

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Ajuga vestita* VE *Ajuga xylorrhiza* BİTKİLERİNİN PETROL ETERİ,  
ASETON VE METANOL EKSTRELERİNİN BAZI BİYOLOJİK  
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Nesrin HAŞİMİ

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Aralık 2012

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Nesrin HAŞİMİ tarafından yapılan “*Ajuga vestita* ve *Ajuga xylorrhiza* Bitkilerinin Petrol Eteri, Aseton ve Metanol Ekstrelerinin Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı                      Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Birol OTLUDİL

Üye : Prof. Dr. Kemal GÜVEN

Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR

Üye : Doç. Dr. Veysel TOLAN (Danışman)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nurullah AKCAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 07/12/2012

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2012

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

( MÜHÜR )

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimini benden esirgemeyen, beni her konuda teşvik eden ve cesaretlendiren, bilgisi, hoşgörüsü ve mükemmel kişiliğiyle her konuda kendisini örnek aldığım çok değerli bilim insanı, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Veysel Tolan'a bana olan güveni ve desteği için teşekkürlerimi sunarım.

İkinci tez danışmanlığımlı kabul eden, tez çalışmamda İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Genel Kimya Laboratuvarının bütün imkanlarını kullanmamı sağlayan, sabrına, disiplinine ve bilgisine hayran olduğum, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ufuk Kolak'a teşekkür ederim.

Tezimin konusunu oluşturan iki *Ajuga* türü hakkında bilgi ve deneyimini paylaşan Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ömer Saya'ya ve bitkilerin teşhisini yapan Sayın Prof. Dr. A. Selçuk Ertekin'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım süresince iş sorumluluklarımı paylaşarak çalışmalarım daha fazla zaman ayırmamı sağlayan Batman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlileri sevgili arkadaşlarım Erdem Seven, İ. Selçuk Kuru ve Pınar Karakuş'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında yardımları ve en önemlisi dostluklarıyla hep yanımda olup bana destek olan başta Arş. Grv. Özlem Demirci Turgunbayer, Arş. Grv. Fatma Matpan Bekler, Arş. Grv. Mehmet Boğa, Arş. Grv. Pelin Köseoğlu ve Ömer Acer olmak üzere aynı laboratuvarı paylaştığım tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazım aşamasında yardımlarını ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Hakan Türkyılmaz, Arş. Grv. Berivan Can Emmez ve Arş. Grv. Dr. Selami Ercan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın her döneminde çoğu zaman kendisine zaman ayıramadığım halde sürekli olarak desteğini ve ilgisini gördüğüm, bugünümü yaşamamda sonsuz emeği olan canım anneme ve aileme candan teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak çalışmamıza vermiş olduğu maddi destekten dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (DÜBAP/10-FF-113) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK/111T581) teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR .....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
ÖZET .....	VII
ABSTRACT .....	IX
ÇİZELGE LİSTESİ .....	XI
ŞEKİL LİSTESİ .....	XIII
KISALTMA VE SİMGELER .....	XIV
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>5</b>
2.1. Botanik Bilgiler .....	5
2.1.1. Labiatae (Lamiaceae) Familyası .....	5
2.1.2. <i>Ajuga</i> Cinsi .....	6
2.1.3. <i>Ajuga vestita</i> BOISS. ....	7
2.1.4. <i>Ajuga xylorrhiza</i> KIT TAN .....	8
2.2. <i>Ajuga</i> Türlerinin Halk Arasında Kullanılışı .....	9
2.3. <i>Ajuga</i> Türleri ile Yapılan Çalışmalar .....	9
2.4. Antioksidanlar .....	11
2.4.1. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri .....	14
2.4.1.1. $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yöntemi .....	14
2.4.1.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi .....	14
2.4.1.3. ABTS Yöntemi (Katyon Radikali Giderim Aktivitesi) .....	15
2.4.1.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) .....	15
2.4.1.5. FRAP (Demir (III) İyonu İndirgeme Gücü) Yöntemi .....	16
2.4.1.6. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi .....	16

2.4.1.7. Ferrisiyanür İndirgeme Gücü Yöntemi .....	16
2.4.1.8. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi .....	17
2.4.1.9. Luminol Yöntemi (Kemilüminesans) .....	17
2.4.1.10. Diklorofloresin-Diasetat Yöntemi .....	17
2.4.1.11. ORAC (Oksijen Radikalini Absorplama Kapasitesi) Yöntemi .....	18
2.4.1.12. Siklik Voltametri Yöntemi.....	18
2.5. Alzheimer Hastalığı ve Kolinesteraz İnhibitörleri .....	18
2.6. Mutasyonlar ve Mutajenik Ajanlar .....	21
2.6.1. Mutasyonlar .....	21
2.6.1.1. Kromozom Mutasyonları.....	22
2.6.1.2. Gen Mutasyonları .....	22
2.6.2. Mutajenik Ajanlar .....	24
2.6.2.1. Kimyasal Mutajenler.....	25
2.6.2.2. Fiziksel Mutajenler .....	26
2.7. Antimutajenite ve Bazı Antimutajenik Bileşikler .....	27
2.8. Kısa Zamanlı Mutajenite – Antimutajenite Testleri.....	31
2.8.1. Sitogenetik Yöntemler .....	34
2.8.1.1. Yapısal Kromozom Bozukluğu Testi (CA: Chromosome Aberration).....	34
2.8.1.2. Kardeş Kromatit Değişimi Testi (SCE: Sister Chromatid Exchange) .....	34
2.8.1.3. Mikronükleus Testi (MN).....	35
2.8.2. Mikrobiyal Yöntemler.....	35
2.8.2.1. Maya Delesyon Testi (Yeast DEL Assay).....	36
2.8.2.2. <i>Escherichia coli</i> WP2 Test Sistemi .....	37
2.8.2.3. Ames ( <i>Salmonella</i> /Mikrozom) Test Sistemi.....	38
2.9. Ames ( <i>Salmonella</i> /Mikrozom) Test Sistemiyle Yapılmış Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmaları.....	42

<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>47</b>
3.1. Materyal .....	47
3.1.1. Bitkisel Materyal.....	47
3.1.2. Kimyasal Maddeler .....	47
3.1.3. Kullanılan Cihazlar .....	48
3.1.4. Kullanılan Bakteri Suşları.....	48
3.1.5. Besi Ortamları, Çözelti ve Tamponlar .....	49
3.1.5.1. Antimikrobiyal Aktivite Belirlemede Kullanılan Besi Ortamları .....	49
3.1.5.2. Toplam Fenolik Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	49
3.1.5.3. Toplam Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	49
3.1.5.4. Antioksidan Aktivite Belirlemede Kullanılan Çözeltiler .....	49
— $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yönteminde Kullanılan Çözelti .....	49
— DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yönteminde Kullanılan Çözelti.....	49
— ABTS Yönteminde (Katyon Radikali Giderim Aktivitesi) Kullanılan Çözelti .....	50
— CUPRAC Yönteminde (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Kullanılan Çözeltiler.....	50
— Standart Çözeltilerinin Hazırlanması .....	50
3.1.5.5. Antikolinesteraz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	51
3.1.5.6. Ames Salmonella/Mikrozom Test Sisteminde Kullanılan Bakteri Besi Ortamları ve Stok Çözeltiler .....	52
3.2. Metot.....	58
3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı.....	58
3.2.2. Ekstrelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	58
3.2.3. Ekstrelerin Toplam Fenolik Miktar Tayini .....	58
3.2.4. Ekstrelerin Toplam Flavonoit Miktar Tayini .....	59
3.2.5. Ekstrelerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlemesi.....	60

3.2.5.1. $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yöntemi.....	60
3.2.5.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi .....	61
3.2.5.3. ABTS (Katyon Radikali Giderim Aktivitesi) Yöntemi.....	61
3.2.5.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi).....	62
3.2.6. Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	62
3.2.6.1. AChE % İnhibisyon Testi.....	63
3.2.6.2. BChE % İnhibisyon Testi .....	63
3.2.7. Ames <i>Salmonella</i> /Mikrozom Mutajenite ve Antimutajenite Testleri .....	63
3.2.7.1. Test Suşlarının Üretilmesi .....	63
3.2.7.2. Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü.....	63
3.2.7.3. Test Suşlarının Saklanması.....	65
— Master Plaklarının Hazırlanması .....	65
— Dondurulmuş Örneklerin Hazırlanması .....	65
3.2.7.4. Pozitif ve Negatif Kontroller.....	66
3.2.7.5. Mutajenite Testi.....	66
3.2.7.6. Antimutajenite Testi.....	67
3.2.8. Sonuçların Değerlendirilmesi .....	67
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>69</b>
4.1. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları .....	69
4.2. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayinleri Sonuçları.....	71
4.3. Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları .....	72
4.3.1. $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yöntemi Bulguları.....	72
4.3.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Bulguları .....	73
4.3.3. ABTS Yöntemi (Katyon Radikali Giderim Aktivitesi) Bulguları .....	73
4.3.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Bulguları .....	74
4.4. Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite Bulguları .....	87

4.5. Ames <i>Salmonella</i> /Mikrozom Mutajenite ve Antimutajenite Testi Bulguları.....	88
4.5.1. Mutajenite Bulguları .....	88
4.5.2. Antimutajenite Bulguları.....	92
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>97</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>105</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>129</b>



## ÖZET

*Ajuga vestita* VE *Ajuga xylorrhiza* BİTKİLERİNİN PETROL ETERİ, ASETON VE METANOL EKSTRELERİNİN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Nesrin HAŞİMİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2012

Bu çalışmada, Diyarbakır çevresinden toplanan endemik *Ajuga vestita* BOISS. ve *Ajuga xylorrhiza* KIT TAN bitkilerine ait petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının antimikrobiyal, antioksidan, antikolinesteraz, mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri araştırılmıştır.

Ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak, patojenik dört bakteri (gram pozitif *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve gram negatif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) ve bir maya (*Candida albicans* ATCC 10231) üzerinde test edilmiştir. Her iki bitkinin aseton ekstresi *S. pyogenes* üzerinde orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ayrıca *A. xylorrhiza* aseton ekstresi *E. coli* üzerinde orta derecede, metanol ekstresi de *P. aeruginosa* üzerinde düşük derecede aktivite göstermiştir ki, bu değer pozitif kontrol olarak kullanılan vankomisin aynı mikroorganizmalar üzerindeki etkisinden daha yüksektir.

Ekstrelerin toplam fenolik miktarları pirokatekole, toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildikten sonra antioksidan aktiviteleri  $\beta$ -karoten renk açılım, DPPH serbest radikali giderim, ABTS ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak belirlendi. Ekstreler genel olarak yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Öyle ki; bazı ekstralar pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve  $\alpha$ -tokoferolden daha yüksek aktivite göstermiştir.

Antikolinesteraz aktivite Ellman yöntemi kullanılarak asetilkolinesteraz (AChE) ve bütürlükolinesteraz (BChE) enzimlerine karşı belirlenmiştir. Her iki bitkinin aseton ekstraları için antikolinesteraz aktivite testi sonucunda ekstraların standart olarak kullanılan galantamine göre yüksek derecede aktif olduğu sonucuna varılmıştır. *A. vestita* petrol eteri ve *A. xylorrhiza* metanol ekstraları asetilkolinesteraz enzimine karşı galantamine çok yakın aktivite göstermiştir.

