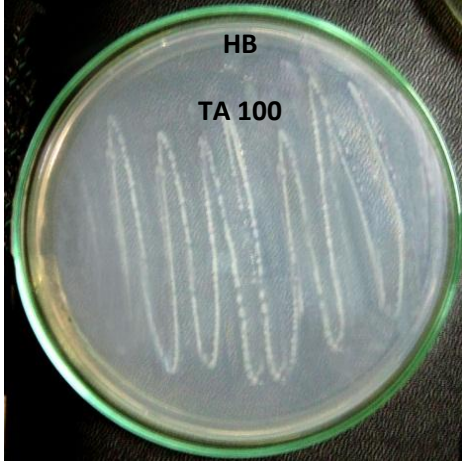
Sonuçların değerlendirilmesi SPSS 15.0 Windows paket programında One-Way ANOVA Testi ile yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

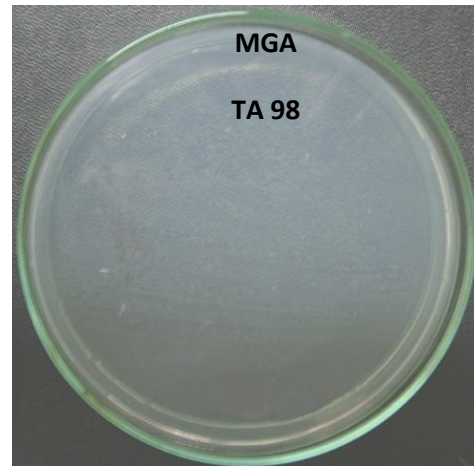
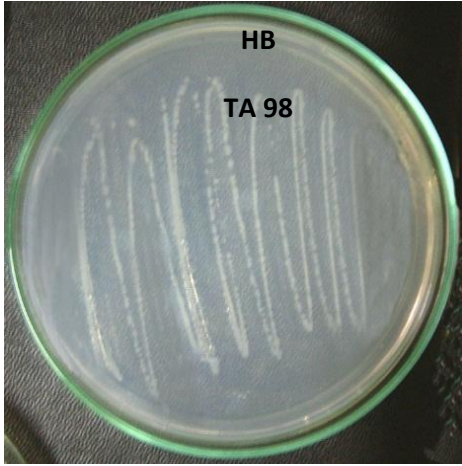
Bu çalışmada Afyonkarahisar ilinden toplanan *Brassicaceae* familyasına ait olan ve endemik bir tür olan *Alyssum virgatum* bitkisinin sulu ekstralarının mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 mutant suşları ile araştırılmıştır. AMES deneyine geçilmeden önce bitki ekstralarının toksik dozları belirlenmiştir. Toksik doz belirleme çalışmalarında 10000µg/plak, 5000µg/plak, 2500µg/plak, 1250µg/plak, 625µg/plak, 312,5µg/plak dozlar kullanılmış olup bu dozlardan sadece 10000µg/plak konsantrasyonunun toksik olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre AMES deneyinde toksik olan bu doz kullanılmamıştır.

### 4.1. Genetik İşaretlerin Kontrolü

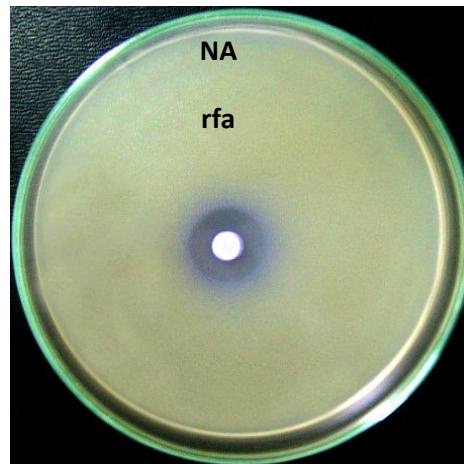
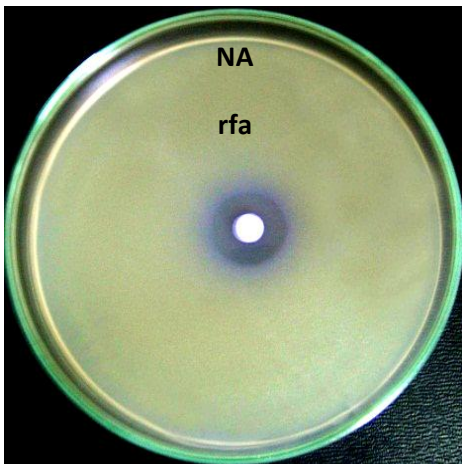
Bu çalışmada kullanılan standart test suşlarından TA 100 suşunun histidin gereksinimi (Sekil 4.1), TA 98 suşunun histidin gereksinimi (Sekil 4.2), rfa mutasyonu (Sekil 4.3), uvrB mutasyonu (Sekil 4.4), R-faktör varlığı (Sekil 4.5) ve spontan olarak geriye dönen koloni sayısı (Sekil 4.6) bakımından genetik işaretlerinin kontrolü yapılmıştır. Yapılan genotip kontrolleri sonucunda TA 98 ve TA 100 suşlarının genotiplerinde herhangi bir bozukluk görülmemiştir ve bu suşların AMES testinde kullanılabilir olduğu görülmüştür.



