

Bazı Buğday Türlerinin SOS/UMU Test Sistemi ile Antimutajenitelerinin Belirlenmesi

Mahşude Yağış Piyale

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2023

Determination of Antimutagenities of Some Wheat Species with SOS/UMU Test System

Mahşude Yağış Piyale

MASTER OF SCIENCE THESIS

December 2023

Bazı Buğday Türlerinin SOS/UMU Test Sistemi ile Antimutajenitelerinin Belirlenmesi

Mahşude Yağış Piyale

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Adnan Ayhancı

Aralık 2023

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mahşude Yağış Piyale' nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı ‘‘Bazı Buğday Türlerinin SOS/UMU Test Sistemi ile Antimutajenitelerinin Belirlenmesi.’ başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Adnan Ayhancı

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Adnan Ayhancı

Üye : Prof. Dr. Mustafa Uyanoğlu

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İlknur Kulcanay Şahin

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Adnan Ayhancı danışmanlığında hazırlamış olduğum ‘‘Bazı Buğday Türlerinin SOS/UMU Test Sistemi ile Antimutajenitelerinin Belirlenmesi.’ başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 05/12/2023

Öğrenci Adı Soyadı

Mahşude Yağış Piyale

İmza

ÖZET

Bu çalışmamızda, ülkemizde en sık kullanılan ekmeklik buğday türlerinden (*Triticum aestivum*); Müfit Bey, Naci Bey, Kınacı-97, Ekiz ve Yunus ekmeklik buğday türlerinin, antimutajenik potansiyellerinin bulunup bulunmadığını belirlemek için, SOS-UMU test sistemini kullanarak, *Salmonella typhimurium* NM2009 ve *Salmonella typhimurium* NM3009 bakteri suşları üzerinde test ettik.

Buğday dane ekstratları hazırlanırken, suda bekletme işlemi için; 2 ye 1 oranında su ve dane kg oranı kullanılmıştır. 40 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilen dane yemler, 65 °C’ de kurutulduktan sonra 0.5 ve 1 mm elekli değirmenlerde öğütüldü. 0,1 ml *S.typhimurium* NM 2009 ve *S.typhimurium* NM 3009 suşlarının donmuş örneklerinden alınarak, içinde 20 ml LB broth olan 50 ml’lik erlenlere ekildi ve gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Gecelik kültür TGA broth ile 1/50 kez dilue edilerek, 175 rpm’de 37 °C de OD600 değeri 0,25 ile 0,3 olana kadar inkübe edildi. Kültürler 0,9 ml’lik parçalar halinde, farklı konsantrasyonlardaki kimyasalların 30 µl’sini içeren steril tüplere eklendi ve 3,5 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, ayrı konsantrasyonlardaki kimyasalın sitotoksitesini belirlemek için, OD600 de her tüpün bakteri yoğunluğu spektrofotometrede okundu. B galaktosidaz aktivitesini belirlemek amacıyla hazırlanmış bir seri tüpe, absorbansı okunan kültürlerin 0,2 ml’si alınarak deneye başlandı. 0,2 ml kültür içeren her tüpe 1,8 ml Z tamponu, 50µl %0,1’lik SDS ve 10µl saf kloroform eklenerek vortekslendi. Reaksiyonu başlatmak için ortama 0,2 ml ONPG (4 mg/ml) çözeltisi eklendi ve tekrar vortekslendi. Renk oluşumu için 37 °C su banyosunda belirli bir süre bekletildikten sonra (10-60’) reaksiyon 1ml 1M Na₂CO₃ çözeltisi ile durduruldu. Test tüpleri 420 ve 550 nm de okundu, bu değerler üzerinden hesaplamalar yapıldı. UMU test sisteminde, B-galaktosidaz aktivitesinin kontrol grubuna göre en az 2 katlık bir artış göstermesi, kimyasalın genotoksiste açısından pozitif olarak değerlendirilebileceğinin bir göstergesidir. Antimutajenite yönteminde UMU testi ile direkt mutajen 4NQO mutajenik aktivitesinin, bitki buğday ekstreleri ile inhibisyonu saptanmıştır. Pozitif kontrolde saptanan enzim aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve 4NQO mutajeni varlığında buğday tanesi ekstreleri ile sağlanan enzim aktivitesi değerindeki azalma, antimutajenite olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: SOS-UMU, Antimutajenite, *Triticum aestivum*, Genotoksik.

SUMMARY

In our study, one of the most common wheat species in our country (*Triticum aestivum*); Müfit Bey, Naci Bey, Kınacı-97, Ekiz, and Yunus types were chosen. Species tested on *S. typhimurium* NM2009 and *S. typhimurium* NM3009 bacterial strains using the SOS-UMU test system to determine whether they have antimutagenic potential. While preparing wheat grain extracts, a 2:1 water and grain kg was used for the soaking process. The grains kept at room temperature for 40 hours were dried at 65°C and ground in mills with 0.5 and 1mm sieves. 0.1 ml of frozen samples of *S. typhimurium* NM 2009 and *S. typhimurium* NM 3009 strains inoculated into 50 ml flasks containing 20 ml of LB broth and incubated overnight. The overnight culture was diluted 1/50 times with TGA broth and incubated at 175 rpm at 37 °C until the OD600 value was 0.25 to 0.3. These cultures were added in 0.9 ml portions to sterile tubes containing 30 µl of the chemical at different concentrations and incubated for 3.5 hours. The bacterial density of each tube at OD600 was measured by spectrophotometer to determine the chemical cytotoxicity. To started the reaction, 0.2 ml of the cultures whose absorbance was read into a serial tube prepared to measure the β galactosidase activity. Each tube containing 0.2 ml of culture was added 1.8 ml of Z-buffer, 50 µl of 0.1% SDS and 10 µl of pure chloroform and vortexed. 0.2 ml of ONPG (4 mg/ml) solution was added to the medium to initiate the reaction and vortexed again. The particular time (10-60') in a 37 °C water bath for color formation, the reaction stopped with 1ml of 1M Na₂CO₃ solution. Test tubes were scanned at 420 and 550 nm, and were made on these values. The spectrophotometric measurement, the absorbance of O-nitrophenol was calculated using a correction factor to compensate for the light scattering. 2-fold increase in β -galactosidase activity compared to the control indicates the chemical can be considered positive for genotoxicity. The enzyme activity in the positive control was admitted as 100%. The decrease in the enzyme activity value provided in the presence of 4NQO mutagen was evaluated as antimutagenicity.

Keywords: SOS-UMU, Antimutajenic, *Triticum aestivum*, Genotoxic

TEŞEKKÜR

Başta, baş öğretmen Mustafa Kemal ATATÜRK'e saygı minnet ve özlemle... Lisans yıllarımdan, bugünlere kadar her zaman desteğini hissettiğim, tek gayesi bilim ve öğretmek olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Adnan AYHANCİ'ya, lisans yıllarımdan bugüne gerek eğitim hayatımda, gerekse okul dışındaki sorunlarda her zaman elini omzumda hissettiğim Arş. Gör.Emre CEYHAN'a, birlikte gülüp ağladığımız canım arkadaşım Uzm. Leman RASULZADE'ye, yüksek enerjisi ve pozitif bakış açısıyla her zaman moral olan canım hocam Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU'na, yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hakan ŞENTÜRK'e ve bölümümüzdeki bilime emek veren, gayesi ilim ve fen olan hocalarıma, istisnasız her düştüğümde elimi sıkıca tutan, bana olan inancını hiç kaybetmeyen ve her koşulda yanımda olan annem Berna KAFKAS'a, Biyolojiyle beni 6 yaşında tanıştıran sevdiren ve merakımı besleyerek mesleğimi seçmeme vesile olan babam Ahmet PİYALE'ye ve yeniden doğarak aramızda olmasından duyduğum mutluluk ve minnettarlık adına Sayın Emre Hoca'ma ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	2
3. MUTAJENLER	3
3.1. Fiziksel Mutajenler.....	3
3.2. Kimyasal Mutajenler.....	3
4. MUTASYONLAR	4
4.1. Mutasyonların Sınıflandırılması.....	4
4.2. Kromozom Yapısındaki Değişmeler.....	5
4.2.1. Delesyon.....	5
4.2.2. İnversiyon.....	5
4.2.2.1. Parasentrik inversiyon.....	6
4.2.2.2. Perisentrik inversiyon.....	7
4.3. Baz Değişimi Mutasyonları (Nokta Mutasyonlar)	7
4.3.1. Transisyon.....	7
4.3.2. Transversiyon.....	8

İÇİNDEKİLER

Sayfa

5. MUTAJENİK ETKİ VE MEKANİZMALARI.....	9
5.1. DNA ile Etkileşime Giren Kimyasal Mutajenlerin Etki Şekilleri.....	10
6. KULLANILAN EKMEKLİK BUĞDAY (<i>Triticum aestivum</i>) TÜRLERİ.....	12
6.1. Müfitbey Ekmeklik Buğday	12
6.2. Nacibey Ekmeklik Buğday.....	12
6.3. Kınacı-97 Ekmeklik Buğday.....	13
6.4. Ekiz Ekmeklik Buğdayı.....	13
6.5. Yunus Ekmeklik Buğdayı.....	13
7. DNA ONARI MEKANİZMALARI.....	14
7.1. Doğrudan Onarım Mekanizmaları.....	16
7.2. Doğrudan Onarım.....	19
7.2.1. Fotoreaktivasyon ile onarım.....	19
7.2.2. O ⁶ -MGMT ile onarım	20
8. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
9. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	25
10. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	28
11. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Mutasyonların Sınıflandırılması.....	4
4.2. Delesyon.....	5
4.3. İnversiyon.....	6
4.4. Parasentrik İnversiyon.....	6
4.5. Perisentrik İnversiyon.....	7
4.6. Transisyon Şeması.....	7
4.7. Transversiyon Şeması.....	8
5.1. Timin analogu olan 5-bromourasil'in kimyasal yapısı.....	10
5.2. Bir DNA zinciri boyunca komşu timidin birimleri arasında oluşan dimer.....	11
7.1. DNA Hasar Yanıt Reaksiyonları.....	15
7.2. DNA Tamir Mekanizmaları.....	15
7.3. Homolog rekombinasyon (HR) ve Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) Onarım Sistemi.....	17
7.4. İnsanda Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR).....	19
8.1. SOS-UMU Test Prensipleri.....	22
9.1. <i>Salmonella typhimurium</i> NM 2009 suşunun 4NQO Maddesi ile Verdiği Ünite cevabının doza göre grafiği.....	25
9.2. <i>Salmonella typhimurium</i> NM 3009 Suşunun 4NQO Maddesi ile Verdiği Ünite cevabının doza göre grafiği.....	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