Ekstrelerin mutajenik ve antimutajenik özellikleri *Salmonella*/mikrozom kısa zamanlı test sistemi kullanılarak araştırılmıştır. Mutajenite deneyleri S9 varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda test edilen ekstrelerin uygulanan konsantrasyonlarda mutajenik etki göstermediği, buna karşın ekstrelerin bazı konsantrasyonlarının  $\text{NaN}_3$  ve Daunomycine mutajenlerine karşı %0.59 (TA98–*A. vestita* metanol ekstresi–100  $\mu\text{g}/\text{petri}$ ) ile %91.75 (TA100– *A. vestita* petrol eteri ekstresi –500  $\mu\text{g}/\text{petri}$ ) oranları arasında antimutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bu tez çalışması ile *A. vestita* ve *A. xylorrhiza* söz konusu biyolojik aktiviteler açısından ilk kez araştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Ajuga vestita*, *Ajuga xylorrhiza*, Antimikrobiyal Aktivite, Antioksidan Aktivite, Antikolinesteraz Aktivite, Mutajenite, Antimutajenite, *Salmonella*/Mikrozom Testi

## ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF  
PETROLEUM ETHER, ACETONE AND METHANOL EXTRACTS OF *Ajuga vestita*  
AND *Ajuga xylorrhiza*

PhD THESIS

Nesrin HAŞİMİ

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE  
UNIVERSITY DICLE

2012

In the present study, the antimicrobial, antioxidant, anticholinesterase, mutagenic and antimutagenic properties of petroleum ether, acetone and methanol extracts from endemic *Ajuga vestita* BOISS. and *Ajuga xylorrhiza* KIT TAN collected from around Diyarbakır were investigated.

The antimicrobial activities of extracts have been tested on pathogenic four bacteria (gram positive *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and gram negative *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) and a yeast (*Candida albicans* ATCC 10231) by using disc diffusion method. Acetone extracts of both plants have been showed moderate antimicrobial activity on *S. Pyogenes*. Also *A. xylorrhiza* acetone extract has been showed low antimicrobial activity on *E. coli* and methanol extract has been showed moderate antimicrobial activity on *P. aeruginosa* which is higher than activity of vancomycin used as positive control on the same microorganisms.

Total phenolic and total flavonoid contents of these extracts were determined as pyrocatechol and quercetin equivalents, respectively and their antioxidant activity was carried out by using four different methods; namely,  $\beta$ -carotene bleaching method, DPPH free radical scavenging activity, ABTS and CUPRAC assays. Extracts have been showed high antioxidant activity in general. That is, some extracts have been showed higher antioxidant activity than BHT and  $\alpha$ -tocopherol used as positive controls.

Anticholinesterase activity has been carried out by Ellman method against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes. It was considered that acetone extracts of two plants are highly active compared to the standard of galanthamine. *A. vestita* petroleum ether and *A. xylorrhiza* methanol extracts have been showed much closed activity to galantamine against AChE enzyme.

Extracts were examined in terms of mutagenic and antimutagenic activities by the *Salmonella* / microsome mutagenicity test. Mutagenic experiments were performed in the presence and absence of S9 on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains.

The results showed that all extracts which tested did not have any mutagenic effect at all concentrations. Moreover, several concentrations of the extracts showed antimutagenic activity against both NaN<sub>3</sub> and Daunomycine mutagens. The antimutagenic activities ranged from 0.59% (TA98– *A. vestita* methanol extract–100 µg/plate) to 91.75% (TA100– *A. vestita* petroleum ether extract–500 µg/plate).

In this thesis, *A. vestita* and *A. xylorrhiza* have been investigated for the first time in terms of such biological activity.

**Key Words:** *Ajuga vestita*, *Ajuga xylorrhiza*, Antimicrobial Activity, Antioxidant Activity, Anticholinesterase Activity, Mutagenicity, Antimutagenicity *Salmonella* / Microsome Test

## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen ve azot türleri	12
Çizelge 2.2. Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri	33
Çizelge 2.3. <i>S. typhimurium</i> mutant suşlarının genetik özellikleri	41
Çizelge 4.1. <i>A. vestita</i> bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi ortalama değerleri <sup>a</sup>	69
Çizelge 4.2. <i>A. xylorrhiza</i> bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi ortalama değerleri <sup>a</sup>	70
Çizelge 4.3. Antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkisine ilişkin ortalama değerleri <sup>a</sup>	71
Çizelge 4.4. Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları <sup>a</sup>	72
Çizelge 4.5. Ekstre ve pozitif kontrollerin $\beta$ -karoten renk açılım yöntemiyle belirlenen inhibisyon yüzdesi değerleri <sup>a</sup>	75
Çizelge 4.6. Ekstre ve pozitif kontrollerin DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi yöntemiyle belirlenen inhibisyon yüzdesi değerleri <sup>a</sup>	78
Çizelge 4.7. Ekstre ve pozitif kontrollerin ABTS yöntemiyle belirlenen inhibisyon yüzdesi değerleri <sup>a</sup>	81
Çizelge 4.8. Ekstre ve pozitif kontrollerin CUPRAC yöntemiyle belirlenen absorban değerleri <sup>a</sup>	84
Çizelge 4.9. Ekstrelerin AChE ve BChE % inhibisyon değerleri <sup>a</sup>	88
Çizelge 4.10. AVP'nin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	89
Çizelge 4.11. AVA'nın <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	89
Çizelge 4.12. AVM'nin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	90

<b>Çizelge 4.13.</b> AXP'nin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	90
<b>Çizelge 4.14.</b> AXA'nın <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	91
<b>Çizelge 4.15.</b> AXM'nin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	91
<b>Çizelge 4.16.</b> AVP'nin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	93
<b>Çizelge 4.17.</b> AVA'nın <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	93
<b>Çizelge 4.18.</b> AVM'nin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	94
<b>Çizelge 4.19.</b> AXP'nin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	95
<b>Çizelge 4.20.</b> AXA'nın <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	95
<b>Çizelge 4.21.</b> AXM'nin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları <sup>a</sup>	96

## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Ajuga vestita</i> BOISS: (Hilar Mağaraları civarı Ergani-Diyarbakır)	8
Şekil 2.2. <i>Ajuga xylorrhiza</i> KIT TAN (Çermik-Çüngüş yolu/ Diyarbakır)	8
Şekil 2.3. DPPH molekülünün antioksidan madde ile reaksiyonu	15
Şekil 3.1. Pirokatekol ölçü grafiği	59
Şekil 3.2. Kersetin ölçü grafiği	60
Şekil 4.1. <i>A. vestita</i> ekstrelerinin $\beta$ -karoten renk açılım yöntemi ile antioksidan aktiviteleri	76
Şekil 4.2. <i>A. xylorrhiza</i> ekstrelerinin $\beta$ -karoten renk açılım yöntemi ile antioksidan aktiviteleri	77
Şekil 4.3. <i>A. vestita</i> ekstrelerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktiviteleri	79
Şekil 4.4. <i>A. xylorrhiza</i> ekstrelerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktiviteleri	80
Şekil 4.5. <i>A. vestita</i> ekstrelerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktiviteleri	82
Şekil 4.6. <i>A. xylorrhiza</i> ekstrelerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktiviteleri	83
Şekil 4.7. <i>A. vestita</i> ekstrelerinin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktiviteleri	85
Şekil 4.8. <i>A. xylorrhiza</i> ekstrelerinin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktiviteleri	86
Şekil 4.9. Ekstrelerin AChE ve BChE % inhibisyonu	87

## KISALTMA VE SİMGELER

2AF	: 2-aminofloren
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
AChE	: Asetilkolinesteraz
AcI	: Asetil tiyokolin iyodür
AVA	: <i>Ajuga vestita</i> aseton ekstresi
AVM	: <i>Ajuga vestita</i> metanol ekstresi
AVP	: <i>Ajuga vestita</i> petrol eteri ekstresi
AXA	: <i>Ajuga xylorrhiza</i> aseton ekstresi
AXM	: <i>Ajuga xylorrhiza</i> metanol ekstresi
AXP	: <i>Ajuga xylorrhiza</i> petrol eteri ekstresi
BChE	: Bütirilkolinesteraz
BcI	: Butiril tiyokolin iyodür
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: 2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNTB	: 5,5-ditiyobis(2-nitro benzoik asit)
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
MGA	: Minimal glukoz agar
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
S9	: Memeli karaciğer özütü
$\alpha$ -TOC	: $\alpha$ -tokoferol
(+) Cat.	: Kateşin



$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
Kob	: Koloni oluşturan birim
M	: Molar
ml	: Mililitre
N	: Normal
nm	: Nanometre
ppm	: Milyonda bir birim

## 1. GİRİŞ

Yaşam için gerekli olan oksijen aynı zamanda toksik etkiye de sahiptir. Bu toksisite oksijenin oluşturduğu reaktif oksijen türlerinden kaynaklanmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin çeşitli hastalıkların gelişmesinde önemli rolü olduğunu ortaya koyan pek çok çalışma vardır. Reaktif oksijen türleri lipit, karbonhidrat, protein ve DNA'nın hasarına yol açar. DNA'nın hasarı da kanser riskini arttırmaktadır. Reaktif oksijen türleri özellikle kanserin ilerleme aşamasında rol oynar (Hsu ve ark. 2005, Öztürk 2008). Oksidasyonun, kanser ve bağışıklık sisteminin zayıflaması ve hatta yaşlanma ile ilgili pek çok hastalıkta (Alzheimer vb. hafıza kaybı ve bunama ile birlikte seyreden) önemli bir rol oynadığı bilinen bir gerçektir.

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini azaltırlar veya ortadan kaldırırlar. Canlılarda, reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği zararları ortadan kaldırmak için çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Bu mekanizmaların savunmada yetersiz kalması sonucunda ortaya çıkabilecek hastalıklardan korunmak için antioksidan etkiye sahip meyve, sebze ve şifalı bitkilerin tüketilmesinin insan sağlığı açısından faydalı olduğunu gösteren çok sayıda araştırma vardır (Hsu ve ark. 2005, Salvatore ve ark. 2005, Öztürk 2008).

İşlenmiş gıdaların bozunmasını önlediği ve raf ömrünü uzattığı için sentetik antioksidanlar gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturdukları yan ürünlerin başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara neden oldukları belirlenmiştir (Ito ve ark. 1983, Pokorny 1991, Öztürk 2008). İşlenmiş gıdalarda koruyucu olarak kullanılmak üzere doğal kaynaklı antioksidanların bulunması amacı ile yapılan araştırmalar son yıllarda artış göstermiştir.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan kimyasal maddeler ve antibiyotiklerin yan etkilerinin fazla olması, özellikle tedavi amacı ile kullanılan sentetik ilaçlara karşı mikroorganizmaların direnç kazanmaları, bitkilere ve onların taşıdıkları etkili ve faydalı maddelere karşı ilgiyi daha da artırmaktadır (Nakipoğlu ve Otan 1992, Dağcı ve ark. 2002, Akın 2010).

Besin zincirinde birincil üreticiler olarak görev yapan bitkiler, yeryüzünde mevcut olan birçok doğal bileşiğin en temel kaynaklarıdır. Bitkilerin sonsuz çeşitlilikteki genetik varyasyonları ile yaşam ortamlarındaki birçok çevresel etmene

bağlı olarak varlığı kalitatif ve kantitatif değişim gösteren bu kimyasal bileşenler; gıda, tıp, eczacılık, biyolojik mücadele, kozmetik, boya endüstrisi gibi pek çok alanda geniş kullanım alanına sahiptir (Hoareau ve DaSilva 1999, Barış 2004; Abbasi ve ark. 2009, Davis ve Perez 2009, Karadayı 2010).

Bitkisel metabolitlerin kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın ortaya çıkışını önlemede etkili olabileceğini gösteren *in vitro* ve *in vivo* deneysel araştırmalardan ve epidemiyolojiden elde edilen kanıtlar; bu bitkiler ve metabolitleri üzerine yapılan çalışmaların büyük ölçüde artmasını sağlamıştır (Abdullaev ve ark. 2003, Karadayı 2010).

Biyolojik olarak aktif olan fitokimyasalların büyük çoğunluğu gıda olarak kullanılan çeşitli bitkilerden izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Lampe 1999, Karadayı 2010). Bitkisel gıdalar yönünden zengin olan diyetler, yapılarında bulunan pozitif etkiye sahip fitokimyasallar ve çeşitli bitkisel maddeler ile bireylerin sağlık durumlarının korunmasına yardımcı olur. Bu bağlamda geniş ölçüde meyve, sebze ve baharatları kapsayan doğal besinlere; kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığa karşı olan koruyucu etkilerinden dolayı hem halk hem de bilimsel çevre tarafından büyük ilgi gösterilmektedir (Shukla ve Singh 2007, Karadayı 2010).