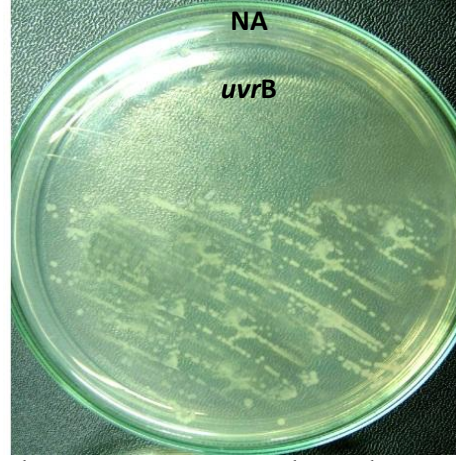
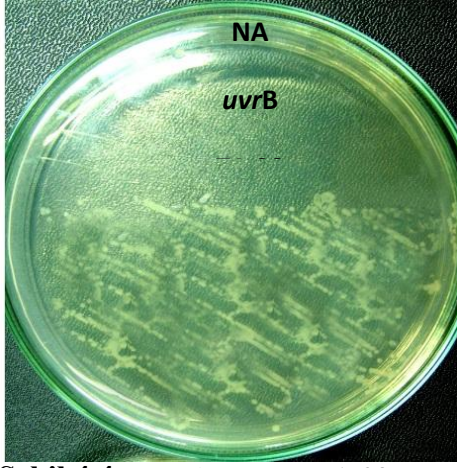
Şekil 4.1. *S. typhimurium* TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



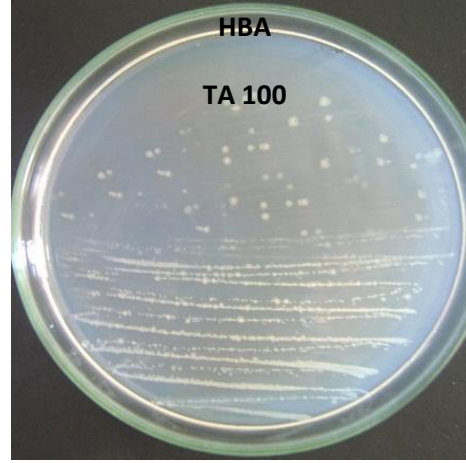
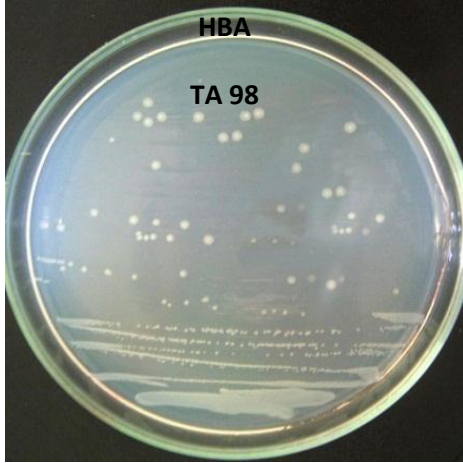
Şekil 4.2. *S. typhimurium* TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



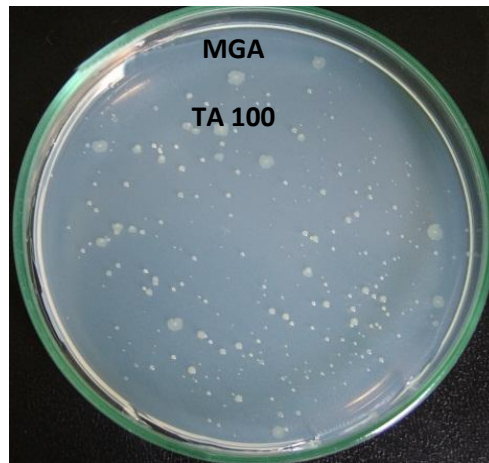
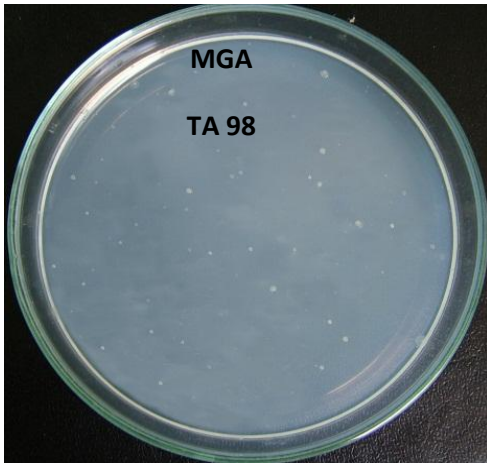
Şekil 4.3. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları



Şekil 4.4. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının *uvrB* mutasyon kontrolü sonuçları



Şekil 4.5. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları



Şekil4.6. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları

#### **4.2. Spontan Olarak Geriye Gönüş Sıklığının Kontrolü**

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his- durumundan his+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20–50 revertant/plak; TA 100 için 75–200 revertant/plaktır. Yaptığımız çalışma sonucunda spontan olarak geriye dönüş sıklığı TA 98 suşu için S9'suz ortamda  $26.83 \pm 2.9$ , S9 varlığında  $25.50 \pm 2.7$  bulunmuşken, TA 100 suşu için sırasıyla  $116 \pm 5.5$  ve  $147 \pm 6.9$  değerleri bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar da her iki suş içinde bu değerlerin arasında çıkmıştır (Şekil 4.6).