9.3. <i>Salmonella typhimurium</i> NM 2009 suşunun 1-Müfit Bey, 2- Naci Bey, 3- Kınacı-97, 4- Ekiz ve 5- Yunus ekmeklik buğday türlerinin buğday türleri ile verdiği ünite cevabının doza göre grafiği.....	26
9.4. <i>Salmonella typhimurium</i> NM 3009 suşunun 1-Müfit Bey, 2- Naci Bey, 3- Kınacı-97, 4- Ekiz ve 5- Yunus ekmeklik buğday türlerinin buğday türleri ile verdiği Ünite cevabının doza göre grafiği.....	27

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

Açıklama

β	Beta
M	Molarite
DNA	Deoksribonükleik Asit
ONPG	O-nitrofenil- β Galaktozit
ONP	O-Nitrofenol
LB Broth	Luria-Bertani Broth
TGA	Tripton Glukoz Ampisilin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
4NQO	4-nitro Quinolin 1-Oxide
OD	Optik Yoğunluk
BER	Baz Eksizyon Onarımı
NER	Nükleotid Eksizyon Onarımı
MMR	Hatalı Eşleşme Onarımı
HR	Homolog Rekombinasyonel Onarım
NH-EJ	Homolog Olmayan Uç Birleştirme
O ⁶ -MGMT	O ⁶ -Metilguanin-DNA Metil Transferaz

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde teknoloji son derece hızlı gelişmekte ve insan hayatını kolaylaştırmaktadır. Ancak diğer taraftan da çevre kirliliğine neden olmakta ve tüm canlıları olumsuz etkilemektedir. Doğadaki tüm canlılar günlük yaşamlarında doğal veya yapay kimyasal maddelere oldukça sık maruz kalmaktadırlar. Günümüzde, insanların kullanımı için sunulan dört milyonun üzerinde kimyasal madde bulunmaktadır. Bu sayı her hafta altı bin kimyasal madde olarak da artmaktadır. İnsanların bilinçli ya da bilinçsiz olarak kullandığı kimyasalların sayısı yaklaşık altmış beş binin üzerindedir. Bununla birlikte, sadece yirmi bin kadar kimyasal mutajenik açıdan incelenmiş ve bir kısmının mutajenik potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Bu da bilim insanların araştırmak için oldukça geniş bir alan açmaktadır.

Çalışmamızda beş adet ekmeklik buğday türünün antimutajenik aktivitesini inceledik. Buğday türleri, içeriğindeki besin miktarları, üretildiği iklim, olumsuz şartlara dayanıklılıkları ve verimleri konusunda oldukça farklılık göstermektedir. Buğday üretiminde Türkiye' nin ilk on sırada olduğu düşünüldüğünde üretilecek türün belirlenmesi tüm bu değişkenler sebebiyle oldukça önem arz etmektedir. Bunların yanı sıra, artan bilimsel çalışmalar açıkça göstermektedir ki, beslenmenin hastalıklarla direkt ilişkisi vardır. Günümüz dünyasının tedavisi, ölüm riski ve maaliyeti düşünüldüğünde en zor sağımı yapılan hastalık kanserdir. Dolayısıyla kanserden korunmanın en etkili ve ekonomik yolu oluşumunun engellenmesidir. Bilindiği gibi her kanser birer mutasyon sonucu oluşur ve mutasyon olasılıklarını azaltmak doğal olarak kanser oluşumunu da azaltmak anlamına gelmektedir. Biz de çalışmamızda bazı buğday türlerinin anti mutajenitelerini belirleyerek, üretilecek türün seçiminde tercih edilme kriteri oluşturmayı amaçladık.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Beslenme ve kanser arasındaki olası ilişkiyi araştıran epidemiyolojik çalışmalar gösteriyor ki; çevre koşulları (iyonize radyasyon, güneş ışığı) ve genetik faktörler göz ardı edildiğinde, diyetle kanser oluşumu arasında kuvvetli bir ilişki göze çarpıyor. Günümüzde uygulanan cerrahi müdahaleler, kemoterapi ve radyoterapi gibi yardımcı tedaviler kanserden meydana gelen ölümleri azaltmasına rağmen, en etkin ve ekonomik yol aslında kanser oluşumunun engellenmesidir. Bu alanda yapılan epidemiyolojik araştırmaların bulguları değerlendirildiğinde, kansere bağlı ölümlerin %35'inde beslenmenin oldukça önemli rol aldığı görülmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalar da beslenmenin mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin yanı sıra, antimutajenik ve antikarsinojenik bileşikleri de içerdiği tespit edilmiştir (Çevik ve Pirinçci, 2017). Gıdalarda bulunan antimutajenik ve antikarsinojenik bileşiklerin; flavonoidler, polifenoller, lif, soya proteinleri, d-limonen, izoflavonlar, vitaminler (A, B grubu, C, E), linoleik asidin konjuge izomerleri, kalsiyum, selenyum, alifatik sülfidler, kateşin, tetrahidrokurkumin, sesaminol, kumarinler, ürik asit, indoller, tiyosiyanatlar ve proteaz inhibitörleri olduğu belirlenmiştir (Anonim, 2008).

Dünya üzerindeki buğday ekim alanları düşünüldüğünde Türkiye, %3 ile % 3.5 arasında bir paya sahiptir ve dünyada ilk on ülke arasındadır. Buğdaydan üretilen ürünlerde, buğdayın protein miktarı ve kalitesi en çok dikkat edilen faktörlerdendir. Buğday türlerinin içeriğindeki protein, buğday türüne ve yetiştirilme esnasındaki çevresel değişkenlere göre %6-22 oranında farklılık göstermektedir. Protein miktarlarında bu kadar farklı değişiklik görülmesi, ülkemizde yetiştirdiğimiz buğday türlerinin anti-mutajenik etkilerinin belirlenmesini de son derece önemli kılmaktadır. Buğdaydan elde edilen ürünlerde protein miktarı ve protein kalitesi en belirleyici faktörlerdendir. Besin yoluyla alınan proteinler; organizmanın gelişimini düzenleyen, onarım ve bakımını sağlayan ve dokuların yenilenmesi için gerekli olan farklı proteinlerin yapıtaşı olan aminoasitlerin kaynağıdır. Diyet açısından büyük öneme sahip olan esansiyel aminoasitler total protein miktarına bağlıdır. Esansiyel proteinler organizmada sentezlenmediğinden, rutin günlük diyet ile gerekli ölçüde alınmalıdır. (FM Anjum et al. 2004).

Bu çalışmada günümüz şartlarında maruz kalınan çeşitli mutajenik etkenlere karşı, ülkemiz şartlarında doğal ve bol bulunan bir gıda maddesi olan ekmeklik buğday *Triticum aestivum L.* ile yeni bir araştırma alanı ve çözüm yolu bulmayı amaçladık.

3.MUTAJENLER

DNA'ya etki ederek mutasyona sebep olan fiziksel veya kimyasal etkenlere mutajen denir. Mutajenler, kalıtsal materyale hasar verebilir veya kromozom sayılarını değiştirebilir. Mutajenler genellikle kalıtsal materyal üzerine fark gözetmeksizin etki ederler. Bu sebeple mutajenlerden kaynaklanan gen mutasyonlarında, etkilenen genlerin etkilenme şansları çoğu kez eşittir.

3.1. Fiziksel Mutajenler

X ışınları ve gamma ışınları iyonize radyasyon olarak tanımlanır. Bu ışınların sebep oldukları hasarlar, baz kaybı, baz delesyonu ve baz hasarlarıdır. Ayrıca, elektriksel alan, manyetik alan, sıcaklık, UV, morötesi ışınlar, nötron ışımaları, proton ışımaları gibi fiziksel etkenler de mutasyonlara sebep olan mutajenler olarak tanımlanmaktadır.

3.2. Kimyasal mutajenler

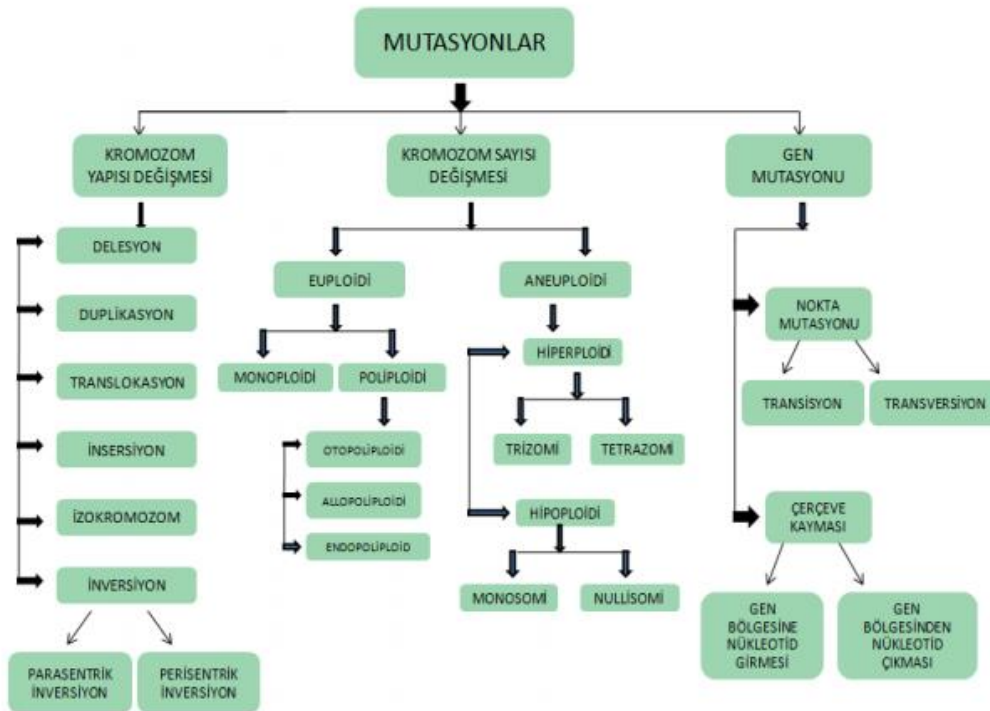
Kalıtsal materyal olan DNA çift sarmal yapıdadır. Kimyasal mutajenler bu çift sarmal yapısında hasara yol açarak, replikasyonun düzgün çalışmasına engel olurlar. Ayrıca bazların da yapılarında değişikliğe yol açabilirler. Böylece bazların eşleşme özelliklerinin kaybolmasına veya değişmesine yol açabilirler. Kimyasal mutasyonlar kalıtsal materyal üzerinde kalıcı değişikliklere sebep olurlar. Kimyasal maddelerin etkileri farklı olmakla birlikte, tamamının mutajenik özellikleri vardır. Sanayileşmesinin artmasıyla, atıklardan kaynaklanan ve sayıları her geçen gün artan farklı kimyasallar da mutajenler olarak değerlendirilmektedir.