Günümüzde, kanser, kalp rahatsızlıkları vs. gibi birçok önemli hastalığın mutasyonlar ile ilişkilendirilmesi; mutasyonların ortaya çıkışı ve önlenmesi üzerine yapılan çalışmaların önemli ölçüde artmasına neden olmuştur. Bu bağlamda sayısız kimyasal bileşiği sentezleme potansiyeline sahip olan bitkiler, mutajenite ve antimutajenite çalışmalarının odağını oluşturmaktadır (Loh ve ark. 2009, Karadayı 2010).

Bitkilerden ya da diğer doğal kaynaklardan elde edilen kimyasal maddelerin mutajenik ve antimutajenik potansiyellerini belirlemek için uygulanabilecek en akıllıca yaklaşım, deney hayvanları ile yapılan *in vivo* araştırmalardır. Kimyasal maddelerin uygulanmasıyla deney sonuçlarının alınması arasındaki sürenin fazla olması nedeniyle uzun zamanlı testler olarak da adlandırılan bu uygulamalar, mutajenite ve kanser araştırmalarında bilinen en hassas ve en güvenilir test sistemleri olmalarına karşın; yüksek maliyet ve zaman gereksinimlerinden dolayı yüzlerce kimyasalın mutajenik ve kanserojenik etkinliklerinin araştırıldığı öncü testlerde kullanışlı değildir (Iarc 1980,

Karadayı 2010). Bu nedenle araştırcılar, mutajen veya kanserojen özellikteki kimyasalların bu potansiyellerinin araştırılmasında esas teşkil edebilecek birçok *in vitro* kısa zamanlı test sistemi geliştirmiştir (Mortelmans and Zeiger 2000). Uzun zamanlı test sistemlerinin aksine daha kısa sürede sonuç veren ve daha ekonomik olan bu testler; çok sayıdaki kimyasal madde ile yapılacak olan öncü testler için oldukça uygundur.

Bu çalışmada; Diyarbakır çevresinde yetişen endemik *Ajuga vestita* BOISS. ve *Ajuga xylorrhiza* KIT TAN bitkilerinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan, antikolinesteraz aktiviteleri ile mutajenik ve antimutajenik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. *A. vestita* ve *A. xylorrhiza*'nın antimikrobiyal, antioksidan, antikolinesteraz aktiviteleri ile mutajenik ve antimutajenik özelliklerinin ilk kez bu çalışmayla araştırılıyor olması çalışmanın özgün değerini arttırmaktadır.

Bununla birlikte, tez çalışmamıza paralel olarak yürütölen TÜBİTAK (proje no:111T581) tarafından desteklenen 'Diyarbakır Çevresinde Yetişen Endemik *Ajuga vestita* Ekstresinin Sekonder Metabolitlerinin ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi' konulu proje ile *Ajuga vestita* BOISS. bitkisinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstraktlarının sekonder metabolitleri kromatografik tekniklerle izole edilerek spektroskopik yöntemlerle metabolitlerin yapı tayini yapılmıştır.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Botanik Bilgiler

#### 2.1.1. Labiatae (Lamiaceae) Familyası

*Ajuga* cinsi, Labiatae familyasının bir üyesidir. Labiatae familyası, bir yıllık veya çok yıllık, otsu, çalimsı ve nadiren de odunsu olan ve birçoğu çeşitli alanlarda kullanılan faydalı bitkilerden oluşan büyük ve doğal bir familyadır. Hemen hemen tüm habitat tipleri ve tüm yüksekliklerde yetişebilen Labiatae familyası üyelerinin dünyada yayılış göstermediği çok az bölge bulunmaktadır (Watson ve Dallwitz 1978). Familya üyeleri dünyada en çok Akdeniz havzasında yayılış göstermektedir (Watson ve Dallwitz 1978, Morgaris ve ark. 1982, Davis 1988). Bu familyaya ait bitkiler genellikle açık arazi bitkileri olup sadece birkaç cins tropikal yağmur ormanlarında yayılış göstermektedir (Watson ve Dallwitz 1978). Yeryüzünde 200 kadar cinsi ve 3200 türü bulunan (Baytop 1996) Labiatae familyasının yurdumuzda ise 46 cinsi, 257 taksası endemik olmak üzere 758 taksası ve 275 türü bulunmaktadır (Başer 2006). Aynı zamanda ülkemiz Labiatae familyası için önemli bir gen merkezi durumundadır ve endemizm oranı %42'dir (Başer 1994).

Labiatae familyası üyelerinin gövdeleri genellikle 4 köşelidir. Yapraklar dekusat dizilişlidir. Çiçekler vertisillastrum durumdadır. Korolla çoğunlukla iki dudaklıdır. Stamenler 2 veya 4 tanedir. Meyva 4 nuksa yarılan bir şizokarptır (Watson ve Dallwitz 1978).

Labiatae familyasına ait bitkilerin en önemli özelliği, salgı tüyü taşımaları ve özel koku veren aromatik bileşiklere sahip olmalarıdır (Metcalf ve Chalk 1972, Başer 1994, Korosou 1997). Tıpta ve parfümeride kullanılan birçok uçucu yağ içeren bir familya olarak önem taşımaktadır. Uçucu yağ, yaprak epiderması üzerindeki salgı tüylerinde bulunur. Başlı sekiz hücreli pul şeklindeki salgı tüyleri bu familya için karakteristiktir (Baytop 1996). Labiatae üyelerinin birçoğu süs bitkisi ya da baharat olarak kullanılmak üzere kültüre alınmaktadır. Birçok cins de güzel görünümlü çiçekleri ve hoş kokuları sebebiyle yetiştirilmektedir. Bu şekilde kullanılan 60'tan fazla cins ılıman bölgelerde yetiştirilmektedir. Bunların en iyi bilinenleri *Mentha*, *Monarda*, *Nepeta*, *Origanum*, *Phlomis*, *Salvia*, *Stachys*, *Thymus* ve *Ajuga*'dır.

### 2.1.2. *Ajuga* Cinsi

*Ajuga* cinsi üyeleri tek veya çok yıllık, otsu, çiçekli bitkilerdir. Çoğunlukla Avrupa, Asya ve Afrika'da yayılış gösteren cins üyelerine Avusturalya ve Kuzey Amerika'da da rastlamak mümkündür (Coll ve Tandron 2008).

*Ajuga* türleri 5-50 cm uzunlukta olup, zıt dizilimli yapraklara sahiptir. Çiçekleri iki dudaklı, tubular, genellikle mavi, mor ve sarı renktedir.

Birçok *Ajuga* türleri bahçecilikte sınır belirtmek için kullanılırken, bazıları da ot olarak kabul edilmektedir. Çeşitli renkte çiçeklere sahip olmalarından dolayı bahçelerde süsleme amacıyla kullanılan türleri vardır (Israili ve Lyoussi 2009).

*Ajuga* L. (Labiatae = Lamiaceae) bütün dünyada 300'den fazla taksona sahip geniş bir cinstir. Türkiye'de 23 takson (12 tür, 9 alttür, 2 varyete) ile temsil edilir. Aşağıda Türkiye'de yetişen *Ajuga* türleri sıralanmıştır.

**Endemik olmayan türler***Ajuga orientalis**Ajuga genevensis**Ajuga laxmannii**Ajuga reptans**Ajuga salicifolia**Ajuga iva**Ajuga chamaepitys* alttür *chia* varyete *chia**Ajuga chamaepitys* alttür *chia* varyete *ciliata**Ajuga chamaepitys* alttür *laevigata**Ajuga chamaepitys* alttür *palestina**Ajuga chamaepitys* alttür *glareosa**Ajuga chamaepitys* alttür *mesogitana**Ajuga chamaepitys* alttür *cuneatifolia**Ajuga chamaepitys* alttür *cypria**Ajuga chamaepitys* alttür *mardinensis**Ajuga chamaepitys* alttür *rechingeri***Endemik türler***Ajuga vestita**Ajuga xylorrhiza**Ajuga davisiana**Ajuga relictta**Ajuga postii**Ajuga chamaepitys* alttür *euphratica**Ajuga bombycina***2.1.3. *Ajuga vestita* BOISS.**

*Ajuga vestita* BOISS. Lamiaceae familyasına ait çok yıllık otsu yapıda bir bitkidir (Şekil 2.1.). Yamaçlarda ve düşey kireçtaşı fasiyezlerinde, 900-1200 m yükseklikte yetişmektedir. Pembe veya beyaz çiçeklere sahip olan bitkinin ilk çiçeklenme dönemi 5. ay, son çiçeklenme dönemi ise 6. aydır. Türkiye'ye endemik olan bitki Doğu Anadolu Bölgesi'nde Diyarbakır ve Mardin'de yayılış göstermektedir.





Şekil 2.1. *Ajuga vestita* BOISS. (Hilar Mağaraları civarı Ergani-Diyarbakır)

### 2.1.4. *Ajuga xylorrhiza* KIT TAN

*Ajuga xylorrhiza* KIT TAN Lamiaceae familyasına ait çok yıllık otsu yapıda bir bitkidir (Şekil 2.2.). Dikey kaya çatlaklarında 900 m yükseklikte yetişmektedir. Beyaz çiçeklere sahip olan bitkinin ilk ve son çiçeklenme dönemi 6. aydır. Türkiye'ye endemik olan bitki Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Diyarbakır'da yayılış göstermektedir.



Şekil 2.2. *Ajuga xylorrhiza* KIT TAN (Çermik-Çüngüş yolu/ Diyarbakır)

## 2.2. *Ajuga* Türlerinin Halk Arasında Kullanılışı

Etnofarmakolojik çalışmalar 20 *Ajuga* türünün özellikle Afrika, Asya ve Çin’de hastalıkların geleneksel tedavisinde kullanıldığını ortaya çıkarmıştır. Bu türlerin farmakolojik ve terapötik değerlerinin ortaya konması 1948 yılına dayanmaktadır (Newman 1948).

Doğu Afrika’da *Ajuga* türleri ateş, diş ağrısı, dizanteri ve yüksek tansiyona karşı ilaç olarak kullanılmaktadır. Kuzey Afrika’da diyabet ve hipertansiyon tedavisinde, özellikle gastrointestinal bozukluklarda ve antihelmintik olarak kullanılmaktadır (Baytop 1984). Ayrıca geleneksel Çin kodekslerinde *Ajuga* türlerinin diüretik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Aliotta ve Pollio 1994).

*Ajuga chamaepitys* orta çağdan beri idrar attırıcı, kuvvet verici, terletici, adet söktürücü, yara tedavi edici ve zehirli hayvan (yılan, krep) sokmalarına karşı panzehir olarak büyük üne sahip bulunmaktadır. Halen halk arasında, lapa halinde, haricen yara iyi edici olarak kullanılmaktadır. *Ajuga reptans*’ın çiçekli dalları kabızlık giderici, ateş düşürücü, kuvvet verici ve idrar arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop 1984).

## 2.3. *Ajuga* Türleri ile Yapılan Çalışmalar

Yapılan kimyasal çalışmalar *Ajuga* türlerinin fitoekdisteroit, neo-klerodan, diterpen, triterpen, anthosianidin-glikozit, iridoid glikozit, vithanolit, flavonoit ve trigliserit yapıda bileşikler içerdiğini ortaya koymuştur (Israili ve Lyoussi 2009).

Kök dil ve arkadaşları (2002), *Ajuga relictta* ekstrelerinden dört steroid ((24S)-24-ethylcholesta-5,25-diene-11 $\alpha$ -hydroxy-1-one (1), (24S)-24-ethylcholesta-5,25-diene-7 $\alpha$ -hydroxy-3-one (2), (24 S)-24-ethylcholesta-5,25-dien-3  $\beta$ -ol (3)  $\beta$ -sitosterol (4)), bir monoterpen (loliolide (5)), bir iridoid glikozit (reptoside (6)) iki diterpen (11,15-trimethyl-3-methylene-hexadecan-1,2-diol (7), microstegiol(8)), iki triterpen (oleanolic acid (9), oleanolic acid 3  $\beta$ -acetate (10)) yapıda olmak üzere on madde izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Gören ve arkadaşları (2005), *Ajuga postii* ekstrelerinden bir iridoid glikozit (reptoside), iki triterpen (ursolik asit ve  $\alpha$ - amyrin) ve iki steroid yapıda ( $\beta$ -sitosterol ve (24S)-24-ethylcholesta-5,25-dien-3 $\beta$ -ol) madde izole etmişlerdir. Ardından bitki ekstreleri ve izolen edilen maddelerin DNA hasarı oluşturabilme aktivitesi araştırılmış

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

ve reptoside'in DNA hasarına yol açtığı fakat sitotoksik etkiye sahip olmadığı, diğer madde ve ekstrelerin ise aktivite göstermediğini bildirmişlerdir.