#### **4.3. Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi**

*Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kullanılarak yapıldığı mutajenite deneylerinde ml'deki bakteri sayısının  $1-2 \times 10^9$  ml/bakteri olması gerekmektedir. Yaptığımız deney sonucunda ml'deki bakteri sayısı  $1,2 \times 10^9$  ml/bakteri olarak belirlenmiş ve bu sayıda istenilen değerler arasında çıkmıştır.

#### **4.4. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması**

Mutajenite deneylerinde, denenecek kimyasal maddelerin toksik etkileri de belirlenmelidir. Eğer denenecek madde toksik etkiliyse, petriye ekilen hücrelerden bazıları daha fazla bölünme göstermeden öleceklerdir. Bunun sonucunda his<sup>-</sup> mikrokolonilerin sayıları az, fakat boyutları daha büyük olacaktır. Bu nedenle mutajenik özelliği belirlenecek kimyasal maddelerin toksik etkisi belirtilmelidir (McGregor *et al.* 1984).

Test bileşenlerinin sitotoksik etkilerinin saptanması Dean vd. (1985) göre yapılmıştır. Toksik doz belirleme çalışmalarında  $10000 \mu\text{g/plak}$ ,  $5000 \mu\text{g/plak}$ ,  $2500 \mu\text{g/plak}$ ,  $1250 \mu\text{g/plak}$ ,  $625 \mu\text{g/plak}$ ,  $312,5 \mu\text{g/plak}$  dozlar kullanılmış olup bu dozlardan sadece  $10000 \mu\text{g/plak}$  konsantrasyonunun toksik olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre AMES deneyinde toksik olan bu doz kullanılmamıştır.

#### 4.5. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

Revertant sayısındaki değişiklikler *Salmonella typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda negatif kontrol grubuna göre artış göstermiş olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Her iki deneyde de test suşlarının geriye dönüş sıklığını ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için mutajenik etkileri bilinen pozitif kimyasal maddeler kullanılarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında 2-aminofluorene ve S9 fraksiyonu yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamine kullanıldığında revertant koloni sayısı artmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur.

*Salmonella typhimurium* TA 100 suşunda ise revertant sayısındaki değişiklikler S9 fraksiyonu yokluğunda kontrol grubuna göre göstermiş olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. TA 100 suşunda da suşların geriye dönüş sıklığını ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için mutajenik etkileri bilinen pozitif kimyasal maddeler kullanılarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. TA 100 için S9 fraksiyonu varlığında 2-aminoanthracene ve S9 fraksiyonu yokluğunda pozitif mutajen olarak sodyum azid kullanıldığında revertant koloni sayısı her ikisinde de artmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

TA98 ve TA100 suşları ile yapılan AMES testi sonuçları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1** TA98 ve TA100 suşları ile yapılan AMES testi sonuçları.

Test Maddeleri	Dozlar (µg/plak)	TA98 S9(-)	TA98 S9(+)	TA100 S9 (-)	TA100 S9 (+)
<b>Negatif kontrol</b>		18,4±2,07	29,8±1,79	75,4±1,52	308,6±15,26
<b>SA</b>	<b>10</b>			*2779,6±92,05	
<b>NPD</b>	<b>200</b>	*1549,8±57,72			
<b>2-AA</b>	<b>5</b>				*2273,4±152,25
<b>2-AF</b>	<b>200</b>		*990,4±23,01		
<b><i>Alyssum virgatum</i> Sulu Ekstreleri</b>	<b>5000</b>	26,8±1,3	33,8±2,86	85±3,67	330,4±3,58
	<b>2500</b>	25±1,58	32,4±2,3	84,8±1,92	327,6±4,77
	<b>1250</b>	20,8±2,59	33,4±1,82	76,8±2,17	327±4,36
	<b>625</b>	24,2±2,05	30±2,74	73,2±1,3	309±9,87
	<b>312,5</b>	26,4±1,34	30,4±1,95	83±2,45	321,8±2,17

SA: Sodyum azid, NPD: 4-nitro-o-fenilendiamine, 2-AA: 2-aminoanthracene, 2-AF: 2-aminofluorene

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İlaç elde etmek, görsellik, tat, koku ve daha birçok özellikleri için kullanılan bitkilerin bilimsel olarak güvenilir olması gerekir. Ülkemiz endemik tür açısından oldukça zengindir. Bu bitki türlerinin tanınması, mutajenik, antimutajenik, toksik etkilerinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Çalışmamızda *Alyssum virgatum* bitkisinin sulu ekstrelerinin muhtemel mutajenik etkileri Ames (*Salmonella*/mikrozom) test yöntemi ile plak inkorporasyon yöntemi kullanılarak .metabolik aktivasyonlu ve metabolik aktivasyonsuz olarak araştırılmıştır.