4. MUTASYONLAR

Mutasyonlar kendiliğinden meydana gelebileceği gibi çevresel faktörlere bağlı olarak da gelişebilir. Bu şekilde, çevresel faktörler ile gerçekleşen mutasyonlara; indüklenmiş mutasyonlar denir.

4.1.Mutasyonların Sınıflandırılması

Mutasyonlar 3 temel başlıkta incelenmektedir. Kalıtsal materyalin yapısında değişime neden olan mutasyonlar, kalıtsal materyal (kromozom) sayısında değişime neden olan mutasyonlar ve daha küçük alanda etkili olan gen mutasyonları. Her mutasyon çeşidi de kendi içerisinde alt başlıklarda incelenir (Şekil 4.1.).

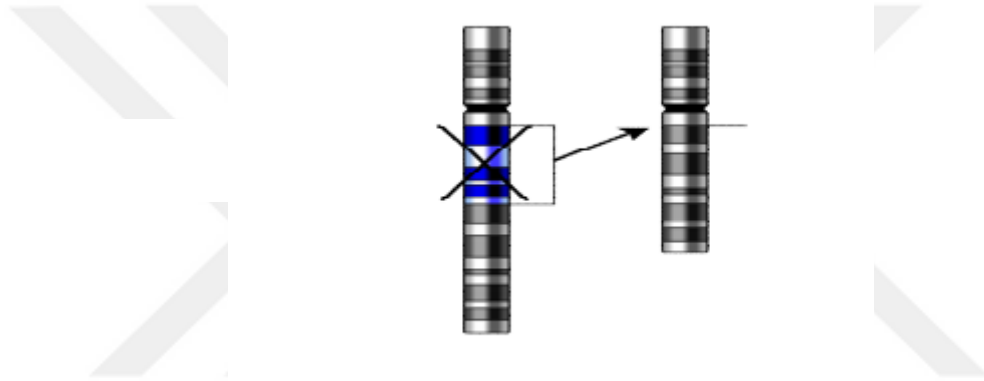


Şekil 4.1. Mutasyonların Sınıflandırılması

4.2. Kromozom Yapısındaki Değişmeler

4.2.1. Delesyon

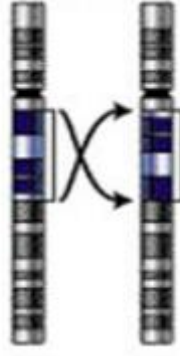
Kromozomun uç kısmının veya ara kısımlardan rastgele bir bölümün koparak yok olmasıdır. Delesyona uğramış kromozom, mayoz bölünme sırasında homolog karşıtı ile sinaps oluştururken kopan bölümün karşılığı olan kısım dışarıya doğru çıkıntı yaparak defisiyens lobunu oluşturur. Bu defisiyens lobunda bulunan resesif genler fenotipte özelliklerini gösterebilirler. (Şekil 4.2.)



Şekil 4.2. Delesyon

4.2.2. İnversiyon

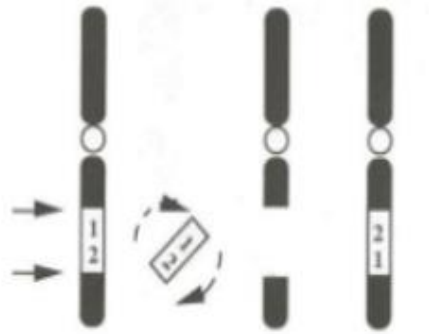
Kromozom iç kısmından koparak ayrılan bir parçanın 180° dönerek ayrıldığı kısma yeniden eklenmesidir (Şekil 4.3.) Sentromer koparak ayrılan kısmın üzerinde ise perisentrik inversiyon (Şekil 4.4.), değilse parasentrik inversiyon (Şekil 4.5.) denir.



Şekil 4.3. İnversiyon

4.2.2.1 Parasentrik inversiyon

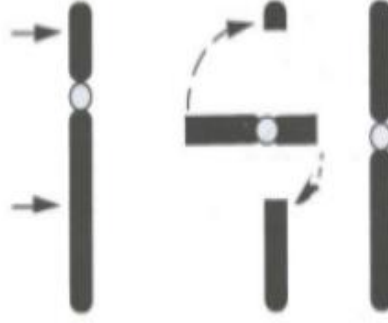
Sentromerin dahil olmadığı, uzun ya da kısa kolların birinde meydana gelen kırılmada, kırılan parçanın ters dönerek aynı kısma yapışmasıdır. (Şekil 4.4.)



Şekil 4.4. Parasentrik İnversiyon

4.2.2.2. Perisentrik İnverson

Sentromerin de dahil olduğu, uzun ve kısa kollardaki iki kırılmada, kırılan parçanın ters dönerek aynı kısma yapışması olayıdır. Bu mutasyon çeşidinde, kromozomun gen dizilimi ve boyu değişmektedir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Perisentrik İnverson

4.3. Baz değişimi mutasyonları (Nokta Mutasyonlar)

4.3.1. Transisyon

Pürin bazların pürinlerle, pirimidin bazların pirimidinlerle yer değiştirdiği mutasyonlardır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Transisyon Şeması

4.3.2. Transversiyon

Pürin bazların, pirimidin bazlarla yer değıştirdiğı mutasyonlardır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Transversiyon Şeması



5. MUTAJENİK ETKİ VE MEKANİZMASI

Bazı etkenlerin, hücrenin genetik materyalinde meydana getirdiği değişikliklere mutasyon denir. Mutasyonlar iki gruba ayrılırlar. Kendiliğinden oluşan (spontan) mutasyonlar ve mutajenlerin neden olduğu mutasyonlar. Mutasyon oluşturan etkenler; mutajen olarak isimlendirilirler. Bunlar çeşitli kimyasal maddeler veya fiziksel etkenler (UV- ışınları, radyasyon, x- ışınları, vb.) olabilir. Mutasyon sonucu oluşan bu yeni yapıya ise; mutant adı verilir.

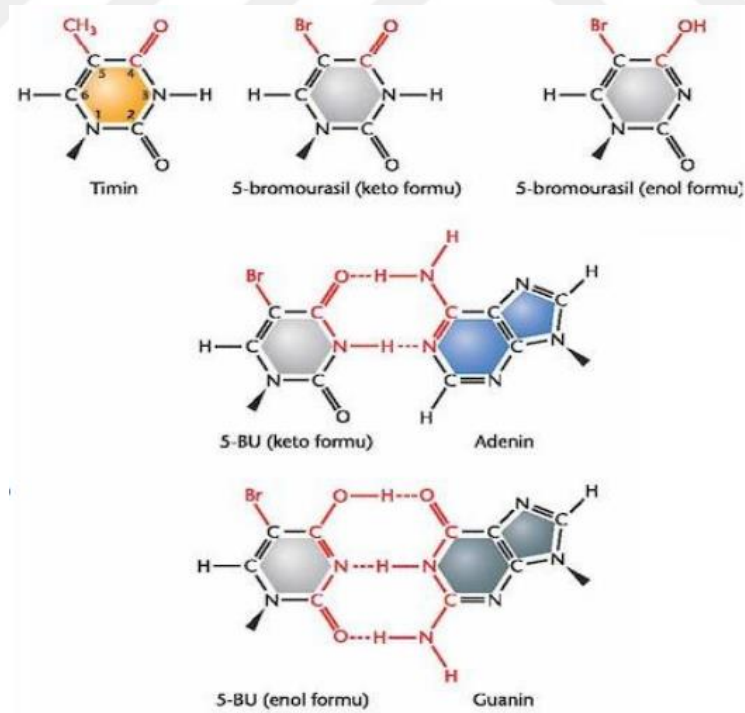
Mutajenik etki; genler veya kromozomlar üzerinde toksik bir etki oluşturduğundan, genotoksik etki olarak da ifade edilebilir. Her mutajenik etki olumsuz bir sonuç doğurmaz. Bazı mutasyonlar bireyin adaptasyon sürecine katkı sağlayan mutasyonlar olabilmektedir. Öte yandan bazı mutajenik etkiler ise kanser dahil birçok hastalığa sebep olmaktadır.

Hücresinin kanserleşmesine sebep olan bu ajanlara, karsinojen adı verilmiştir. Her karsinojen bir mutajendir, ancak her mutajen karsinojenik olmayabilir. Kansere neden olan maddeler sıklıkla DNA (deoksiribonükleik asit), RNA (ribonükleik asit) ve proteinlerde bulunan nükleofilik (elektronca zengin) yapılara kolayca etki edebilen, elektrofillik yapıdaki maddelerdir (Murray vd., 1993). Karsinojenite ve mutajenite arasında yüksek bir ilişki vardır. Bu nedenle kansere neden olan karsinojen maddelerin araştırılmasında, araştırılan maddelerin mutajenitesi esas alınır. (Temizkan GO., 1996).