Türkoğlu ve arkadaşları (2010), çalışmalarında *Ajuga chamaeptyts* bitkisinin metanol, su ve kloroform ekstrelerini antimikrobiyal ve antioksidan aktivite açısından araştırmışlardır. Antioksidan aktivite ABTS, DPPH, metal şelat, yöntemleri ile süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit süpürme etkileriyle belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite ise disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Araştırmacılar antioksidan aktivite açısından su ekstresinin diğer ekstrelerden daha aktif olduğunu, ekstrelerin gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini gram negatif bakteriler üzerinde ise antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadıklarını bildirmişlerdir.

Chandel ve Bagai (2011), *Ajuga bracteosa* etanol ekstresini antiplazmodiyal aktivite açısından araştırmış ve oldukça yüksek antiplazmodiyal aktivite (IC<sub>50</sub>: 10µg/ml) elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Delazar ve arkadaşları (2012) bir çalışmada, *Ajuga chamaeptyts* metanol ekstresinden 5 madde izole ederek ekstre ve izole edilen maddelerin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışılan ekstrelerden en yüksek aktiviteyi metanol ekstresinin gösterdiğini bildirmişlerdir.

Mamadelieva ve arkadaşları (2013), *Ajuga turkestanica* bitkisinin metanol, kloroform, bütanol ve su ekstrelerini antioksidan, sitotoksik ve antimikrobiyal açıdan araştırmışlardır. Su ve bütanol ekstrelerinin en iyi antioksidan aktivite gösterdiğini, kloroform ekstresinin ise HeLa, HepG-2 ve MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve aynı zamanda antimikrobiyal aktivite açısından da aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Antibakteriyal, antifungal, antiinflamatuvar (Marc ve ark. 2008), antimalaryal/antiplazmodiyal (Kuria ve ark. 2002), antimikobakteriyal (Cantrell ve ark. 1999), antioksidan (Chenni 2007), antitümör (Wessner ve ark. 1992) aktiviteleri, larva ve böcek antifidantı ile böcek büyüme inhibitörü (Camps ve Coll 1993) *Ajuga* türlerinin rapor edilen diğer aktiviteleridir.

## 2.4. Antioksidanlar

Oksijen canlılar için hayati derecede önem arz eden bir elementtir. Oksijen, havadan solunum ile alındıktan sonra mitokondrilerdeki elektron taşıma sisteminde aşamalı bir indirgenme işlemine girer ve suya metabolize olur (Cadenas ve Davies 2000). Ancak bazı durumlarda oksijenin reaksiyonunu tamamlamadan vücuttan ayrıldığı ve geride reaktif ara ürünler bıraktığı gözlemlenmektedir. Bu reaktif ara ürünler genel olarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak isimlendirilir (Gülçin ve ark. 2003).

Oldukça reaktif olan bu oksijen türleri vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipit, protein, karbonhidrat ve nükleik asitleri oksidasyona uğratabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilirler. Bu yaygın olarak “Oksidatif Stres” şeklinde de ifade edilmektedir. Oksidatif strese neden olan başlıca reaktifler ise reaktif oksijen ve azot türleridir (Çizelge 2.1.) (Papas 1996).

Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda çeşitli şekillerde meydana gelirler:

- Hücrenin normal solunumu sırasında yan ürün olarak reaktif oksijen ve azot türleri oluşur.
- Süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, bazı biyomoleküllerin (adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, sitokrom P450 ve elektron transport zincirlerinin bazı bileşikleri) oksijen tarafından doğrudan oksidasyonu ile artabilir (Fridovich 1986, Halliwell 1994).
- Vücudumuz, doğal ve insan kaynaklı radyasyona maruz kalabilir. Yüksek enerjili elektromagnetik ışın, suyu parçalayabilir ve hidroksi radikali oluşturur (Von-Sonntag 1987).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Çizelge 2.1. Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen ve azot türleri

Reaktif Türler	Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
<b>Reaktif Oksijen Türleri (ROS)</b>	Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Hidrojen peroksit	$H_2O_2$
	Hidroksi	$HO^{\bullet}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
	Peroksi	$ROO^{\bullet}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
	Alkoksi	$RO^{\bullet}$	Ozon	$O_3$
	Hidroperoksi	$HOO^{\bullet}$	Singlet oksijen	$^1\Delta_g \ ^1O_2$
<b>Reaktif Azot Türleri (RNS)</b>	Nitrik oksit	$NO^{\bullet}$	Nitröz asit	$HNO_2$
	Azot dioksit	$NOO^{\bullet}$	Nitrozil katyonu	$NO^+$
			Nitroksi anyonu	$NO^-$
			Diazot tetraoksit	$N_2O_4$
			Peroksinitrit	$ONOO^-$
			Peroksinitröz asit	$ONOOH$
			Nitronyum katyonu	$NO_2^+$
Alkiperoksit nitritler	$ROONO$			

Reaktif oksijen türleri tarafından en fazla etkilenen moleküllerin, hücre membranının ana bileşeni olan lipitler olduğu düşünülmektedir. Organizmada yeterli miktarda reaktif atom ya da molekül varlığında lipit peroksidasyonu kolaylıkla başlar. Oksijenin sebep olduğu lipit oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur (Aruoma ve Cuppett 1997). Lipit peroksidasyonu, hücrenin hayati fonksiyonları için de zararlıdır (Davies 2000). Proteinler de lipitler gibi oksidatif stresten etkilenirler. Proteinlerin oksidasyonu genellikle  $OH^{\bullet}$  tarafından başlatılır ve sürecin seyri oksijen, süperoksit ya da onun protonlanmış hali olan  $HO_2^{\bullet}$  tarafından belirlenir (Berlett ve Stadtman 1997). Diğer reaktif türler de protein oksidasyonunda yer alabilirler (Dalle-Donne ve ark. 2003). Reaktif oksijen türleri amino asit rezidülerinin yan zincirlerini de oksitleyebilir. Bu şekilde istenmeyen protein-protein etkileşimleri oluşabilir ve proteini parçalayabilecek şekilde protein iskeletini oksitleyebilirler. Benzer oksidatif hasarlar

serbest geçiş metal iyonlarının varlığında da olmaktadır (Berlett ve Stadtman 1997, Stadtman 2002).

Proteinleri oluşturan amino asitlerin (özellikle prolin, arginin, lisin ve treonin) yan zincirleri oksitlendiği zaman aldehitler ve ketonlarda olduğu gibi karbonil grupları oluşur. Bu gruplar kimyasal olarak kararlıdır ve proteinlerin oksidatif parçalanmasında da oluşabilmektedirler (Dalle-Donne ve ark. 2003). Ayrıca kanser eşitleri, parkinson ve alzheimer gibi birçok hastalığın DNA'nın oksidatif hasarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Evans ve ark. 2004).

Antioksidanlar, oksidasyonu başlangıç ve/veya geleişme basamağında önleyen veya geciktiren maddelerdir. Canlılarda oksidan etkiye karşı iki çeşit savunma sistemi vardır. Bunlar endojen ve ekzojen antioksidan etkilerdir. Endojen antioksidan sistem; antioksidan enzimler, hasarlı molekülleri uzaklaştıran proteazlar ve fosfolipazlar gibi sistemler, yeni bileşikleri sentezleyen sistemler, tamir sistemleri, hemoglobin, miyoglobin, ferritin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcılar gibi alt sistemlerden oluşur. Ayrıca glutatyon ve ürik asit gibi vücut içi küçük moleköl kütleli bileşikler de birer antioksidan olarak görev yaparlar. Dış kaynaklı olarak alınan antioksidanlar vücut içi antioksidan sisteme destek olur. Dışarıdan alınan antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sentetik olarak kullanılanlar bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerbüttilhidrokinon (TBHQ), propil galat (PG), troloks ve diğer sentetik antioksidanlardır (Mavi 2005). En yaygın olarak kullanılan bu sentetik antioksidanların bazı yan etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Branen 1975, Imaida ve ark. 1983). Bunun sonucu olarak tüketiciler bunların sağlık açısından güvenilirlikleri hakkında ciddi endişeler taşımaktadır (Ito ve ark. 1983). Örneğin BHT non-toksik olmakla beraber, karaciğerde sitokrom-P450 sistemine hasar verdiğine dair bazı çalışmalar mevcuttur. Farelere yüksek dozlarda verildiğinde ise karaciğerde hasara sebep olduğu görölmüştür. Ayrıca yapılan bazı araştırmalar, BHT gibi bazı sentetik antioksidanların fazla alınması durumunda vücuttan atılmadığı adipoz dokuda depolandığını göstermiştir (Halliwell ve Gutteridge 1989).

Sentetik antioksidanlar geniş bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen, bu istenilmeyen yan etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanımları ciddi bir şekilde sınırlandırılmıştır (Gölin 2005). Birer doğal antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik

asit, BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi sentetik antioksidanlardan daha düşük aktivite göstermelerine rağmen, besin maddelerinin üretim ve muhafazasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Osawa ve Namiki 1981, Nishina ve ark. 1991).

Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında doğal bir şekilde meydana gelmektedir. Doğal antioksidanlar; karotenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, ve glutatyondur. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar singlet ve triplet oksijen süpürücü, serbest radikal giderici, peroksit parçalayıcı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak fonksiyon görürler (Larson 1988). Sebze ve meyveler de birçok antioksidan içerirler (Cao ve ark. 1996). Doğal antioksidan bileşikler; sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda bulunmaktadır (Pratt ve Hudson 1990). Bundan dolayı Ames ve arkadaşları (1993) bol miktarda sebze ve meyve tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azalttığı gibi, kanserde ve ölüm oranında düşüş meydana getirmekte olduğunu belirtmiştir. En önemli doğal antioksidanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve skualen sayılabilir.

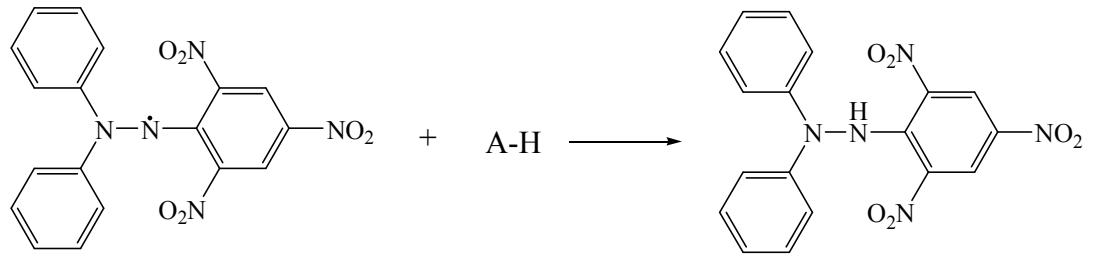
### 2.4.1. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

#### 2.4.1.1. $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yöntemi

Bu yöntemde, önceden oksijen ile doyurulmuş suya linoleik asit ve  $\beta$ -karoten koyulur. Linoleik asitten oluşan radikaller ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{OR}$ ,  $\cdot\text{OOR}$ , vs.), 490 nm dalga boyunda maksimum absorbanı veren  $\beta$ -karoteni parçalayarak renginin açılmasına neden olurlar. Antioksidanlar, oluşan radikalleri söndürerek  $\beta$ -karotenin renginin açılmasını önlerler (Miller 1971, Huang ve ark. 2005). Bu yöntem hidrofilik, hidrofobik ve emülsiyonların oksidasyonunu ölçmek için kullanılır (Miller 1971).