Öninkübasyon yönteminde mutajenik metabolitler küçük hacimli test suşları ile daha iyi tepkime verirler fakat plak inkorporasyon yöntemi farklı araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir ve daha fazla kimyasalın incelenmesine olanak sağlar (Mortelmans and Zeiger 2000).

Bitkimizin ekstraksiyonunda çözücü olarak distile su kullanılmıştır. Aseton, dimetilsülfat, etil asetat, kloroform, etanol, metanol gibi birçok çözücü de bu tür çalışmalarda kullanılmaktadır. Ancak, çalışmamızda çözücü olarak en iyi çözücü su olduğundan bu amaç için distile su kullandık. Fakat, başka çözücüler de kullanılsaydı farklı sonuçlar ortaya çıkabilirdi.

*Salmonella*/mikrozom test sisteminde mutasyon, ortamdaki histidin tüketiminden sonra agar üzerinde koloni oluşturan histidin prototroflarının sayıları ile ölçülür. Histidin prototroflarının sayısı kimyasalların mutajenik potansiyellerinin gösterilmesinde en önemli kriter olmasına rağmen, bu sayı çeşitli faktörler tarafından etkilenebilmektedir. Farklı laboratuvarlarda ya da aynı laboratuvarında farklı zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu sayıyı aynı oranda bulmak çok zordur. Bu nedenle her mutant suş için, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı tek bir sayı olarak değil de, belirli bir aralıkta verilir. Birçok araştırmacı, kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarına etki eden faktörleri belirlemek üzere çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Bu faktörler; minimal ortamın özelliği, Glukoz -6-fosfat'ın derişimi, -NADP ve fosfat tamponu derişimi, plaklara ekilen bakteri sayısı, plaklardaki minimal agarın hacmi, üst agarın yayılma şekli, etüvün nem oranı, üst agarın sıcaklığı, sıvı üreme ortamının hazırlanması, minimal agarın bileşimi v.b. (Boath *et al.* 1980).

Gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Principe 1991). Son yıllarda, geleneksel tıbbi bitkilerin mutajenik-antimutajenik özelliklerinin belirlenmesinde araştırmacılar, esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans and Zeiger 2000).

Ames/*Salmonella*/mikrozom testinin bitki ekstralarının mutajenitelerinin belirlenmesinde kullanılabilirliği tespit edilmiştir. *Helichrysum simillimum*, *Helichrysum herbaceum* ve *Helichrysum rugulosum* bitkilerinin tümünden elde edilen metanol ekstraları mutajenite göstermiştir. *Bauhinia galpinii*'nin yaprak metanol ekstraktları ve *Bauhinia galpinii*, *Clerodendrum myricoides*, *Datura stramonium*, *Millettia sutherlandii*, *Sutherlandia frutescens* ve *Buddleja saligna*'nın diklorometan yaprak ekstraktları S9 varlığında antimutajenik özellikler göstermiştir. (Reid 2006). Brezilya'da ilaç yapımında kullanılan 7 türün (*Achyrocline satureoides*, *Iodina rhombifolia*, *Desmodium incanum*, *Baccharis anomala*, *Tibouchina asperior*, *Luehea divaricata*, *Maytenus ilicifolia*) sulu ekstralarının Ames testiyle mutajeniteleri araştırılmıştır. Pozitif sonuçlar *Achyrocline satureoides*, *Baccharis anomala* ve *Luehea divaricata*'da mikrozomal aktivasyon varlığında elde edilmiştir (Vargas vd. 1991). Bu çalışmamızda ülkemizde endemik olarak bulunan *Alyssum virgatum* sulu ekstralarının muhtemel mutajenik etkileri Ames testi kullanılarak araştırılmıştır. *Alyssum virgatum*'un toprak üstü distile su ekstralarında herhangi bir mutajenik etki görülmemiştir. Ancak bir test sistemi ile bu yargıya varmak yeterli değildir. Birkaç test sistemi denenmelidir.

Brassicaceae familyasındaki *Lepidium sativum*'un pestisitler üzerindeki antimutajenik etkisi TA 98 ve TA100 *Salmonella typhimurium* şuşları ile metabolik aktivasyon olmadan test edilmiştir. Bu bitkinin ekstresinin Captan, Folpet, DDVP, Azinfosmetil, Bioresmethrin ve Trifluralin gibi mutajen maddelerin mutajenik etkilerini azalttığı görülmüştür. Önceden çeşitli araştırmalarda Glutathione ve Cysteine gibi etken maddelerin antimutajenik özellikleri tartışılmıştır. Bitki özü bu gibi kimyasalların tespit etmek için test edilmiştir. Askorbik asit varlığı saptanmıştır (Erdem *et al.* 1997). *Lepidium sativum* ile aynı familyada bulunan *Alyssum virgatum* bitkisinin mutajenik ya da antimutajenik etkisi ile ilgili daha önce çalışılmamıştır.