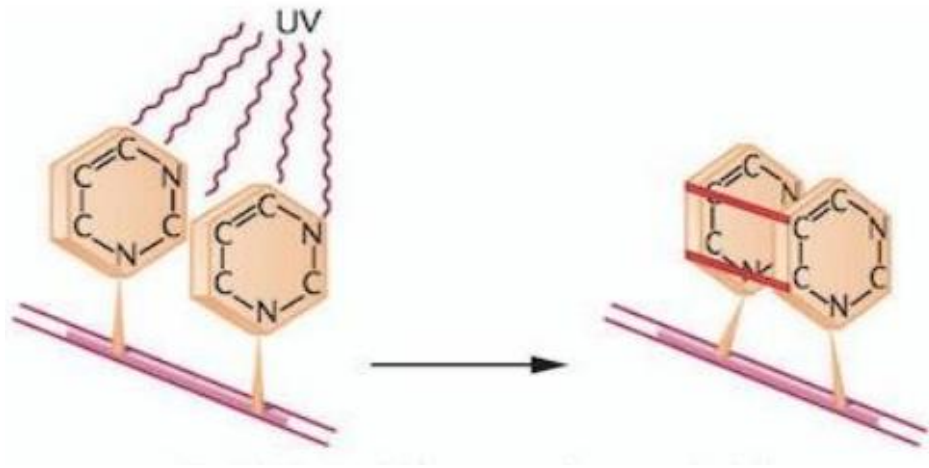
Genetik toksikolojinin en önemli çalışma alanlarından biri, mutajen maddelerin tespiti için test sistemlerinin geliştirilmesi, mutajenik etki mekanizmasının aydınlatılmasıdır. Bu çalışmalarla, mutasyon mekanizmasının insan sağlığı açısından oluşturduğu kalıtsal hastalık ve kanser risklerinin azaltılması amaçlanmaktadır (Barile FA., 2008).

5.1. DNA ile Etkileşime Giren Kimyasal Mutajenlerin Etki Şekilleri

- a- Baz Analöğü:** Nükleik asitlerin sentezlenmesi esnasında, pürin bazların ve pirimidin bazların yerini alabilen moleküllere baz analogları denir. Bu moleküller sıklıkla mutajen özellik taşıyan kimyasallardır. Örneğin; Urasilin bir türevi olan 5-bromourasil (5-BU), timin analöğü olarak davranır ve pirimidin halkasının 5 numaralı pozisyonunda halojenlenir. (Şekil 5.1.) DNA da BU'nun bulunması, aynı zamanda DNA'nın mutajenik UV ışınlarına karşı duyarlılığı da arttırır. (Hacettepe, 2018)
- b- Alkileyici ajanlar:** Nükleotitlerde bulunan keto veya amino gruplarına CH_3 veya CH_3CH_2 gibi bir alkil grubu ekler. (Memişoğlu, 2019)
- c- UV ışınları ve timin dimerleri:** Yüksek enerji taşıyan kısa dalga boyuna sahip ışınlar organik moleküllere hasar verirler. UV radyasyonu, yan yana duran iki timin bazı üzerinde pirimidin dimerleri oluşturur. (Şekil 5.2.) C-C (sitozin- sitozin) ve T-C (timin-sitozin) dimerleri oluşabilir (Memişoğlu, 2019).



Şekil 5.1. Timin analöğü olan 5-bromourasil



Şekil 5.2. Bir DNA zinciri boyunca komşu timidin birimleri arasında oluşan dimer

6. KULLANILAN EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum*) TÜRLERİ

6.1. Müfitbey Ekmeklik Buğday

2006 yılında, Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü ıslah araştırmaları ile tescil ettirilmiştir. Müfit Bey türünün boyu 100 – 110 cm, kılçıklı, daneleri set ve beyaz, başakları da beyaz renklidir. Kış şartlarına ve yatmaya dayanıklı, dane dökmeyen, orta geçici bir türdür ve kardeşlenme oranı yüksektir. Kurak hava şartlarına dayanıklı aynı zamanda da uyum yeteneği yüksektir. Yüksek verim alınabilirliği, kalitesinin iyi olması ve hastalıklara karşı dayanıklı olması tescil edilme sebeplerindendir. Yağışlı yıllarda verimi daha çok olmaktadır.

Daneleri beyaz ve sert, hektolitre ağırlığı, bindane ağırlığı, danede bulunan protein oranı ve enerji miktarı yüksek, ekmeklik kalitesi iyi olan bir buğday çeşididir. Tüm kışlık bölgelerde, kıyı kuşakları hariç yetiştirilmesi tavsiye edilmektedir (nbctarim, 2019).

6.2. Nacibey Ekmeklik Buğday

2008 yılında, Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü ıslah çalışmaları ile tescil edilmiştir. Başakları kılçıklı ve beyaz renklidir. Daneleri kırmızı renkli ve yarı serttir. Nacibey türünün bitki boyu 100-110 cm 'dir. Kış şartlarına, kuraklığa ve yatmaya dayanıklıdır.

Orta Anadolu ve Geçit Bölgeleri'nde kır bayır alanlar hariç kuru, yarı taban-taban alanlar ile pancar yetiştirilen yerler ve takviye sulama, gübreleme imkanları bulunan yerlerde yetiştirilmesi önerilir. Verim düzeyi 350- 400 kg iken, taban arazi takviye sulama ile 650 kg a kadar ulaşabilir (nbctarim, 2019).

6.3. Kınacı-97 Ekmeklik Buğday

Bahri Dağdaş Uluslararası Tarım Araştırma Enstitüsü tarafından 1997 yılında tescil edilmiştir. Kınacı-97 türünün başakları kılçıklı ve beyaz renklidir. Yaprakları yeşil renkli ve düz bir yapısı vardır. Başak yapısı orta sık ve uca doğru sivri yapıdadır. Doğal koşullarda sarı-kahverengi pasa dayanıklı bir yapısı vardır.

Taneler yuvarlakça ve kırmızıdır. 1000 tane ağırlığı 38-40 gr'dır. Soğuğa dayanımı iyi, kurağa ise hassas olan bu buğday çeşidi kırmızı yarı sert ekmeklik buğday sınıfındadır (tekirdağ ticaret borsası, 2019).

6.4. Ekiz Ekmeklik Buğdayı

Bahri Dağdaş Uluslararası Tarım Araştırma Enstitüsü tarafından 2004 yılında tescil edilmiştir. Sulu alanlar için geliştirilmiş, verimi oldukça yüksek bir buğday çeşididir. Bitki boyu 90-100 cm' dir. Başakları beyazdır. Kılçıklı, kırmızı renkli ve daneleri serttir. Yatmaya ve kış şartlarına dayanıklıdır ancak kuraklık şartlarına hassastır. 1000 dane ağırlığı 33-40 g, protein oranı % 12,5 - % 15,2 değeriyle ülkemizde oldukça tercih edilen bir ekmeklik buğday çeşididir (alptarım, 2019)

6.5. Yunus Ekmeklik Buğdayı

Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 12 yıllık bir araştırma sonucu, 2012 yılında üretilmiş ve şehrin simgesi olan Yunus Emre'nin ismi verilmiştir. Verim potansiyeli yüksektir ve ekmek kalitesi de yüksek bir buğday çeşididir. Dane görünümlü ve kırmızı sert ekmeklik buğdayı sınıfındadır. Başak rengi beyaz, kılçıksız ve iri başaklı olarak ürün vermektedir. Kışa dayanıklılığı iyi bir türdür. Bitki boyu 115-125 santimetre olup, yatmaya dayanımının da oldukça iyidir. Yunus Ekmeklik Buğday çeşidinin en önemli özelliklerinden biri tane dökmemesidir. 1000 dane ağırlığı 38-41 kg olup protein oranı %12,5 - % 14 ile oldukça yüksektir (nbctarım, 2019).

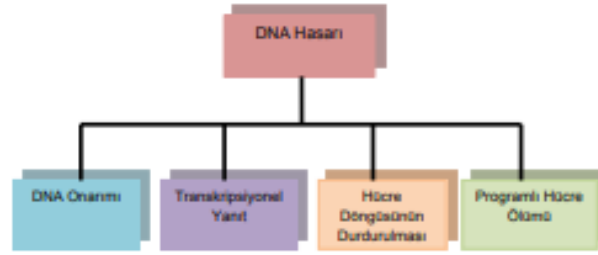
7. DNA ONARIM MEKANİZMALARI

Kalıtsal materyalde bir hasar meydana geldiğinde, hücre bu hasarın sonuçlarını en aza indirmek için DNA hasar reaksiyonları geliştirmiştir (Şekil 7.1.). DNA’ da meydana gelen hasarlarda oluşan hücresel yanıt, hücresel döngüdeki kontrol noktaları tarafından düzenlenmektedir. DNA’ da meydana gelen hasarın/hasarların doğru şekilde onarılması için gerekli süreyi sağlamak amacıyla, hücre siklusunun kontrol noktalarında duraklatılmaktadır.

Memeli hücrelerinde gerçekleşen en yaygın DNA tamir mekanizmaları, baz eksizyon onarımı (BER), nükleotid eksizyon onarımı (NER), çift iplik kırığı onarımı ve hatalı eşleşme onarımı (MMR) (Maynard vd., 2009) (Şekil 7.2). NER, BER ve MMR tamir mekanizmalarının çalışma şekli hasarlı olan DNA kısmının kalıtsal materyalden uzaklaştırılması, boşluğun yeni bazlarla doldurulması ve uçların bağlanmasıdır (Friedberg, E.C., 2003). BER, abazik alanlar, DNA tek iplik kırıkları ve baz modifikasyonlarının onarımından sorumludur. NER, DNA’nın ikili sarmal yapısında hasar oluşturan geniş DNA lezyonlarını onarma mekanizmasıdır. Çift iplik kırıklarının tamiri; DNA’ nın her iki ipliğinin şeker fosfat omurgasında birbirlerine yakın olan ve hasar almış DNA alanlarının tamirini sağlamaktadır. MMR, replikasyon sırasında meydana gelen hasarları onarmaktadır. Ayrıca MMR, DNA polimeraz enziminin oluşturduğu hataların onarımı için de kullanılmaktadır (Stojic vd., 2004).