#### 2.4.1.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

Bu yöntem, antioksidanların serbest radikali giderme kabiliyetlerini belirleyen hızlı, pratik ve güvenilirliği yüksek olan bir yöntemdir. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kararlı yapıda bir azot radikalidir. DPPH'nin etanoldeki çözeltisi mor renklidir ve 517 nm dalga boyunda absorbanı ölçülür. DPPH çözeltisine antioksidanların ilave edilmesiyle söz konusu dalga boyundaki absorbanı düşüş meydana gelir ve çözeltinin rengi sarıya doğru kayar. DPPH ve antioksidan madde arasındaki reaksiyon Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (Blois 1958).



Şekil 2.3. DPPH molekülünün antioksidan madde ile reaksiyonu

Bu yöntemin olumsuz yönlerinden birisi 517 nm’de absorpsiyon yapan karotenoitler gibi bazı maddelerin analizinin güç olmasıdır. Bazı antioksidan maddeler, sterik engellemeden dolayı DPPH ile reaksiyona yavaş girerler veya giremezler. Bu nedenle antioksidan kapasiteyi tam anlayabilmek için bu testin yanında başka testler de yapılmalıdır.

#### 2.4.1.3. ABTS Yöntemi (Kasyon Radikali Giderim Aktivitesi)

Bu yöntemde 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS)  $K_2S_2O_8$ ,  $MnO_2$ ,  $H_2O_2$  gibi güçlü yükseltgenler ile tepkimeye sokulup  $ABTS^{+•}$  oluşturulur. Bu radikal 2 gün karanlıkta oda sıcaklığında kararlıdır. 660, 734 ve 820 nm dalga boylarında maksimum absorbans veren radikal, konjuge çifte bağlı antioksidanların aktivitesini ölçmede yararlıdır. Antioksidan ile tepkimeye sokulduğunda,  $ABTS^{+•}$ 'nin absorbansındaki düşme antioksidanın aktif olduğunu gösterir. Geliştirilen bu yöntemin en büyük avantajı hem hidrofilik hem de lipofilik sistemlerde kullanılabilmesidir (Re ve ark. 1999).

#### 2.4.1.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)

Bu yöntemde 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin) ve Cu (II) aynı ortama koyulur. Antioksidanın Cu (II)'yi indirgemesi sonucu oluşan Cu (I)'in Neokuproin ile yaptığı kompleks 450 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir (Apak ve ark. 2004). Bu yöntemde absorbansı yüksek çıkan maddeler antioksidan aktivite gösterirler.



Bu yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik sistemlere uygulanabilir, kolaydır ve pratiktir.

### 2.4.1.5. FRAP (Demir (III) İyonu İndirgeme Gücü) Yöntemi

FRAP yöntemi, demir (III)'ün indirgenmesi yoluyla antioksidanların aktivitelerinin belirlenmesine dayanır. Düşük pH'larda Fe (III), tripiridiltriiazin (TPTZ) ile reaksiyona girerek [Fe(III)-TPTZ] kompleksini oluşturur. Fe (III)'ün antioksidan tarafından indirgenmesiyle [Fe(II)-TPTZ] kompleksi meydana gelir, 593 nm dalga boyunda maksimum absorbands veren bu kompleksin rengi koyu mavidir (Benzie ve Strain 1996).

### 2.4.1.6. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

pH=8'e ayarlanmış tampon ortamında nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ile fenazinmetasülfat (PMS) arasındaki tepkime sonucu açığa çıkan süperoksit anyon radikalinin ( $O_2^{\cdot-}$ ), nitroblutetrazolyum (NBT) boyasının rengini gidermesine dayanan bir yöntemdir. Süperoksit, NBT ile reaksiyona girdiğinde önce monoformazon sonra diformazon oluşur. NBT boyası 560 nm dalga boyunda maksimum absorbands vermezken diformazon bu dalga boyunda yüksek absorbands vermektedir. Süperoksit anyon radikali enzimlerle de üretilebilmektedir. Örneğin, ksantin oksidaz varlığında oksijenle doyurulmuş suda hipoksantin, ürik asitin yanı sıra  $O_2^{\cdot-}$ 'i de üretmektedir. Antioksidanlar oluşan  $O_2^{\cdot-}$ 'i gidererek NBT boyasının 560 nm dalga boyundaki absorbandsında azalma sağlarlar. Absorbandaki düşüşün fazla olması antioksidanın  $O_2^{\cdot-}$ 'i çok iyi giderdiğini göstermektedir (Liu ve ark. 1997).

### 2.4.1.7. Ferrisiyanür İndirgeme Gücü Yöntemi

pH'ı 6.6 olan fosfat tamponuyla hazırlanmış  $K_3[Fe(CN)_6]$ , antioksidan madde ile birlikte inkübasyona tutulduktan sonra asitlendirilir. Trikloroasetik asit ile düşük pH sağlandıktan sonra Fe (III) ile muamele edilir. Oluşan Prusya mavisindeki  $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$  kompleksinin 700 nm dalga boyunda absorbandsı okunur. Bu yöntemde absorbandsı yüksek çıkan maddelerin antioksidan aktivitesi de yüksektir (Oyaizu 1986).

#### **2.4.1.8. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi**

Bu yöntemde, plazma ve diğer biyolojik sıvılarda bulunan peroksitlenebilen maddelerden ve 2,2'-azobis (2-amidopropan) dihidroklorürden (AAPH) meydana gelen peroksil radikalleri kullanılır. Plazmaya AAPH ilavesinden sonra, yükseltgenebilen maddelerin oksidasyonu, reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülmesiyle belirlenir. Plazma içerisinde bulunan antioksidan maddeler oksidasyon reaksiyonunun yavaş gerçekleşmesine neden olurlar. Reaksiyonun gecikme zamanı ölçülerek plazmadaki antioksidan kapasite hesaplanır (Wayner ve ark. 1985). Wayner ve ark. (1986) daha sonraki çalışmalarında bu yöntemi, peroksil radikalleri tarafından oksidasyon başlatılmadan önce ortama linoleik asit ilave ederek geliştirmişlerdir.

#### **2.4.1.9. Luminol Yöntemi (Kemilüminesans)**

AAPH'dan üretilen peroksil radikallerinin lüminolü yükseltgemesi sonucu ışık saçan luminol radikalleri meydana gelir. Yayılan ışık lüminometre ile ölçülür. Antioksidanlar kemilüminesans ışımalarının oluşumunu belli bir süre için engellerler. Gecikme zamanı bir örnekteki toplam antioksidan aktivitesi ile doğrudan orantılıdır (Alho ve Leinonen 1999). Lüminolü yükseltgeyen AAPH'den başka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya perborat gibi yükseltgenler de kullanılmıştır (Whitehead ve ark. 1992). Bu deneyde reaksiyonu daha çabuk gerçekleştirebilmek için horseradish peroksidaz katalizörü kullanılarak ışık yayılması hızlandırılmıştır. Ortama p-iyodofenol konulması ışığın emisyonunu daha şiddetli, uzun süreli ve kararlı hale getirmektedir.

#### **2.4.1.10. Diklorofloresin-Diasetat Yöntemi**

Bu yöntemde AAPH peroksil radikalini oluşturmak için kullanılırken 2,7-diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA) yükseltgenebilen substrat olarak kullanılmıştır. AAPH'dan oluşan peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan diklorofloresin (DCF) floresans özellik gösterir (Valkonen ve Kuusi 1997). DCF 480 nm dalga boyunda uyarılıp 526 nm dalga boyunda emisyon yapar. 504 nm dalga boyunda da absorpsiyon maksimumu gösterdiğinden hem floresans yöntemi hem de spektrofotometrik yöntem ile antioksidan aktivite tayinleri yapılabilmektedir.

### 2.4.1.11. ORAC (Oksijen Radikalini Absorplama Kapasitesi) Yöntemi

Bu yöntemde peroksil radikalini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikalini oluşturmak için Cu (II)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve yükseltgenebilen protein substratı olarak fikoeritrin kullanılmaktadır. Oluşturulan radikaller ile fikoeritrin arasındaki yükseltgenme reaksiyonu sonucunda, fikoeritrin floresansındaki zamana bağlı düşüş ölçülerek toplam antioksidan aktivite hesaplanmaktadır (Cao ve ark. 1993, Cao ve Prior 1999). Serbest radikal etkisini inceleyen ve miktar tayininde eğri altında kalan alan tekniği kullanılan bu yöntemde serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesi hem de inhibe etme süresi belirlenebilir.

### 2.4.1.12. Siklik Voltametri Yöntemi

Biyolojik sıvılarda veya doku homojenatlarındaki düşük molekül ağırlıklı antioksidanların toplam indirgeme güçlerini ölçen bir yöntemdir. Örnek hazırlandıktan sonra camsı karbon bir çalışma elektrot, Ag/AgCl'den oluşan referans elektrot ve platin telden oluşan yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrotlu bir sistem içine yerleştirilir. Çalışma elektroduna sabit bir hızla (100 mV/dk) pozitif ve negatif potansiyeller uygulanmaktadır. Bu işlem sırasında potansiyel akım eğrisi (voltamogram) elde edilir. Örneğin indirgeme gücü, pik potansiyeli olan [Ep(a)] ve anodik akım olan (AC) ye bağlıdır. Ep(a) akımın yarı artışında ölçülür ve yarı dalga potansiyeli (E1/2) olarak ifade edilir. Yarı dalga potansiyelinin düşük olması durumunda, analizlenen bileşiklerin çalışma elektroduna elektron verme yeteneği daha yüksektir. Ancak bazı antioksidanların camsı karbon elektroduna elektronları yeteri kadar verememeleri durumunda başka tip elektrotlarla çalışılması uygun olabilir. Örneğin, tiyol yapısındaki glutasyon, camsı karbon elektrodu ile tayin edilemediğinden bu elektrodun yerine Au/Hg elektrodunun kullanılması daha uygun olur (Kohen ve ark. 1999).

## 2.5. Alzheimer Hastalığı ve Kolinesteraz İnhibitörleri

Alzheimer hastalığı ilk kez 1906'da Alman nöropsikiyatrist Alois Alzheimer tarafından düşünce kontrolü, hafıza ve konuşma yetisi gibi bazı fonksiyonların yer aldığı beyin bölümünde, karmaşık mesajları milyonlarca sinir hücresi arasında taşıyan kimyasalların (nörotransmitter) düzeyinin azalması ve sinir hücrelerinin yok olması ile,

normal düşünme ve hafıza yetilerinin kaybolduğu bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Alzheimer 1906).

Alzheimerlı hastalarda beyin neokorteks ve hipokampus gibi yüksek mental fonksiyonlarından sorumlu bölgelerinde beyin hücreleri üzerinde patolojik bir protein birikimi görülür. Bu protein birikimi  $\beta$ -amiloit plaklardır (Mann 1989). Amiloitler beyin hücreleri arasındaki haberleşmeyi önler ve beyin hücrelerinin yavaş yavaş ölmesine neden olurlar (Daniel ve ark. 2002).

Alzheimer hastalarında beta amiloit (A-beta) üretimi sağlıklı bir birey ile aynı olmakla birlikte, beta amiloitlerin dışarı atılmasında sorun yaşanmaktadır. Normal olarak beta amiloitler hücrenin dışına çıktığı zaman erir, ancak bazen erimesi mümkün olmayan ve adına “fibril” denilen birikintiler oluştururlar. Bu fibriller birbirine yapışarak plakalar haline gelir. Her insan yaşlandıkça plaka üretir. Gerçek sorun, bu plakaların iltihaplanma ile sonuçlanan reaksiyonları tetiklemesidir. (Lanari ve ark. 2006).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stresin hücre tahribatıyla sonuçlanan biyomoleküllerin oksitlenmesine neden olduğu bilinmektedir (Piazzini ve ark. 2008). Toksik beta amiloitlerin yavaş yavaş birikimi, sürekli oksidatif stres ve benzeri olaylarla birleştiğinde nöronlarda yapısal bozukluğa neden olmaktadır. Bu süreç; fonksiyonel aksaklıklara, kavramsal ve davranışsal bozukluklara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Beyindeki beta amiloit birikimini hızlandıran patofizyolojik durumlar Alzheimer riskini arttırmaktadır (Hartman 2010).

Sonuç olarak; oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk adımlarından biri olup, hastalıkta patojenik bir rol oynama durumuna sahiptir (Piazzini ve ark. 2008).