Nitratlar sebzelerde ve suda doğal olarak bulunabilirler. Nitrat lahanası, brokoli, karnabahar, havuç, kereviz, marul, turp, pancar ve ıspanak gibi sebzelerde yüksek miktarlarda bulunabilir ve günlük nitrat alımının % 86'sı sebzelerden gelebilir. Aşırı nitrit ve nitrat kullanımıyla ilgili sağlık sorunları, methemoglobinemi ve karsinojenik nitrozaminlerin oluşumu sonucu mide kanserleridir (Int. Kyn. 4). *Alyssum* cinsinin bazı türleri nikel metalini kuru yaprak biokütlesinin %3'üne varan derişimlerde biriktirme özelliğine sahip olduğu için ekolojik değeri olan bitki grubudur (Kramer 1996).

Brooks vd. (1979), *Alyssum* olarak tanımlanan 168 bitki türünün nikel için hiperakümülatör olup olmadığını anlaşılması için Ni (nikel) içerikleri saptamıştır. Bu çalışmada 14'ü Avrupa türü olmak üzere toplam 31 tane hiperakümülatör bitki saptamışlardır (1 g kuru ağırlıkta >1000µg).

Özdemir ve Demir (2010)'in yapmış olduğu çalışmada Fındıkpınarı-Erdemli/ Mersin bölgesinde Ni için biyojeokimyasal anomalilerin incelenmesi amacıyla bölgede yetişen *Alyssum* bitki türlerinden *A. peltarioides*, *A. murale*, *A. Floribundum* türleri saptanmıştır. Sonuç olarak *A. murale* bitki türünün yalnızca çiçeği biyojeokimyasal prospeksiyonda akümülatör bitki olarak, topraktaki nikeli doğrusal olarak bünyesine almaları nedeniyle çevresel monitör olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Babaoğlu (2002)'nin yapmış olduğu çalışmada ise *Alyssum* cinsine ait türler toplam tohum proteinleri bakımından türler arası polimorfizm göstermiştir. Türlerin DNA'sı ile yapılan çalışmada ise özellikle *A. cyricum* türünde büyük oranda tür içi polimorfizm tespit edilmiştir. Yani türler arası farklılık ortaya komuştur. *Alyssum* türünün nikel absorblama oranlarının da göz önünde bulundurulması ile bu özelliğin genetik farklılıklarla ilişkilendirilmesi mümkündür.

*Alyssum* cinsinde görülen ağır metal biriktirme özelliği nedeniyle fazla miktarda ağır metal bulunduran bu cinsin üyeleri mutajenik ve sitotoksik etkiler gösterebilir. Çalışmamızda, *Alyssum virgatum* bitki ekstraları mutajenik etki göstermemiştir. Ayrıca bitki ekstraları mutajenik kimyasallar ve çevresel faktörlere karşı antimutajenik etki de gösterebilir. İleride yapılacak olan çalışmalarda bitkimizin mutajenik etki oluşturan etmenlere karşı antimutajenik özelliği araştırılmalıdır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abou – Eisha, A., Creus, A. ve Marcos, R. (1999). Genetic Evaluation of the Antimicrobial Drug, Trimethoprim in Cultured Human Lymphocytes, Mutation Research, Gen. Tox. Environ. Mut., **440**: 157 – 162.
- Ahloowalia, B. S., Maluszynski M., Nichterlein K. (2004). Global impact of mutation derived varieties. Euphytica **135**: 187-204.
- Akman, M. (1983). Bakteri Genetiği, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, 2. Baskı, Sivas.
- Akyıl, D. (2006). Farklı Tipteki Fungisitlerin Muhtemel Mutajeniteleri Üzerine Bir Çalışma, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Afyon.
- Alison, M and Flatt P. (1991). World Health Organization. Guidelines for the assessment of herbal medicines. Programme on traditional medicines. WHO/TRM/91.4, WHO Geneva.
- Ames, B. N., Lee, F. D. ve Durston, W. E. (1973b). “An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens”, The Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., **70**: 782-786.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D. (1973a). “Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection”, The Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., Vol., **70**: 2281-2285.
- Asal, S. (1983). “Türkiye’de yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin mutagen etkilerinin *Salmonella typhimurium* histidin mutantlarıyla saptanması üzerinde araştırmalar”, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu, Ankara.
- Ateş, A. (2002). “Moleküler Biyoloji”, Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Konya, 9. Bölüm, 113-121 p.