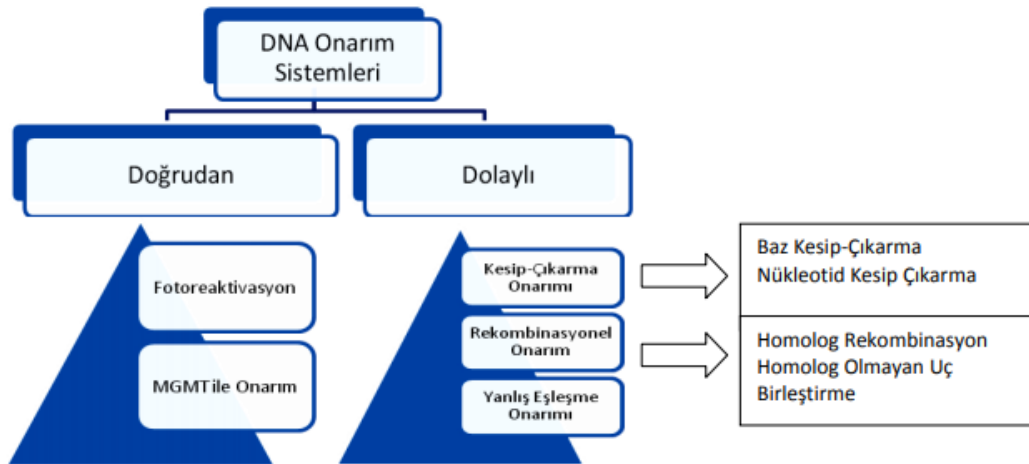
DNA’da oluşan hasarlar/hatalar kendiliğinden rastlantısal olarak olabilir. Ya da hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen; kolesterol ve östrojen metabolitleri, reaktif karbonil türleri, endojen alkilasyon ajanları, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinden kaynaklanan hatalar da olabilmektedir (Iyama and Wilson, 2013).

Eksojen yani çevresel faktörler de DNA hasarına neden olabilmektedir. Bunlar, UV, iyonize radyasyon, ağır metaller, hava kirliliği, sigara dumanı, kemoterapi ilaçları şeklinde sıralanabilir (Ciccia and Elledge, 2010).



Şekil 7.1. DNA Hasar Yanıt Reaksiyonları (Sancar vd., 2004)

Hücreler, hayatta kalabilmek için hücresel bütünlüğü dolayısıyla da gen bütünlüğünü korumak zorundadır. Bunu sağlayabilmek için de bir dizi karmaşık DNA tamir mekanizmasına sahiptirler (Ciccia ve Elledge, 2010). Bu her bir mekanizmanın bir başka mekanizma ile kontrol edilmesi ve sağlama yapılması anlamına gelmektedir. DNA onarımı kimyasalar olarak modifiye olmuş bazı enzimlerin, enzimatik aktivitelerine göre gerçekleşmektedir. Bu enzimler; nükleazlar, helikazlar, polimerazlar, topoizomerazlar, rekombinazlar, ligazlar, glikozilazlar, demetilazlar, kinazlar ve fosfatazlardır. Ökaryot yapıdaki hücreler, doğru faktörleri, doğru anda aktive etmek için oluşmuş stratejilere sahiptirler (Ciccia ve Elledge, 2010).



Şekil 7.2. DNA Tamir Mekanizmaları (Sameer vd., 2014)

7.1.Doğrudan Onarım Mekanizmaları

A- Kesip-Çıkarma Onarımı

- Baz Kesip-Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair) (BER)

BER, alkilasyonun, deaminasyonun, oksidasyonun ve DNA eşleşme hatalarından kaynaklanan küçük DNA modifikasyonlarının onarımından sorumludur. BER, DNA onarımı için önemli bir sistemdir (Weissman vd., 2007).

- Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair) (NER)

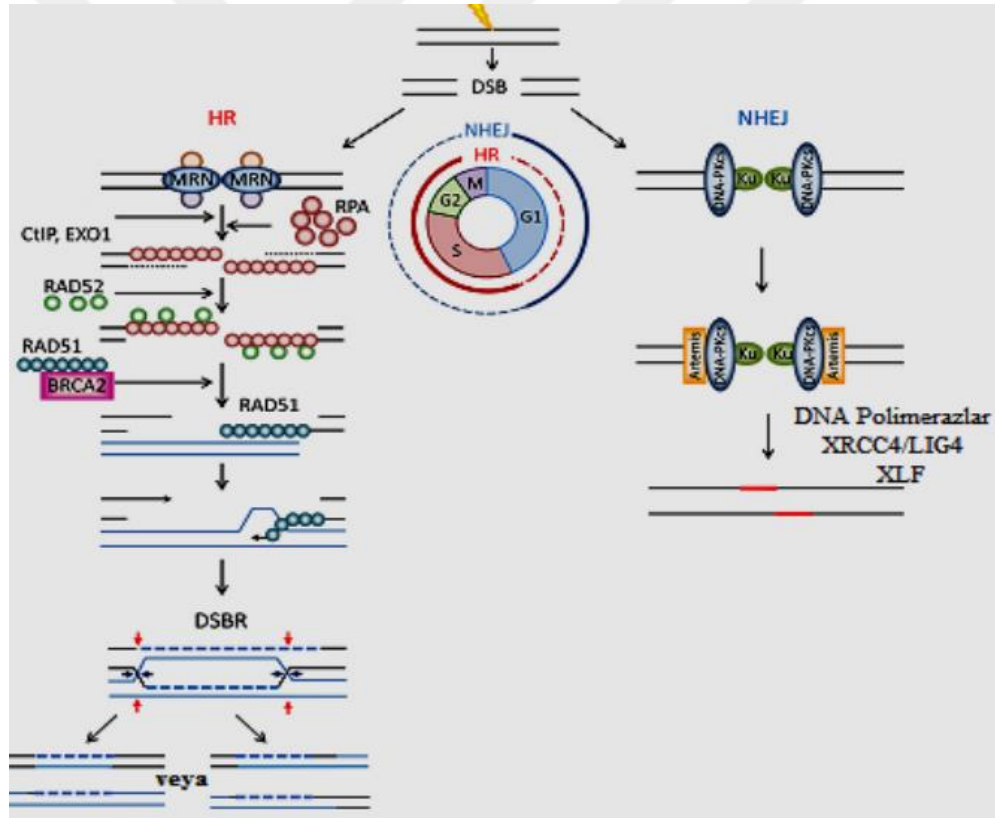
UV ile indüklenmiş, güneş ışınlarının etkisiyle oluşan pirimidin dimerlerinin, mutajenite oranı yüksek kimyasal maddelerin (sigara dumanı gibi) neden olduğu baz değişimlerinin ya da kemoterapi ilaçlarının neden olduğu baz değişimlerinin tamirinde NER mekanizması devreye girmektedir. DNA eklentilerinden dolayı meydana gelen hataların tamirini sağlar (Morita vd., 2010).

B- Çift Zincir Kırık Onarımı

Çift zincirde meydana gelen kırıklar, kalıtsal materyal bütünlüğün bozulmasıyla sonuçlanabilen kromozomal kırıklardır. Çift zincir kırıkları; ekzojen nedenlerle indüklenebilir (iyonize radyasyon, genotoksik bileşikler). Ayrıca hücrelerdeki metabolik aktiviteler sonucu oluşan, reaktif oksijen gibi yan ürünlerden de kaynaklanabilir. Rekatif oksijenler replikasyon, mayotik rekombinasyon ve DNA onarımı sırasında replikasyon çatalının çökmesine sebep olabilmektedir. (Japessen vd., 2011). Onarılmayan çift zincir kırıkları hücre ölümüne sebep olabilmektedir. Bu sebeple bu tür mutasyonların onarımı hücre için hayati önem taşımaktadır (Japessen vd., 2011).

- Homolog Rekombinasyonel Onarım (Homologous Recombination Repair) (HR)

Homolog Rekombinasyonel(HR) onarım, kardeş kromatidlerin bir iplikçliğini kalıp olarak, kromozomlarda oluşan çift zincir kırıklarının tamirinin sorunsuz olarak yapılmasına olanak tanır. HR, hücre siklusunda, bölünme esnasında, homolog kardeş kromatidlerin ulaşılabilir olduğu zaman, yani siklusun S, G2/M fazlarında meydana gelmektedir. Ayrıca HR, replikasyon çatalının korunmasında, telomer bakımında ve mayoz I'de meydana gelen kromozomların eşit olarak oluşacak hücrelere dağılımında da rol alır (Slupphaug vd., 2003) (Şekil 7.3.).



Şekil 7.3. Homolog rekombinasyon (HR) ve Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) Onarım Sistemi.

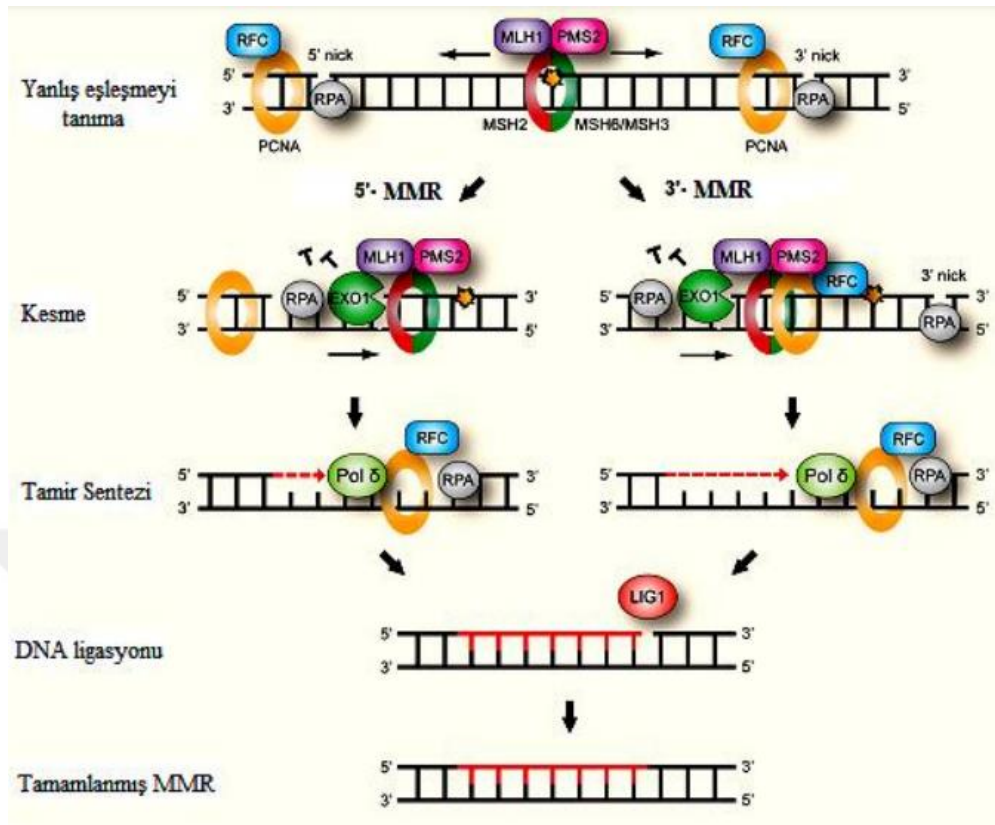
-Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NonHomologous End Joining) (NH-EJ)

Homolog olmayan uç birleştirmenin (NH-EJ) en aktif olduğu hücresel döngü aşaması G1 fazıdır. Hücre siklusundan bağımsızdır. Bölünen ve bölünemeyen hücrelerde görülebilir. (Iyama ve Wilson, 2013). NHEJ, kromozomlarda meydana gelen çift zincir kırık uçlarını modifiye ederek birbirine bağlar. Bu onarım mekanizmasında hasar almış DNA kalıbına gerek yoktur. Hata oranı yüksek bir sistemdir ancak birkaç nükleotid kaybı göze alınarak DNA tamiri yapılır (Slupphaug vd., 2003).