Beyinde nöronlar arasında veya bir nöron ile başka bir (tür) hücre arasında iletişimi sağlayan kimyasallara nörotransmitter denir. Sinir sistemi boyunca sinirsel sinyaller bu kimyasal taşıyıcılar yardımıyla iletilir. Temel olarak iki nörotransmitter madde bulunur:

1. Asetilkolin nörotransmitter: Dokulardaki bilgiyi veya başka sinirlerdeki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini yaptıktan sonra asetilkolinesteraz isimli enzim tarafından parçalanır. Bir sonraki bilgi aktarımı için yeniden asetilkolin üretmek gerekir. Asetilkolin, Alzheimer hastalarında yeterince üretilmemektedir. Asetilkolini parçalayan

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonu ile Alzheimer hastalığının ilerlemeyeceği düşünülmektedir (Liston ve ark. 2004).

2. Glutamat: Sinir hücrelerinde % 70 oranında bulunur. Görevi; öğrenme ve hafızadır. Alzheimer hastalarında glutamat çok aşırı şekilde salgılanır ve bu durum sinir hücrelerinin tahrip olmasına sebep olur. Glutamat salgılaması durdurulması ile sinir hücrelerinin ölümünün yavaşlayacağı ve Alzheimer hastasının sağlık durumunun kötüleşmeyeceği düşünülmektedir (Liston ve ark. 2004).

Alzheimer hastalığında kullanılan iki önemli tedavi seçeneği kolinesteraz inhibitörle ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleridir.

➤ Kolinesteraz inhibitörleri bellek ve düşünce ile ilgili bir nörotransmitter olan asetilkolinin parçalanmasını önlemektedir (John ve Standridge 2004).

➤ N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri ise öğrenme ve bellek fonksiyonları açısından önem taşıyan bir transmitter olan glutamı düzenleyici etkiye sahiptir (John ve Standridge 2004). Halen Alzheimer hastalığı tedavisinde US Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmış tek NMDA orta ve ciddi Alzheimer tedavisinde kullanılan memantindir (Zhao ve ark. 2006).

Vücutta asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) olmak üzere iki kolinesteraz enzimi bulunmaktadır (Hartman 2010). Normal erişkin beyinde AChE yaygın olarak bulunurken, BChE sınırlı miktarlarda bulunmaktadır (Demans 2002). Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunurken, butirilkolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferik sinir sistemi, karaciğer ve plazmada bulunmaktadır (Hartman 2010). Kolinerjik nöronlarda AChE, hücre gövdesinde, aksonlarda ve dentritik uzantıların proksimalinde yer alır. BChE ise hücre gövdesinde ve dendritlerde bulunur. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE, geriye kalan %20'sinden BChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir. AChE'nin kolinerjik iletimdeki rolü oldukça iyi bilinmekle birlikte BChE'nin rolü yeterince anlaşılmış değildir. Sinir sistemi gelişiminin erken dönemlerinde BChE düzeyleri yüksektir, ilerleyen evrelerde ise bu düzey düşmektedir. Normal beyinde sinaptik asetilkolin hidrolizinin esas olarak AChE tarafından yapıldığı, BChE'nin buna çok az katkısının olduğu kabul edilmektedir (Ercan 2002).

Günümüzde Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde donepezil (Kelly ve ark. 1997), galantamine (Scott ve Goa 2000), ve rivastigmine (Gottwald ve Rozanski 1999, Mukherjee ve ark. 2007) kullanılmaktadır.

AChE inhibitörleri ile ilgili çalışmaların çoğu, galantamin gibi asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesine sahip alkaloidler üzerine yoğunlaşmıştır. Bugüne kadar 35'ten fazla alkaloidin AChE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu aktiviteye sahip olduğu belirlenen diğer bileşenler ise terpenoidler, glikozidler ve kumarinler olarak bildirilmiştir (Mukherjee ve ark. 2007).

*Acanthaceae, Apocynaceae, Amaryllidaceae, Angelicae, Araceae, Asclepiadaceae, Berberidaceae, Buxaceae, Combretaceae, Compositae, Coniferae, Cyperaceae, Ebenaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fumariaceae, Gentianaceae, Guttiferae, Lamiaceae, Leguminosae, Lilliaceae, Lycopodiaceae, Malvaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Molluginaceae, Moraceae, Musaceae, Nelumbonaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Sapotaceae, Solanaceae ve Tamaricaceae*, AChE inhibisyon potansiyeline sahip bitkilerin yer aldığı familyalar olarak bildirilmiştir (Mukherjee ve ark. 2007).

Fakat bunların içinde özellikle alkaloid taşıyan familyalar Lycopodiaceae ve Solanaceae'dir. Bitkisel kaynaklardan potansiyel AChE inhibitörlerinin tanımlanmasına yönelik etnofarmakolojik yaklaşımlar ve biyoanalizler gün geçtikçe artmaktadır. AChE ve BChE inhibitörlerinin aktivitelerinin belirlenmesine yönelik pek çok yöntem, Ellman tarafından 1961'de tanımlanan Ellman reaksiyonlarına dayanmaktadır (Ellman ve ark. 1961, Mukherjee ve ark. 2007).

## **2.6. Mutasyonlar ve Mutajenik Ajanlar**

### **2.6.1. Mutasyonlar**

Mutasyon en genel anlamıyla genetik materyalde meydana gelen değişimler olarak tanımlanabilir. Bu terim ilk defa 1905 yılında, Hugo de Vries tarafından *Oenothera lamarckiana* fenotiplerinde meydana gelen değişimleri tanımlamak için kullanılmıştır (Korkmaz 2005, Stoltzfus 2006, Barış 2007, Klug ve ark. 2009). Mutasyonların ele alınması sırasında; nasıl ortaya çıktıkları, genomlar ve organizmalar üzerindeki etkileri, oranlarının deneysel olarak artırılması ve programlanmış mutasyon

olasılığı gibi konular da detaylı olarak incelenmelidir. Bu noktada, araştırma sırasında sınıflandırma kolaylığı sağlamak için mutasyonlar; (a) kromozomların sayı veya yapılarındaki değişiklikler ile (b) sitolojik olarak kromozom düzeyinde gözlenemeyen ancak bireyin fenotipinde ortaya çıkan farklılıklarla saptanabilen gen mutasyonları olarak iki gruba ayrılabilir (Oraler 1990).

### 2.6.1.1. Kromozom Mutasyonları

Gen mutasyonlarına oranla daha geniş ölçekli genetik materyal hasarlarını ortaya çıkaran kromozom mutasyonları; (I) kromozom sayısı ve (II) kromozom yapısı mutasyonları olmak üzere iki alt grupta sınıflandırılmaktadır (Kadıoğlu 2008, Klug ve ark. 2009).

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

### 2.6.1.2. Gen Mutasyonları

Bir genin nükleotid sekansındaki herhangi bir değişim olup bir lokusunda normal baz yerine, yeni bir baz çiftinin yanlışlıkla girmesi sonucu meydana gelen bir olgudur. İncelemede kolaylık sağlanması amacıyla gen mutasyonlarını ileri, geri ve baskılayıcı mutasyonlar şeklinde üç temel gruba ayırılır;

**İleri mutasyonlar:** Bir genin birçok allelik formunun mutasyon sonucu meydana gelmesi nedeniyle, esas gen yani yabanıl tip allel, standart (referans) alleli temsil eder. Referans olarak esas genin yani yabanıl tip allelin kullanıldığı bir durumda; bu standarttan herhangi bir şekilde uzaklaşan herhangi bir değişim (örneğin,  $thr^{+}$ 'nin  $thr^{-}$ 'ye dönüşümü) ileri mutasyon olarak tanımlanır (Klug ve ark. 2009).

### a) DNA seviyesinde mutasyonlar

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

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

### b) Protein seviyesinde mutasyonlar

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

**ii) Anlamsız mutasyon (nonsense mutasyon):** Bu mutasyon tipinde anlamlı bir kodon stop kodonuna dönüşür ve protein oluşumu daha tamamlanmadan sentezi durdurulur. Bu şekilde sonlandırılan protein fonksiyonel değildir. GAG→UAG değişimi, yani Glutamini sentezleyen kodonun stop kodonuna dönüşümü buna örnek verilebilir (Bahçeci 2007)

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

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

**Geri mutasyonlar:** Referans olarak esas genin yani yabanıl tip allelin kullanıldığı bir durumda; bu standarttan herhangi bir şekilde uzaklaşan herhangi bir değişim (örneğin, thr<sup>+</sup>'nin thr<sup>-</sup>'ye dönüşümü) ileri mutasyon olarak tanımlandığı daha önce belirtilmişti. İleri mutasyona uğramış herhangi bir allelin yeniden standart yani yabanıl tipe dönüşmesi (örneğin, thr<sup>-</sup>'nin thr<sup>+</sup>'ye dönüşümü) geri mutasyon olarak adlandırılır.



**Baskılayıcı Mutasyonlar:** Bir mutasyonun neden olduğu değişiklik sonucu, organizmada bulunan mutant allelin yabancı allele baskın gelerek, mutant allelin fenotipte kendini göstermesine baskılayıcı mutasyon (örneğin: poky mitokondrilerinin yabancı tip mitokondrileri engellemesi) denir. Baskılayıcı mutasyonu açıklamak için iki ana hipotez öne sürülmüştür. Bunlardan birine göre, poky mitokondri diye adlandırılan mutant ya da delesyonu olan mitokondri DNA'sı daha hızlı replike olur ve mutant mitokondri sayıca üstün hale gelerek fenotipte baskın olarak görülür. İkinci hipoteze göre, mutant ve yabancı tip mitokondri DNA'sı arasında rekombinasyon olur ve sonuçta normal mitokondri DNA'sında hata oluşumu ya da yapısının bozulması gerçekleşir. Bazen de, bir gende mutasyon meydana geldiğinde ikinci bir gendeki farklı bir mutasyon ilk mutasyonun baskılanmasına neden olur. Bu durumda, ilk mutasyonun etkisini baskılayan ikinci mutasyona da baskılayıcı mutasyon denir (Klug ve ark. 2009).

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

**ii) Gen dışı supresyon:** DNA molekülünde mutasyona uğramış genden başka bir gende meydana gelen mutasyonun ilk mutasyonun etkisini ortadan kaldırması şeklinde tanımlanır. Örneğin; tirocini kodlayan UAC kodonu bir mutasyon sonucu anlamsız kodon UAG'ye dönüşebilir. Tirocine özgü tRNA moleküllerinin birinin antikodonunun (AUG) ikinci mutasyon sonucu mRNA'daki UAG'yi tanıyan AUC antikodonuna dönüşmesiyle anlamsız mutasyona karşın normalde beklenen proteinin yapılması mümkün olabilir (Klug ve ark. 2009).

### 2.6.2. Mutajenik Ajanlar

En geniş anlamda mutajen terimi, mutasyonlara sebep olan fiziksel ya da kimyasal ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Mutajen tanımı ve mutajenik maddelerin sınıflandırılması; gerçek mutajenler ile mutasyona yol açmaksızın DNA hasarı yapan diğer ajanlar arasındaki ayrımın ortaya konulması açısından da önemlidir. DNA kırılmalarına sebep olan maddeler mutasyon oluşturmaksızın DNA hasarına yol açan ajanlar için örnek olarak verilebilir. Meydana gelebilecek böyle bir hasar, çoğu zaman

replikasyonun durmasına ve hücrenin ölmesine neden olur. Ancak meydana gelen bu etki mutasyon olarak değerlendirilmez (Brown 2007).

Mutajenlerin mutasyon formasyonundaki rolleri üç farklı mekanizma ile açıklanmaktadır (Brown 2007):

1. Bu maddelerden bir kısmı baz analogları gibi davranarak DNA sentezi sırasında replikasyon hatalarına sebep olur.

2. Diğer bir kısmı doğrudan DNA ile etkileşime girer ve DNA'nın kopyalanacağı zaman hatalı eşleşmeler yapmasına yol açabilecek yapısal değişimlere sebep olur.