- Avcı, M. (2005). Çeşitlilik ve Endemizm açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü, İstanbul Üniversitesi, Edebiyat Fakültesi, Coğrafya Bölümü, Coğrafya Dergisi, **13**: 27–55.
- Ayaz, B. (2000). 2, 4, 5 , Tri (Süstitüe) Fenil İmidazol ve Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Testi ile Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Ayaz, B. (2001). Bazı İlaç Öncül Maddelerinin Mutajenik Etkilerinin Bakteriyal ve Hücre Kültürü Testleri ile Araştırılması Tez (doktora) – Anadolu Üniversitesi.
- Babaoğlu, S., Açıık, L. Çelebi, A. ve Adıgüzel, N. (2004) Türkiye'nin Bazı *Alyssum L.(Brassicaceae)* Türlerinin RAPD-PCR ve SDS-PAGE Yöntemleri ile Molekül Analizleri, G.Ü.Fen Bilimleri Dergisi, **17(3)**:25-33.
- Babaoğlu, S. (2002). "Türkiye' de yetişen bazı *Alyssum (Brassicaceae)* türlerinin moleküler analizleri "Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Babaoğlu, M., Gezgin, S., Topal, A., Sade, B., Dural, H. (2004). *Gypsophila Sphaerocephale Fenzl Ex Tchihat: A Boron Hyperaccumulator Plant Species That May Phytoremediate Soils with Toxic B Levels.* Turkish Journal Of Botany. **28**: 273–278.
- Bağcı, H. (1985). Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 25-55.
- Bahçeci, Z. ( 2002). “Moleküler Biyoloji”, 2. Baskı, 10. Bölüm, Gazi Üniversitesi, Kırşehir Eğitim Fakültesi, Ankara, 209-216.
- Baker, A.J.M., Mcgrath S.P., Reeves R.D., Smith J.A. C. (2000). Metal Hyperaccumulator Plants: A Review Of The Ecology And Physiology Of A Biological Resource For Phytoremediation Of Metal-Polluted Soils, pp: 85-107.
- Barış, A. ( 2007). Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi,

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı,  
Afyonkarahisar.

Beaudet, A.L., Roufa, A.J., Cassay, C.T. (1973). "Mutations effecting the structure of hypoxanthine: guanine phosphoribosyltransferase in cultured Chinese Hamster cells", The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA., Vol.70, pp.320-324.

Beckett, A. (1985). The Concise Encyclopedia Of Garden Plants, 20-21.

Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvrur, M. (2004). "DNA hasarı analizinde  $\mu$ -FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması", Türk Klinik Biyokimya Dergisi, **2 (3)**: 97-103.

Blumenthal, M., Busse, W.R., Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T., Klein, S., Riggins, C.W. and Risher, R.S. (1998). The complete German Commission E. Monographs: Therapeutic guide to herbal medicines Ame;. Boto. **10**: 100-167.

Brockman, H.E., de Serres, I.J., Ong, T., et all. (1984). "Mutation test in *Neurospora crossa*: a report of the US environmental production agency genetoc program1", Mutation Research, Vol.133, pp.87-134.

Brooks, R.R., Morrison, R.S., Reeves, R.D., Dudley, T.R. ve Akman Y.,(1979). hyperaccumalation of nickel by Alyssum Linaeus(cruciferae) Proc.R.Soc.Lond. Sect.B, **203**: 287-403.

Boath, S. C., Welch, A. M. Garner, R. C. (1980), some factors affecting mutant numbers in the *Salmonella*/microsome assay. Carcinogenesis, **1 (11)**: 911-923.

Çırpıcı, A. (1987). Türkiye'nin Flora ve Vejetasyonu Üzerindeki Çalışmalar, Doğa Türk Botanik Dergisi, **11,2**: 217-232.

Cummings, M.R., ve Klug, W.S. (2002). Genetik, 6. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 816.

- Dean, B.J., Brooks, T.M., Hodson-Walker, G., Hutson, D.H. (1985) "Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals", *Mutation Research*, Vol.153, pp.57-77.
- Demirsoy, A. (1988). *Kalıtım ve Evrim*, Ankara, s. 574-597.
- Demirsoy, A. (1991). "Biyoloji Genetik", Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Lisans Tamamlama Programı.
- Demirsoy, A. (1992). "Yasamın Temel Kuralları/Genel Biyoloji", Cilt 1, Kısım 1, Ankara, 196-200.
- de Serres, F. J. (1976). Report of the conference on in vitro mutagenicity and carcinogenicity tests, *Mutat. Res.*, **41**: 395-400.
- Eleperu, R. K., and M.B. Yarmolinsky (1979). A colorimetric assay of Iysogenic induction designed for screening potential carcinogenic and carcinostatic agents, *Environ. Mutagen.*, **1**: 65 – 78.
- Erdem,G.,Kalaycıoğlu, A., Öner, C. (1997). Observation of the Antimutagenic Potencies of Plant Extracts Against Pesticides in the Salmonella typhimurium strains TA98 and TA100, *Turk. J. Bot.*, **21**:127-130.
- Erensayın, C. (2000). "Genetik", Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 165-183p
- Erik, S, Tarıkahya B. (2004). Türkiye Florası üzerine, *Kebikeç*, **17**: 139–163.
- Erkan, S. (1992). *Moleküler Biyoloji*, Bornova / İzmir.
- Falakalı, B. (1993). "Genel Genetik", Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir, 84-97.
- Fenech, M., (2000). The in vitro Micronucleus Technique, *Mutation Research*, Found. Mol. Mec. Mut., **455**: 81 – 95.
- Gathouse, D., G., Rowland, I.R., Willox, P., Dander, R.D. and Foster, R. (1998). *Bacterial Mutation Assay, Basic Mutagenic Recommended Procedure The Bath, Press, Avon Research*, 227-234.