Homolog olmayan uç birleştirme (NH-EJ) ve Homolog Rekombinasyonel (HR) tamir mekanizmalarından hangisinin kullanılacağına hücre döngüsünün fazına göre karar verilmektedir. Eğer hücre, kardeş kromatidlerin ulaşılabilir olduğu S/G2 fazlarında ise HR yolu tamir için kullanılmaktadır. Homolog olmayan uç birleştirme mekanizması ise hücre eğer G1 fazında ise aktif hale gelmektedir.

C- Yanlış Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair) (MMR)

Yanlış eşleşmeler anlamsız sonuçlara sebep olabileceği gibi tek bir baz değişikliği ile farklı ve fonksiyonsuz aminoasitlerin oluşumlarına da neden olabilmektedir. Örneğin olarak hücre anemisinde 17. Nükleotitte Adenin yerine Timin geldiğinde, Glutamik asid yerine Valin oluşur. Genellikle birden fazla kodona sahip aminoasitlerin gen dizilimlerinde meydana gelen yanlış eşleşmeler sessiz mutasyonlar olarak adlandırılır ve anlamsızdırlar. DNA eşleşmesi ve DNA rekombinasyonu sırasında oluşan insersiyon-delesyon looplarının uzaklaştırılması MMR' nin birincil görevidir (Martin vd., 2010). MMR mekanizmasında oluşabilecek olası hatalar, hücre fonksiyonlarını ve hücresel yapıyı olumsuz yönde etkileyerek, tümör oluşumuna veya dejeneratif hastalıkların oluşumuna sebep olabilir. İnsanlarda MMR mekanizması için en az 6 farklı proteine ihtiyaç vardır. (Şekil 7.4) MSH proteinleri, hasarlı olan zincirin eşleşmesini engellemek ve tek zincirde meydana gelen kırıkları tamir etmek için, eşleşme sırasında gen dizilimlerindeki hataları tanımaktadır. Hatalı eşleşen kısımları tanımak için, MSH2 proteini MSH6 ya da MSH3 ile bir heterodimer oluşturur. MMR mekanizması ATP'ye bağımlı bir şekilde çalışmaktadır (Li, 2008).



Şekil 7.4. İnsanda Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR) (Jappesen vd., 2011)

7.2. Doğrudan Onarım

7.2.1 Fotoreaktivasyon ile Onarım

Fotoreaktivasyon, ultraviyole ışınlarından kaynaklanan mutasyon taşıyan hücrelerin, mavi spektrum barındıran ışığa maruz bırakıldığında, hasar alan kısımların kendiliğinden düzelmesi olayına denir. Bu mekanizmada kullanılan fotolizaz enzimleri aktif olarak görev alır ve fotoürünlerin uzaklaştırılmasını sağlarlar. Fotoreaktivasyon tamir mekanizması insan da dahil birçok ökaryot türde yoktur. Ancak bitkilerde, birçok omurgalıda, mantarlarda ve bakterilerde bulunur (Sancar vd., 2004).

7.2.2. O⁶-MGMT ile Onarım

Alkilasyon ajanları günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. (Örn: Metilasyon ajanları) O⁶ Metilguanin-DNA metiltransferaz (O⁶-MGMT) de yaygın kullanılan bu ajanlardandır. Alkilasyon ajanları, hücrel moleküllere (DNA, RNA, Protein gibi) alkil gruplarını transfer ederler. Bu ajanlar, DNA omurgasında bulunan fosfodiester bağlarının oksijeni ile beraber, nükleik asitlerin oksijen ve nitrojen içeren nükleofilik kısımlarıyla reaksiyona girer (Hansen vd., 2007). Sonuç olarak hasardan kaynaklı yanlış bir şekilde metillenen bazların metil gruplarını kendisine transfer ederek normal bir Guanin bazı oluşumunu sağlamaktadır.

Sonuç olarak, endojen veya ekzojen genotoksik ajanlar DNA hasarına yol açarlar. Eğer bu hasarlar onarılmazsa nörolojik anomaliler, kanser, bağışıklık hastalıkları, erken yaşlanma gibi çeşitli hastalıklar oluşabilmektedir (Iyama ve Wilson, 2013). Bu tür zararları önlemek için hüceler, çok aşamalı ve çeşitli kontrol mekanizmaları olan DNA tamir mekanizmaları geliştirmişlerdir (Iyama ve Wilson, 2013). Organizmanın hayatta kalmasında ve gelişmesinde DNA tamir mekanizmalarının koordinasyonu ve işleyişi oldukça önemlidir (Ciccio ve Elledge, 2010).

8. MATERYAL VE YÖNTEM

Umu test sistemi, çevresel karsinogen ve mutajenlerin mutajenik etkilerini belirlemek için oluşturulmuş olan kolorimetrik, bakteriyel bir test sistemidir. SOS cevabı, DNA hasarı ile indüklenen bir mekanizmadır. UMU-test sistemi de bu mekanizma baz alınarak geliştirilen bir test sistemidir (Oda vd., 1991) (Şekil 8.1.).

SOS cevap sistemi regülatör bir sistemdir. DNA hasarı ile indüklenen sistemlerden ilk karakterize edilendir. Ayrıca en geniş, en karmaşık ama aynı zamanda en iyi anlaşılmış olanıdır. Bu nedenle çalışmamızda bu sistemi kullanmayı tercih ettik.

Buğday Dane Ekstratının Hazırlanması

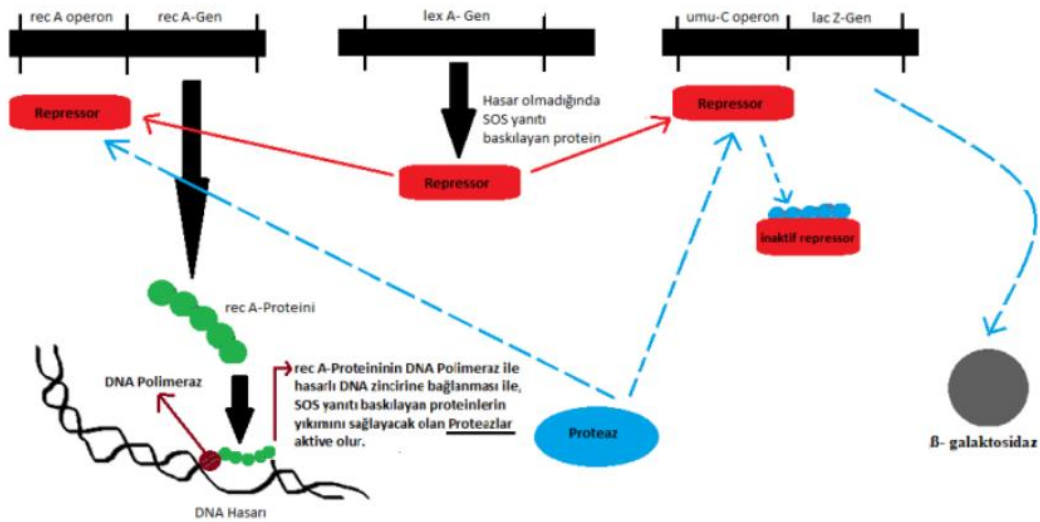
Buğday daneleri öğütülmeden önce, 2 l su/kg dane olacak şekilde, 40 saat boyunca oda sıcaklığında suda bekletildi. 65 °C' de buğday daneleri kurutuldu. Daha sonra 0.5 ve 1 mm elekli değirmenlerde öğütme işlemi uygulandı.

Sitotoksik Etkinin Saptanması

Umu-test mekanizmasında kullanılan kimyasal, bakteri kültürü ile inkübe edilir. Ardından optik dansitesi 600 (OD600) de bakteri yoğunluğu okunur ve kontrol grubuna göre bakteri yoğunluğunu düşüren dozlar sitotoksik olarak tanımlanır. Biz de deneyimizde, buğday taneleri ekstratlarının sitotoksik dozunu bu şekilde belirledik (4,5,6).

β -Galaktosidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

β -galaktosidaz aktivitesi Quillardet ve Hofnung (1985)'ın yöntemine göre saptandı. Buna göre β -galaktosidaz aktivitesinin ölçülmesi için belirlenen tüplere 1,35 ml Z tamponu eklenerek 37 °C lik su banyosunda 5-10 dakika inkübasyona bırakıldı. Eşit sıcaklık oluştuktan sonra ONPG (4mg/ml) çözeltisinden 0,3 ml eklenerek reaksiyon başlatıldı. Renk oluşumu için uygun bir süre (10-120 dk) beklendi ve her tüpe 1 M Na₂CO₃ çözeltisinden 1ml eklenerek reaksiyon durduruldu. Test tüpleri 420 nm de okundu. Okunan bu değerler ünite hesaplamalarında kullanıldı.