3. Bir kısmı ise DNA üzerinde indirekt etkiye sahiptir. Bu maddeler DNA yapısı üzerine doğrudan etki göstermez, bunun yerine hücrelerde bazı özel kimyasalların (örneğin peroksitler) sentezlenmesine yol açarlar. Sentezlenen bu maddeler DNA yapısında hasara ve mutasyon oluşumuna neden olabilecek özelliktedir.

#### 2.6.2.1. Kimyasal Mutajenler

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

**Baz analogları:** Baz analogları DNA'nın yapısına katılan bazlar ile benzer özellikler gösteren dinamik tautomer yapısına sahip pirimidin ve pürin bazlarıdır. Baz analogları DNA replikasyonu sırasında ortamda bulduklarında analogları oldukları orijinal bazların yerine DNA yapısına katılabilir. En iyi bilinen baz analoglarından biri olan 5-Bromourasil (5-bU) baz eşleşmesi bakımından timin ile aynı özelliklere sahiptir. Bu madde sentez sırasında ortamda bulunduğu DNA zincirindeki herhangi bir timinin yerini alabilir. (Kuru ve Gözükara 2001, Özbek 2006, Bahçeci 2007, Brown 2007, Klug ve ark. 2009). DNA yapısına katıldıktan sonra enol formuna dönüşecek olan 5-bU, bir sonraki replikasyon sırasında adenin yerine guanin ile eşleşecek ve bir nokta mutasyonun oluşmasına sebep olacaktır.

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

**Deaminasyon ajanları:** Nokta mutasyonların bir diğer kaynağı deaminasyon ajanlarıdır. Genomda belli bir oranda baz deaminasyonu hücre döngüsü sırasında kendiliğinden meydana gelmektedir. Adenin deaminasyonu sonucunda sitozin ile eşleşen hipoksantin ve sitozinin deaminasyonu sonucunda adenin ile eşleşen urasil oluştuğu için; bu iki bazın deaminasyonu yeni sentezlenen DNA üzerinde meydana gelen nokta mutasyonlar ile sonuçlanır. (Kuru ve Gözükara 2001, Özbek 2006, Bahçeci 2007, Brown 2007, Klug ve ark. 2009).

**Alkilleyici ajanlar:** Alkilleyici ajanlar nokta mutasyonların ortaya çıkmasında etkili olan bir diğer kimyasal mutajen grubudur. Etil metan sülfonat (EMS) ve dimetil nitrozamin gibi kimyasallar DNA moleküllerindeki nükleotidlere alkil grupları eklerler. Nükleotidlerin metilasyonu sıklıkla yanlış baz eşleşmeleri ve nokta mutasyonların ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. Ayrıca birçok alkillenme olayı DNA zincirleri arasında çapraz bağların oluşmasına ve replikasyonun erken durdurulmasına sebep olur (Özbek 2006, Bahçeci 2007, Brown 2007, Klug ve ark. 2009).

### 2.6.2.2. Fiziksel Mutajenler

**Sıcaklık:** Genom üzerine yapılan sıcaklık uygulamaları; nükleotidlerin yapısındaki şeker halkasını baza bağlayan  $\beta$ -N-glikozidik bağların kopmasına sebep olur. Bu reaksiyon sıklıkla pürin içeren bölgelerde, nadiren de pirimidin içeren bölgelerde meydana gelir ve sonucunda baz içermeyen AP (apürinik/apirimidinik) bölgeleri oluşur. Bazdan ayrılan şeker ve fosfat gruplarının da yıkımı sonucunda çift zincirli DNA yapısında 1 nükleotidlik bir boşluk (GAP) meydana gelir. Böyle bir boşluk hücresel DNA tamir mekanizmalarının aksamaya uğradığı bir dönemde mutasyon ile sonuçlanacaktır (Kuru ve Gözükara 2001, Özbek 2006, Bahçeci 2007, Brown 2007, Klug ve ark. 2009).

**Işınlara:**  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ - ışınları gibi yüksek enerjili iyonize radyasyonun absorpsiyonu hedef moleküllerde elektron kaybına neden olur. Bu elektronlarda DNA'da çeşitli kimyasal değişimlere (zincir koparma, baz ve şeker yıkımı gibi) yol açar. İyonize olmayan radyasyon, moleküler titreşime veya hedef moleküldeki elektronların yüksek enerji seviyesine çıkmasına neden olur. Bu durum da yeni kimyasal bağların oluşmasına neden olabilir. UV radyasyonun zararlı etkisi, özellikle iki timin bazı arasında dimerlerin oluştuğu pirimidinler üzerindedir. Bu dimerler DNA konformasyonunu bozar ve normal replikasyonu durdurur. Replikasyonun durması, UV radyasyonunun mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisinin sorumlusu olarak görülmektedir (Klug ve ark. 2009).

**pH:** DNA'nın pH=3.0'da zayıf asitlerle muamele edilmesi, pirimidin-deoksiriboz arasındaki glikozidik bağları veya fosfodiester bağları etkilemeksizin, onun tüm pürin bazlarını seçici olarak uzaklaştırır. Bu olay sonucu pürin bazlarından yoksun olan bir DNA yapısının meydana gelmesine depürinasyon denir. Ortamın pH derecesi de moleküller arası etkileşmelerde ve özellikle tautomerik dönüşümlerde rol oynar (Konuk 2004).

### 2.7. Antimutajenite ve Bazı Antimutajenik Bileşikler

Herhangi bir maddenin mutajenik etkinliğinin, çeşitli yollar kullanılarak ortadan kaldırılması antimutajenite olarak tanımlanmaktadır (Özbek 2006). Bu olayda aktif olarak görev alan antimutajen maddeler, etki mekanizmalarına göre desmutajenler ve biyo-antimutajenler olmak üzere iki grup altında toplanabilir (Samejima ve ark. 1995, Özbek 2006).

Desmutajenler, mutajen ajanların hücreye girişini bloke eden veya onları DNA ile etkileşimlerinden önce etkisiz hale getiren antimutajenik ajanlardır (Samejima ve ark. 1995, Özbek 2006). Desmutajenlerin etki mekanizmalarına, nitrozolandırma reaksiyonlarının (nitrosation reactions) engellenmesi, serbest oksijen radikallerinin (ROS: reaktif oksijen türevleri) giderilmesi, faz I ve faz II detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu gibi örnekler verilebilir (Nakasugi ve ark. 2000).

Biyo-antimutajenler ise mutajen maddelerin DNA ile etkileşmesinin ardından genetik materyal replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarının işleyişini düzenleyerek antimutajenik etkinlik gösteren ajanlardır. Bu maddeler desmutajenlerden farklı olarak,

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

mutasyonun meydana gelmesinin ardından etkinlik kazanırlar. Mutajenlerin zararlı etkilerine maruz kalmış hücrelerde DNA polimeraz I ve III enzimlerinin sentezini arttırmak ve error-prone DNA tamir mekanizmasının etkinliğini azaltırken error-free DNA tamir mekanizmasının etkinliğini arttırmak biyo-antimutajenlerin etki mekanizmalarına örnek olarak verilebilir (Samejima ve ark. 1995, Özbek 2006).

Günümüzde mutajen maddeler ile başta kanser olmak üzere birçok genetik hastalığın ortaya çıkışının ilişkilendirilmesi, mutajenlerin etkilerini ortadan kaldırarak bu hastalıkların meydana gelişinin önlenmesinde veya tedavilerinde etkili olabilecek antimutajenik kimyasalların araştırılmasına yönelik çalışmalara ivme kazandırmıştır (Feil ve Metzger 2007). Bu noktada, doğal kökenli bileşenlerin en temel kaynağı konumundaki bitkiler, yapılarında buldukları zengin kimyasal madde içeriği ile antimutajenik madde araştırmalarının en gözde grubunu oluşturmaktadır (Özbek 2006).

Tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen sekonder metabolitler üzerine yapılan araştırmalar; çeşitli hastalıkların tedavilerinde kullanılan sentetik kimyasalların bazılarında görülen tehlikeli yan etkilerin bitkisel kökenli bileşiklerde daha az oranda ortaya çıktığını göstermiştir. Ayrıca bitkisel kökenli preparatların genellikle tek bir etkiye sahip sentetik bileşenlere nazaran daha çok yönlü etkilerinin olduğu da bilinmektedir (Tsukagoshi ve Ohashi 1974, Özbek 2006).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, bitkilerin meyve, yaprak, gövde, kök gibi kısımlarından elde edilen bazı doğal bileşiklerin çeşitli mutajen ajanlara karşı antimutajenik etkinliğe sahip olduklarını göstermiştir.

Örneğin Franke ve ark.'larının (2004) çeşitli kaynaklardan elde edilen portakal suları ile yaptığı çalışma; bu suların antioksidan ve antimutajenik özelliklerinin ortaya çıkarılması ile sonuçlanmıştır. Benzer olarak Negi ve ark. (2003) tarafından nar kabuklarından elde edilen özütler ile yapılan çalışmada da özütlerin antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri arasındaki ilişki ortaya konmuştur.

Başta Ames olmak üzere çeşitli bakteriyel mutajenite ve antimutajenite test sistemleri kullanılarak yapılan araştırmalarda; *Aspalathus linearis*, *Chrysanthemum morifolium*, *Lavandula angustifolia*, *Maytenus ilicifolia*, *Mentha spicata*, *Peltastes peltatus*, *Ocimum basilicum* ve *Origanum vulgare*'nin de dahil olduğu birçok bitki özütünün Aflatoxin B1, Metil metan sülfonat, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin,

Sodyum azid, 1-nitropyren, 2-aminofluoren, 2-aminoantrasen, 2-asetamido-fluoren, 2-hidroksiamino-3-metil-3H-imidazo[4,5-f]quinoline, 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil) akrilamid, 2-nitrofluoren, 3-amino-1,4-dimetil-5H-pyrido[4,3-b]indol, 3-nitrofluoranten, 4- 31 nitroquinoline 1-oksit ve 4-nitro-1,2-fenilendiamin gibi birçok mutajen madde üzerine istatistiksel açıdan önemli derece antimutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Horn ve Vargas 2003, Miyazawa ve Hisama 2003, Yu ve ark. 2004, Evandri ve ark. 2005, Snijman ve ark. 2007, Berić ve ark. 2008, Özbek ve ark. 2008).

Tıbbi bitkilerin anti-inflamatuvar, anti-arterisklerotik, antiviral, antibakteriyel, antimutajenik, antikanserojenik ve antitümoral gibi çeşitli biyolojik aktivitelerinin kaynağı olan antioksidan özellikli bileşenlerine fenolik bileşikler (fenolik asitler, flavonoidler, quinonlar, kumarinler, taninler), nitrojen bileşikler (alkaloidler, beta-alaninler, aminler), vitaminler ve terpenoidler örnek olarak verilebilir (Chai ve ark. 2004).

Fenolik bileşikler olarak da adlandırılan polifenoller, aromatik halkalarında bir ya da daha fazla sayıda hidroksil grubu içeren bileşiklerdir. Büyük bir kısmı hidrofilik olan bu bileşikler meyve ve sebzelerde yoğun olarak bulunur (Moss ve ark. 1993).

Fenolik bileşiklerin sahip olduğu antioksidan aktivite, bu bileşiklerin metal şelatlama özelliklerinin, singlet oksijen giderme etkinliklerinin ve indirgeyici ajan olarak davranmalarını sağlayan redoks aktivitelerinin kaynağını oluşturmaktadır (Ancos ve ark. 2000). Bu bileşikler aynı zamanda ROS radikallerini süpürücü özelliğe de sahiptir. Fenolik bileşiğin bu özelliği molekülün aromatik halkası üzerindeki hidrojen-donating hidroksil gruplarının pozisyonuna ve sayısına, fenolik hidrojenlerin mevcudiyetine ve hidrojen vererek oluşan fenoksi radikallerinin kararlı hale geçebilme potansiyellerine bağlıdır (Silva ve ark. 2000, Chai ve ark. 2004).