- Gren, M.H.L., Muriel, W.J., (1976). “Mutagen testing using Trp<sup>+</sup> reversion in E. coli”, Mutation Research, **38**: 3-32.
- Hedenstedt, A., Jenssen, D., Lidesten, B. M., Ramel, C., Rannung, U., Stern, R. M. (1977). Mutagenicity of fume particles from stainless steel welding, J. Work Environ. Health., **3**: 203-211.
- Hofnung, M., Quillardet, P.(1986). Recent developments in bacterial short-term for the detection of genotoxic agents. Mutagenesis, **1(5)**: 319-330.
- Izzo, A.A. ve Ernst, E. (2001). Interactions between herbal medicines and prescribed drugs, Drugs, **61**:2163–2175.
- Kada, T., Hirano, K. (1980). “Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*, chemical mutagens, principles and methods for their detection”, New York, Plenum. Hollaaendes, A., Serres, F., vol.6.
- Kasamatu, T., Kohda, K. ve Kawazoa, Y. (1996). Comparison of Chemically Induced DNA Breakage in Cellular and Subcellular Systems Using the Commet Assay, Mutat. Res., **369**: 1 – 6.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert A., Eichenlaub-Ritter U., Decordier I. (2003). “Indirect mechanisms of genotoxicity”, Toxicol Lett, **140-141**: 63-74.
- Klaassen, C. D. (2008). Casarett and Doull’s Toxicology, Seventh Edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division, Kansas City, Kansas.
- Klug, W.S and Cummings, M.R. (2002). Concept of Genetics, 6 th Edition, 0-13-081626-4 (Çev: ÖNER, C. Genetik Kavramlar, Palme yayıncılık, 816.
- Kramer, U., Charnack, J. M., Baker, A. J. M. (1996). Free Histidine As a Metal Chelator In Plants That Accumulate Nickel Nature, **379**: 635–638.
- Kürşat, Z. (1999). Bazı Crambe L: Türleri Üzerinde Morfolojik, Anatomik ve Palinolojik Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

- Levin, D. E., Yamasaki, E., Ames, B.N. (1982). A new Salmonella tester strain, TA 97 for the detection of framshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot, *Mutat. Res.*, **94**: 315-330.
- Maron, D. M., Ames, B. N. (1983). Revised methods for the mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**: 173-215.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka P.V., Decordier, I., Kirsch-Volder, M. (2006). "Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring", *Biochimie*, **88**: 1515-31.
- Mc Cann, J., Ames, B. N. (1976). Detection of Carcinogens as Mutagens in The Salmonella/microsome Test: Assay of 300 chemicals: Discussion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **73**: 950-954.
- McGregor, D., Prentice, R.D., McConville, M., Lee, Y.J., Caspary, W.J. (1984).  
Reduced mutant yield at high doses in the Salmonella/activation assay: the cause is not always toxicity. *Environmental Mutagenesis*, **6**: 545-557.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/ mikrosome mutagenicity assay. *Mutation Research*, **455**: 29-60.
- Norppa, H., Flack, M. ve Ghita, C. (2003). What Do Human Micronucleus Contain, *Mutagenesis*, Vol. 18 (3), pp 221.
- Oraler, G. (1990). "Genetik", İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstanbul, 177-178p.
- Öksüzoğlu E. (1997). "Bazı Bitki Büyüme Hormonlarının Mutajenitesinin *Salmonella*/mikrozom ve SOS Kromotest Sistemleri ile Araştırılması", *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Öksüzoğlu, E., Diril, N., Durusoy, M. (2000). Mutagenic effects of planth growth hormones with the Salmonella/microsome test and the SOS chromotest. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **65**: 691-698.

- Öner, C. (2003). “Genetik Kavramlar”, Palme Yayıncılık, 6. baskıdan çeviri, Türkiye, 455-467.
- Özbek, T. (2006). Doğuanadolu Tıbbı Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.
- Özdemir, Z., Demir E. (2010). Fındıkpinarı-Erdemli/Mersin bölgesinde Nikel akümülatörü bir bitki türü *Alyssum murale* Waldst.&Kit. Jeoloji Mühendisliği Dergisi **34 (1):** 57-70.
- Özhatay, N., Byfield, A., Atay, S. (2005). Türkiye'nin 122 önemli bitki alanı, WWF Türk, (Doğal Hayatı Koruma Vakfı) yayını, İstanbul.
- Perry, P., Evans, H. (1975). “Cytological detection of mutagens-carcinogens exposure by sister chromatid Exchange”, Nature (London), **258:** 121-125.
- Pienta, R.J., Poiley, J.A., Leebheiz, W.B. (1977). “Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens”, International Journal of Cancer, **19:** 624-655.
- Preston, R.J., Bender, A.W., Breven, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolf, S., Wassom, J.S. (1981). “Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays”, Mutation Research, 143-188.
- Principe, P.P. (1991). Valuing the biodiversity of medicinal plants. İn Conservation of Medicinal Plants, Ed: Akerele, O., Heywood, V.&Synge, H. Cambridge University Pres., Cambridge,79-124.
- Ramel, C., Rannung, U. (1980). “Short- term mutagenicity test”, Environmental Healt., Vol.6, pp.1065-1076.
- Reid, K.A., Maes, M.A., Staden, J.V., Kimpe, N.D., Mulhollve, D.A., Verschaeve, L., (2006). “Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants”, Journal of Ethnopharmacology, Vol.106, pp.44-50.