Şekil 8.1. SOS-UMU Test Prensibi

Deneyin Yapılışı

Salmonella typhimurium NM 2009 ve *Salmonella typhimurium* NM 3009 suşlarının donmuş örneklerinden 0,1 ml alındı. 20 ml LB broth içeren 50 ml'lik erlenlere ekim yapıldı. Gece boyu inkübasyona bırakıldı. Gecelik kültür TGA broth ile 1/50 kez dilue edildi ve 175 rpm'de 37 °C de OD600 değeri 0,25 ile 0,3 olana kadar inkübe edildi. Ardından bu kültürler, 0,9 ml'lik parçalar şeklinde, farklı konsantrasyonlardaki kimyasalların, kimyasalın 30 µl'sinin içinde bulunduğu steril tüplere eklendi ve 3,5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, farklı konsantrasyonlardaki kimyasalın sitotoksitesini belirlemek için, spektrofotometrede, OD600 de her tüpün bakteri yoğunluğu okundu. B galaktosidaz aktivitesini belirlemek için hazırlanmış bir dizi tüpe, absorbansı okunan kültürlerin 0,2 ml'si eklenerek deneye başlandı. 0,2 ml kültür içeren her tüpe 1,8 ml Z tamponu, 50µl %0,1'lik SDS ve 10µl saf kloroform eklenerek vortekslendi. Daha sonra reaksiyonu başlatmak için ortama 0,2 ml ONPG (4 mg/ml) çözeltisi eklendi ve tekrar vortekslendi. Renk oluşumu için 37 °C su banyosunda belirli bir süre bekletildikten sonra (10-60') reaksiyon 1ml 1M Na₂CO₃ çözeltisi ile durduruldu (Oda vd., 1996).

Test tüpleri 420 ve 550 nm de okundu ve bu değerler aşağıdaki formülde yerine konarak ünite hesaplamaları yapıldı.

$$A_{420} — 1,75$$

$$\text{Ünite} = 1000 \times \frac{A_{420} - 1,75}{t \cdot v \cdot A_{600}}$$

den hesaplandı.

t = reaksiyon süresi (dakika)

v = kültürün miktarı (mililitre olarak)

A₆₀₀ = 600 nm de okunan kültürün yoğunluğu

β -galaktosidaz, β -galaktosit'leri hidroliz eden bir enzimdir. Bu enzim aktivitesi ONPG gibi renksiz substratların hidrolizi ile oluşan renkli ürünlerin spektrofotometre ile okunmasıyla kolaylıkla saptanabilir. B-galaktosidaz varlığında ONPG, galaktoza ve O-nitrofenol'e (ONP) dönüşür. O-nitrofenol sarı renklidir ve 420 nm de absorbansı ölçülebilir. 420 nm deki okuma gerçekte O-nitrofenolün absorbansı ile hücre kalıntıları tarafından oluşturulan ışık saçılımının bir kombinasyonudur. Bu durum, başka bir dalga boyunda (örneğin 550 nm) okuma yapılarak elde edilen absorbans ile düzeltilebilir. Çünkü 550 nm de sadece hücre kalıntılarının ışık yayılımı vardır ve O-nitrofenolden gelen bir katılım yoktur. 420 nm deki ışık yayılımı 550 nm'dekiyle orantılıdır (Oda ve Yamazaki, 1996).

Özetle, O-nitrofenolün absorbansını doğru değerlerde hesaplamak için, ışık dağılımını dengeleyici bir düzeltme faktörü kullanılmalıdır.

Umu-test sisteminde, B-galaktosidaz aktivitesinde meydana gelen ve kontrol grubuna göre en az 2 katlık bir artış, kullanılan kimyasalın genotoksisite bakımından pozitif olarak değerlendirilebileceği anlamını taşımaktadır (Oda vd., 1996).

Anti Mutajenite testi

Antimutajenite yöntemi Dr. Yoshimitsu Oda tarafından önerilen yönteme göre yapıldı. Antimutajenite yönteminde UMU testi ile direkt mutajen 4NQO mutajenik aktivitesinin, bitki buğday ekstreleri ile inhibisyonu saptanmıştır. Pozitif kontrolde saptanan enzim aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve 4NQO mutajeni varlığında buğday tanesi ekstreleri ile sağlanan enzim aktivitesi değerindeki azalma antimutajenite olarak değerlendirilmiştir.

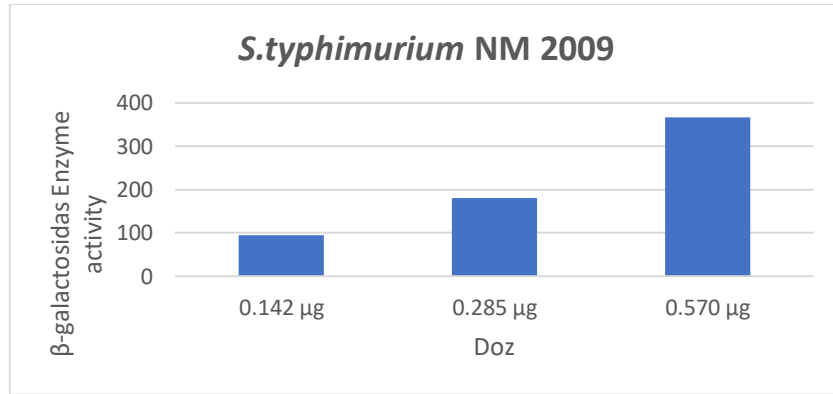
9. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda bazı kullanılan ekmeklik buğday türlerinden (*Triticum aestivum*), 1- Müfit Bey, 2- Naci Bey, 3- Kınacı-97, 4- Ekiz ve 5- Yunus ekmeklik buğday türlerinin antimutajenik potansiyellerinin bulunup bulunmadığını sınamak için kısa zamanlı testlerden, SOS-UMU test sistemini kullanarak *Salmonella typhimurium* NM2009 ve *Salmonella typhimurium* NM3009 bakteri suşları üzerinde test ettik.

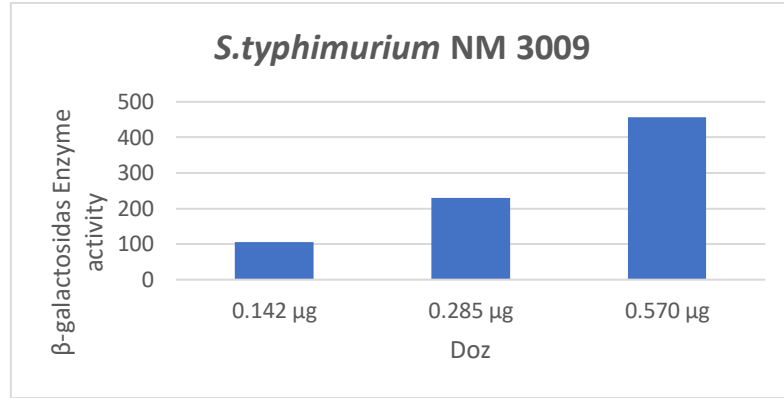
Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda 1, 4 ve 5 no'lu buğday türlerimizin kuvvetli antimutajenik etki gösterdiğini tespit ettik. 2 ve 3 no'lu ekmeklik buğday türlerimizin orta derecede antimutajenik aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Salmonella typhimurium NM2009 ve *Salmonella typhimurium* NM 3009 suşlarının her ikisinde de, 4NQO mutajeni kullandığımızda dozla doğru orantılı olarak artan bir mutajenik aktivite izlenmiştir (Şekil 9.1. ve Şekil 9.2.).

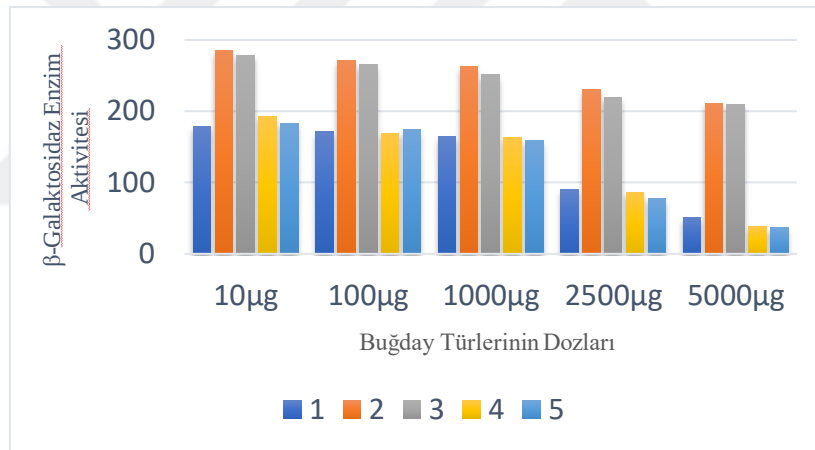
Sitotoksik etkisini ölçtüğümüz 4NQO mutajenine maruz bırakılan bakteri suşlarını, anti-mutajenik aktivitesini ölçmek istediğimiz buğday türleri ile inkübe ettiğimizde ise mutajenik aktivitelerinde ciddi azalmalar tespit ettik (Şekil 9.3. ve Şekil 9.4.).