- Ribas, G., Surrales J., Carbonell E., Xemena N. ve Marcos R. (1996). Genotoxic Evolution of the Herbicide Trifluralin on Human Lymphocytes Expose in Vitro, *Mut. Res.* **371**: 15–21.
- Rosenkranz, H.S., Mermelstein (1980). “The Salmonella mutagenicity and the E. coli Pol A/Pol A1 repair assays evaluation of relevance to carcinogenesis. The predictive value of short-term screening test in the evaluation of carcinogenicity”, Elsevier/North-Holland , Amsterdam, 5-26.
- Signorelli, P. ve Ghidoni, R. (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **16**: 449-466.
- Slater, E.E., Anderson, M.D., Rosenkranz, H.S. (1971). “Rapid detection of mutagens and carcinogens”, *Cancer Research*, **31**: 970-973.
- Sofowora, A. (1999). The state of medicinal plants research in Nigeria, In: *Proceeding of workshop held at Ile-Ife, Nigeria*, 1–373.
- Temizkan, G.O. (1996). *Moleküler Genetik*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 281.
- Timbrell, J. (2002). *Introduction to toxicology*, Third Edition, Taylor & Francis, London, UK.
- Trosko J.E. (1997). Challenge to the Simple Paradigm That ‘Carcinogens’ are ‘Mutagens’ and to the In Vitro And In Vivo Assays Used to the Test The Paradigm, *Mutat. Res.*, **373**: 245–249.
- Quillardet, P., Hofnung, M. (1985). “The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures”, *Mutation Research*, **147**: 65-78.
- Ouillardet, P., de Bellecombe, C., Hofnung, M. (1985). “The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds”, *Mutation Research*, **147**: 89-85.
- Wyszynska, K. ve Liro W.C. (1991). The Use of Cytogenetic Tests for Evaluation of

Mutagenic Properties of Selected Dyes Applied in Textile and Cosmetic Industry. *Genetica Polonica*, Vol. 32 (3).

Vargas, V., Guidobono, R.R., Henriques, J.A., (1991). "Genotoxicity of plant extracts", *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **86(2)**: 67-70.

Vogel, E., Sobels, F.H. (1976). "The function of *Drosophila* in genetic toxicology testing, chemical mutagens, principles and methods for their detection", New York, London, Plenum Press, Hollaaender, A., 4.

Yıldırım, Ş. (2001). The Chorology of the Turkish Species of *Brassicaceae*, *Buddlejaceae* and *Buxaceae* Families, *The Herb Journal of Systematic Botany*, **8,1**:141-171.

#### **İnternet Kaynakları**

#### **Erişim Tarihi**

1.[http://www.academia.edu/1747390/Toksikoloji\\_ders\\_notlari](http://www.academia.edu/1747390/Toksikoloji_ders_notlari), 18.11.202

2.[http://www.genetiklab.com/index.php?pageNum\\_ana\\_icerkler=8&sayfa=dersane](http://www.genetiklab.com/index.php?pageNum_ana_icerkler=8&sayfa=dersane), 05.10.2012

3.[http://www.genetiklab.com/index.php?pageNum\\_ana\\_icerkler=8&sayfa=dersane](http://www.genetiklab.com/index.php?pageNum_ana_icerkler=8&sayfa=dersane), 16.10.2012

4.[http://www.beslenme.saglik.gov.tr/content/files/yayinlar/kitaplar/beslenme\\_bilgi\\_serisi\\_2/b16.pdf](http://www.beslenme.saglik.gov.tr/content/files/yayinlar/kitaplar/beslenme_bilgi_serisi_2/b16.pdf), 10.11 2012

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine Sevil ANAR  
Doğum Yeri ve Tarihi : Sakarya 02.05.85  
Yabancı Dili : İngilizce  
İletişim (Telefon/e-posta) : 05057576831/emn\_sevil@hotmail.com

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Batıkent Lisesi 2004

Lisans : Selçuk Üniversitesi-Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi-Ortaöğretim  
Fen ve Mat. Alanlar Eğt-Biyoloji Öğretmenliği 2009

Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji  
Bölümü 2010

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :Susuz Çok Programlı Lisesi 2009