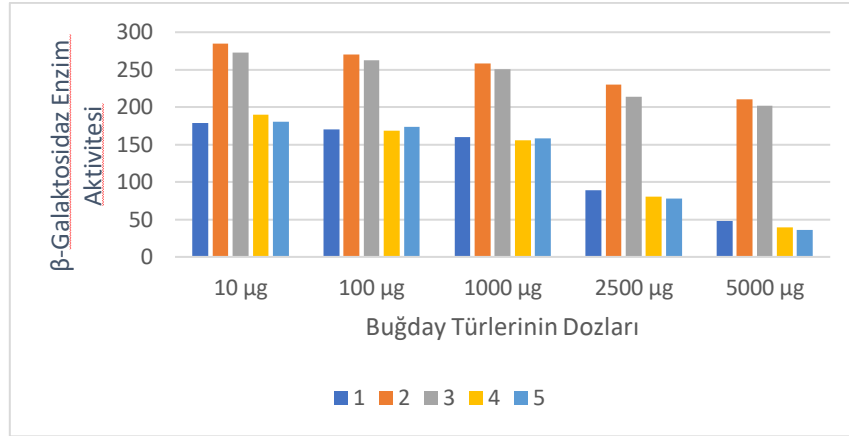
Şekil 9.1. *Salmonella typhimurium* NM 2009 suşunun 4NQO Maddesi ile verdiği Ünite cevabının doza göre grafiği



Şekil 9.2. *Salmonella typhimurium* NM 3009 suşunun 4NQO Maddesi ile verdiği Ünite cevabının doza göre grafiği



Şekil 9.3. *Salmonella typhimurium* NM 2009 suşunun 1-Müfit Bey, 2- Naci Bey, 3- Kınacı-97, 4- Ekiz ve 5- Yunus ekmeklik buğday türlerinin buğday türleri ile verdiği Ünite cevabının doza göre grafiği



Şekil 9.4. *Salmonella typhimurium* NM 3009 suşunun 1-Müfit Bey, 2- Naci Bey, 3- Kınacı-97, 4- Ekiz ve 5- Yunus ekmeklik buğday türlerinin buğday türleri ile verdiği Ünite cevabının doza göre grafiği

10. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğru beslenme sadece vücudun ihtiyacı olan kadarını almak değil, aynı zamanda sağlığın korunması ve olası hastalıklardan korunmak için oldukça dikkat edilmesi gereken bir konudur. Bağışıklık sisteminin güçlenmesi ve hastalıklara yakalanma riskinin azaltılması için güvenilir gıdalar tercih edilmelidir. Buğday ve buğday ürünleri, sadece bir besin maddesi olarak değil, aynı zamanda içeriğindeki insan sağlığına olumlu katkıda bulunan ve sağlığın korunmasında rol oynayan yararlı maddeler taşıyan, hastalıkların riskini azaltan ve önleyici etkilerinin bilindiği bir gıdadır (Ryan et al. 2011). İnsan sağlığını koruyucu fenolik ve antioksidan etkileri olan gıdalar son yıllarda gündeme gelmiştir. 2012 yılında yapılan bir araştırmaya göre Dünya üzerinde 216 milyon hektar üretim alanı ile Buğday, tahıl üretiminde birinci sıradadır. Buğdayın içeriğinde bulunan fitokimyasal maddeler (E vitamini, fenolik bileşikler, karotenoidler) doğal antioksidan kaynağıdır. Bu bileşikler, güçlü antioksidan aktiviteleri ile insan ve hayvanlarda birçok kronik hastalığı önleyebilir veya ilerlemesini durdurabilir (Menteş-Yılmaz 2011).

Buğdayların Aleuron tabakasında yer alan proteinler (Globulin, Albumin), buğday tanesindeki toplam proteinin yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır. (Ereku O. ve ark, 2016) Gıda yoluyla alınan proteinlerin canlılarda birçok görevi bulunmaktadır. Başta dokuların onarımı, enzim aktivitesi, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, organizmadaki sistemlerin düzenlenmesi gibi birçok hayati konuda proteinler görev almaktadır. Bu proteinler beslenme fizyolojisi açısından önem taşımaktadırlar. Bu tabaka insan ve hayvan beslenmesinde değerli besin içeriğinin olduğu kısımdır. Buğday tanesi vitaminler, iz elementler, mineraller, yağ asitleri, karbonhidrat, protein ve sekonder bitki metabolitleri olan fenoller açısından zengindir. Bu besin maddeleri buğday tanelerinin farklı kısımlarında bulunmaktadır. Bu nedenle öğütme işlemi mümkün olduğunca kabuk kısmına yakın olmalı ve un randımanı arttırılmalıdır. Böylece beslenme fizyolojisi bakımından içerik zenginleşmektedir.

Buğdayların içerdikleri besin maddeleri bu kadar değişkenlik gösterirken, antimutajen, antioksidan, antikanserojen özelliklerinin de farklı olması oldukça normaldir. Yapılan çalışmalar, ekmeklik buğday türlerinin bazılarında mevsimsel değişkenlere göre antioksidan aktivitenin değiştiğini göstermiştir. (Ge vd., 2006; Simova-Stoilova vd., 2009;

Kireçci, 2012). Yine yapılan çalışmalarda buğday tohumlarındaki bazı yağların kanserli hücrelerdeki apoptotik etkileri araştırılmıştır (Ergül M. vd., 2019). Türkiye, Dünya’ daki buğday ekim alanları düşünüldüğünde ilk 10 sıraya giriyor. Dolayısıyla üretimi yapılacak ola tür seçimi oldukça önem arz etmektedir.

Bu çalışmamızda kullanılan bazı ekmeklik buğday türlerinden (*Triticum aestivum*), 1-Müfit Bey, 2- Naci Bey, 3- Kınacı-97, 4- Ekiz ve 5-Yunus ekmeklik buğday türlerinin anti mutajenik potansiyellerinin bulunup bulunmadığını sınamak için kısa zamanlı testlerden, SOS-UMU test sistemini kullanarak *Salmonella typhimurium* NM2009 ve *Salmonella typhimurium* NM3009 bakteri suşları üzerinde test ettik. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda 1, 4 ve 5 nolu buğday türlerimizin kuvvetli antimutajenik etki gösterdiğini tespit ettik. 2 ve 3 nolu ekmeklik buğday türlerimizin orta derecede anti mutajenik aktivite gösterdiği gözlenmiştir. 1, 4, ve 5 nolu buğday türlerimizin kuvvetli antimutajenik etki göstermesinin sebebi bu buğday türlerinin içeriğinde bulunan fitokimyasal maddeler (fenolik bileşikler, karotenoidler ve E vitamini) sebebiyle doğal olarak antioksidan içermeleridir. Bu aktif bileşikler, güçlü antioksidan aktiviteleri sayesinde hayvan ve insanlarda, başta mutajenik bileşiklere karşı güçlü bir savunma bariyeri oluşturmaları olmak üzere birçok kronik rahatsızlığı önler veya ilerlemesini geciktirebilmektedir.

Bu doğrultuda, çalışmamızda anti-mutajenik aktivitesini tespit ettiğimiz ekmeklik buğday türlerinin, ülkemizde bulunan üretim alanlarında tercih edilmesi ve bu yönde daha fazla araştırma yapılarak etkilerin orta/uzun vadede gözlemlenmesi insan ve hayvan sağlığı açısından oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Murray RK, Mayes PA, Granner DDK, Rodwell VW. ed: Gülriz Menteş Harper'in Biyokimyası. İstanbul: Barış Kitabevi; 1993. Sayfa : 811-917.
- Temizkan GO. Moleküler Genetik. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları; 1996. s:281
- Barile FA. Principle of Toxicology testing. Chapter 15: New York; 2008. p:209-228.
- Anonim, <https://www.nbctarim.com/> ve <https://arastirma.tarimorman.gov.tr>
- Ceyhan E., Mercangöz A., Karakoç A., ve Bilgiç S., "İlaç Hammaddesi Olarak Sentezlenen Elektrofilik ve Nonelektrofilik Fenolik Schiff Bazlarının Umu Test Sistemi ile Genotoksik Aktivitesinin Araştırılması", Cankaya University Journal of Science and Engineering, c. 7, sayı. 2, Nis. 2010
- F. M. Anjum, Ijaz Ahmada Masood S., Butt., M.A Sheikh, Imran Pashaa, Amino acid composition of spring wheats and losses of lysine during chapati baking, Received 19 July 2003, Revised 15 April 2004, Accepted 29 April 2004, Available online 13 October 2004.
- Ş. Karadaş, Ames Testi İle Azo-Kromofor İçeren Schiff Bazlarının Mutajenik Özelliklerinin İncelenmesi, Y.L. Tezi, Sütçü imama Üniversitesi, 2018.
- Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N.C. and Bohr, V.A., 2009, Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging, Carcinogenesis, 30 (1), 2-10.
- Helleday, T., Lo, J., van Gent, D.C. and Engelward, B.P., 2007, DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment, DNA Repair (Amst)., 6 (7), 923-935.
- Beslenme ve Kanser, BA Çevik, E Pirinççi - Firat Tıp Dergisi, 2017 - firattipdergisi.com

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Gillet, L.C. and Schärer, O.D., 2006, Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair, *Chem Rev.*, 106 (2), 253–276.
- Friedberg, E.C., 2003, DNA damage and repair, *Nature*, 421 (6921), 436-440.
- Dizdaroglu, M., 2005, Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases, *Mutat. Res.*, 591 (1-2), 45–59.
- Lindahl, T. and Wood, R.D., 1999, Quality control by DNA repair, *Science*, 286 (5446), 1897–1905.
- Stojic, L., Brun, R. and Jiricny, J., 2004, Mismatch repair and DNA damage signalling, *DNA Repair (Amst.)*, 3(8-9), 1091-101.
- Iyama T, Wilson DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*. 2013;12(8):620-36.
- De Bont R, Van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004;19(3):169-85
- Ciccia, A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179-204.
- Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. 2011;94(2):166-200.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39-85.
- Sameer AS, Nissar S, Fatima K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention*. 2014;23(4):246-57

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Morita R, Nakane S, Shimada A, et al: Molecular Mechanisms of the Whole DNA Repair System: A Comparison of Bacterial and Eukaryotic Systems. *J Nucleic Acids*. 2010; 2010: 179594
- Hansen RJ, Ludeman SM, Paikoff SJ, Pegg AE, Dolan ME. Role of MGMT in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity in cells and animals. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(8):1145-54.
- Weissman L, de Souza-Pinto NC, Stevnsner T, Bohr VA. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. *Neuroscience*. 2007;145(4):1318-29
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2003;531(1-2):231-51.
- Martin SA, Lord CJ, Ashworth A. Therapeutic Targeting of the DNA Mismatch Repair Pathway. *Clin Cancer Res*. 2010;16(21):5107-13.
- Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 2008;18(1):85-98.
- Hamer, B., Bihari, N., Reifferscheid, G., Zahn, R., Muller, W., Batel, R., Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures, *Mutation Research* 466, 161–171, 2000.
- G Reifferscheid, J Heil, Y Oda, RK Zahn - *Mutation Research/Environmental*, ,A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. 1991 – Elsevier
- Y Oda, H Yamazaki, R Thier, B Ketterer, A new *Salmonella typhimurium* NM5004 strain expressing rat glutathione S-transferase 5–5: use in detection of genotoxicity of dihaloalkanes using an SOS/umu test. 1996 - academic.oup.com.