Flavonoidler çeşitli fenolik yapılara sahip doğal maddelerin oluşturduğu bir gruba dahil olup çeşitli bitkisel kökenli ürünlerde bulunurlar. Sağlık üzerine olan yararlı etkilerinden dolayı bilim açısından her zaman dikkat çekici olmuşlardır (Backhouse ve ark. 2008a, 2008b, Cosentino ve ark. 2008, Zhang ve Chen 2008, Ntandou ve ark. 2010). Günümüze kadar 4000'den fazla flavonoid çeşidi tanımlanmış olup; bunların büyük çoğunluğu çiçeklerin, meyvelerin ve yaprakların göz alıcı renklerinin oluşumundan sorumludur (De Groot ve Rauen 1998). Yapılan epidemiyolojik

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

çalışmalar gıdalarla birlikte flavonoid alınımının kalp-damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir. Yine bu yönde yapılan çalışmalar, flavonoid alınımı ile ömür uzunluğu arasında korelasyon olduğunu açığa çıkarmıştır (Nijveldt ve ark. 2001).

Flavonoidlerin etki mekanizmalarına ait çalışmalar yaklaşık 50 yıl öncesine kadar gitmektedir. Buna karşın ilk flavonoid (rutin) izolasyonu 1930 yılında portakaldan yapılmıştır ve bundan sonra çalışmalar hızla artmıştır (Hanasaki ve ark. 1994).

Flavonoidler moleküler yapılarına göre çeşitli gruplara ayrılabilirlerse de; temelde flavonlar, flavononlar, kateşinler ve antosiyaninler olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Jang ve ark. 2008).

Flavonoidlerin en önemli etkilerinden biri serbest oksijen radikallerine karşı koruma sağlamalarıdır. Bununla birlikte, yapılan *in vitro* çalışmalar flavonoidlerin antiinflamatuvar, antialerjik, antiviral, antimutajenik ve antikanserojenik etkilerinin olduğunu göstermiştir (Tshikalange ve ark. 2005, Cimanga ve ark. 2006, Ooi ve ark. 2006, Kuete ve ark. 2008, Gulluce ve ark. 2010).

E vitaminin bir formu olan  $\alpha$ -Tokoferol sekiz ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ -tokoferol ve  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ -tokotrienol) bileşenden oluşan bir grup içerisinde yer almaktadır. Bu bileşenler kimyasal yapılarındaki doygunluk durumları ve metil gruplarının yerleşim şekillerine göre birbirinden ayrılmaktadır. Bununla birlikte, yapılan araştırmalar insan vücudunda en baskın oranda bulunan E vitamini formunun  $\alpha$ -tokoferol olduğunu göstermiştir (Nikolić ve ark. 2004, Özbek 2006).

Yağda eriyebilen önemli bir vitamin olan  $\alpha$ -tokoferol'un antimutajenik etkinliğinde, bu maddenin serbest radikal reaksiyonlarının yayılımını engelleyen antioksidan aktivite göstermesi önemli rol oynamaktadır (Karekar ve ark. 2000, Nikolić ve ark. 2004, Ramanathan ve ark. 2005).

Literatürde bazı E vitamini formlarının insan kanser hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği ve belirli kanser hücrelerine karşı seçici olan apoptozis mekanizmalarını uyardığı rapor edilmiştir (Cameron ve ark. 2003).

C vitamini olarak da bilinen askorbik asit, etkili biçimde serbest radikalleri toplama özelliğine sahip kuvvetli bir antioksidan maddedir. Yapılan çalışmalar bu

maddenin bilinen birçok mutajene karşı antimutajenik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (Gentile ve ark. 1998).

Askorbik asidin antimutajenik aktivitesindeki bilinen etki mekanizmalarına; hücrelerde bulunan  $\alpha$ -tokoferolün rejenerasyonuna katkı sağlaması ve genetik materyalde hasarlara sebep olan serbest radikallerin bu etkilerini antioksidan özelliği ile ortadan kaldırması örnek olarak verilebilir (Özbek 2006).

Karotenoidler, başta sarı ve turuncu renkli sebze ve meyveler olmak üzere birçok bitkide bol miktarda bulunur. Yapılan çalışmalar bu maddelerin antioksidan, antimutajenik ve antikanserojenik etkilerine bağlı olarak mutasyonlar ile ilişkilendirilen birçok hastalıktan korunmada önemli rol oynadıklarını göstermiştir. Örneğin; önemli karotenoidlerden biri olan  $\beta$ -karoten yönünden zengin gıdaların tüketilmesi ile kanser olma riski arasında ters orantının olduğu bilinmektedir (Peto ve ark. 1981, Scolastici ve ark. 2008). Ayrıca likopen ile yapılan benzer çalışmalarda; kuvvetli antioksidan etki gösteren bu maddenin; kalp hastalıklarını önleyici, anti-inflamatuvar, antimutajenik ve antikanserojenik özellikte olduğu belirlenmiştir (Bhuvanewari ve Nagini 2005, Scolastici ve ark. 2008).

Karotenoidlerin mutasyon ve kanser gelişimi üzerine olan engelleyici etkilerinin mekanizması; onların serbest oksijen radikallerini inaktive etme, hücrel detoksifikasyon olaylarına olumlu yönde katkıda bulunma, hücre proliferasyonunu düzenleme, hücreler arası haberleşme oranını arttırma, hücre döngüsünü sınırlama ve sinyal transdüksiyon yollarının modülasyonunu sağlama gibi özelliklerine dayanmaktadır (Zhang ve ark. 1991, Astorg ve ark. 1997, Pastori ve ark. 1998, Bhuvanewari ve Nagini 2005, Scolastici ve ark. 2008, Barcelos ve ark. 2009).

### **2.8. Kısa Zamanlı Mutajenite – Antimutajenite Testleri**

Günlük hayatta sıklıkla kullanılan doğal ya da sentetik kimyasal bileşiklerin büyük çoğunluğu canlıların kalıtsal materyallerinde istenmeyen değişikliklere neden olacak genotoksik ve kanserojenik etkilere sahiptir. Bu kimyasalların olumsuz etkilerinden korunmak; onların tespiti, tanılanması ve etkilerinin araştırılması ilkelerine dayanmaktadır. Bu bağlamda birçok maddenin mutajenik ve kanserojenik etkilerini ortaya çıkarmak için uygulanabilecek en akıllıca yaklaşım, deney hayvanları ile yapılan *in vivo* araştırmalardır. Bu testler, kimyasal maddelerin uygulanmasıyla deney



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

sonuçlarının alınması arasındaki sürenin fazla oluşundan dolayı uzun zamanlı testler olarak da adlandırılmaktadır (Petek 1999, Özbek 2006).

Uzun zamanlı test sistemleri, mutajenite ve kanser araştırmalarında bilinen en hassas ve en güvenilir test sistemleri olmalarına karşın; yüksek maliyet ve zaman gereksinimlerinden dolayı yüzlerce kimyasalın mutajenik ve kanserojenik etkinliklerinin araştırıldığı öncü testlerde kullanışlı değildir (Özbek 2006).

Bu nedenle araştırmacılar, mutajen veya kanserojen özellikteki kimyasalların bu potansiyellerinin araştırılmasında esas teşkil edebilecek birçok *in vitro* kısa zamanlı test sistemi geliştirmiştir (Çizelge 2.2.). Uzun zamanlı test sistemlerinin aksine daha kısa sürede sonuç veren ve daha ekonomik olan bu testler; çok sayıdaki kimyasal madde ile yapılacak olan öncü testler için oldukça uygundur. Bu testlerin uygulama esası; test edilen kimyasal maddelerin belirli genetik özelliklere sahip sistemlerde belirli sonuçlar vermesi ve elde edilen bu sonuçlarla test materyalinin mutajenik ya da kanserojenik potansiyeli arasındaki ilişkinin kurulmasına dayanır. Ayrıca bu sonuçların insan da dahil birçok canlıya uygulanabilir olması genetik kodun evrenselliği ve mutajenite ile kanserojenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşuna bağlanmaktadır (Mortelmans ve Zeiger 2000, Özbek 2006).

Kısa zamanlı test sistemlerinden elde edilen pozitif sonuçlar, genellikle bu testlerin ardından yapılan uzun zamanlı test sistemlerinin kullanıldığı araştırmalar ile teyit edilmektedir.

Çizelge 2.2. Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri

Kısa Zamanlı Testler	İzlenen Genetiksel/ Biyokimyasal Yol	Kaynak
<i>Salmonella typhimurium</i>	Histidin okzotrofları	(Ames ve ark. 1973b, Maron ve Ames 1983)
	Arjinin/triptofan oksotrofları	(Green ve Muriel 1976)
	Profaj indüksiyonu	(Elesperu ve Yarmolinsky 1979)
<i>Escherichia coli</i>	Onarım eksikliği olan suşların büyüme hızlarının inhibisyonu	(Moreu ve ark. 1976) (Rosenkranz ve Mermelstein 1983)
	SOS cevabı	(Slater ve ark. 1971, Leifer ve ark. 1981)
	Büyüme inhibisyonu	(Quillardet ve Hofnung 1985)
	DNA onarımı hatalı suşlar	(Gümüş ve ark. 1996)
<i>Vibrio harveyi</i>	GTP bağlayıcı proteini (cgtA geni) hasarı olan suşların kimyasal ile muamelesinden sonra neomisin dirençli mutantların tespiti	(Czy'z ve ark. 2002)
<i>Bacillus subtilis</i>	Büyüme inhibisyonu	(Leifer ve ark. 1981)
	DNA onarımı hatalı suşlar	(Kada ve Hirano 1980)
<i>Neurospora crasa</i>	Adenin okzotrofları	(Brockman ve ark. 1984)
Çin hamsteri ovaryum ve akciğer hücreleri ile	HGPRT (Hipoksantinguanin fosforiboziltransferaz) lokusunda mutasyonlar	(Beaudet ve ark. 1973)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Kromozomal hatalar	(Vogel ve Sobels 1976)

Mutajenlerin ya da kanserojenlerin belirlenmesi için kullanılan kısa zamanlı test sistemleri, çeşitli modifikasyonlar ile antimutajenlerin veya antikanserojenlerin belirlenmesini sağlayan test sistemlerine kolayca dönüştürülebilir (Özbek 2006). Bu test sistemleri sitogenetik yöntemler ve mikrobiyal yöntemler olmak üzere iki alt gruba ayrılır (Korkmaz 2005).

### **2.8.1. Sitogenetik Yöntemler**

Büyük çaplı kalıtsal materyal hasarlarına sebep olan çeşitli ajanların araştırılmasında kullanılan sitogenetik yöntemlere yapısal kromozom bozukluğu (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mikronükleus (MN) testleri örnek olarak verilebilir. Bu test sistemleri genellikle; kimyasalların uygulanması ve çeşitli boyama aşamalarının ardından genetik materyaldeki değişimlerin doğrudan mikroskop altında incelenmesi esasına dayanmaktadır (Korkmaz 2005).

#### **2.8.1.1. Yapısal Kromozom Bozukluğu Testi (CA: Chromosome Aberration)**

Bu test sistemi; anöploidi ve poliploidi olgularını içeren kromozom sayısı mutasyonları ile kromozom-kromatid kopmalarını içeren kromozom yapısı mutasyonlarının belirlenmesinde oldukça etkilidir. Yapılan uygulamalarda, kullanılan hücrelerin bölünmesi test materyaline maruz bırakılmalarının ardından kolşisin gibi inhibitör ajanların kullanılmasıyla metafaz safhasında durdurulur. Bu safhada yapılan mikroskop incelemeleri ile test materyalinin mutajenik potansiyeli değerlendirilir (Korkmaz 2005).

#### **2.8.1.2. Kardeş Kromatid Değişimi Testi (SCE: Sister Chromatid Exchange)**

Bu test sistemi özellikle kalıtsal materyalde kırılmalar meydana getiren mutajenik ajanların araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. SCE testlerinde, uygulanan kimyasallardan dolayı DNA yapısında meydana gelen kırılmalar, hücrelerde bulunan DNA onarım mekanizmalarını aktive eder. Bu onarım sürecinde, belirli koşullar altında, karşılıklı duran iki kardeş kromatidin (sister chromatids) homolog parçaları yer değiştirir. SCE testinin uygulanması, kardeş kromatidlerin her birinin özel boyama teknikleri kullanılarak birbirinden farklı boyanması ve yer değiştiren bu

parçaların mikroskop altında incelenerek sayılması esasına dayanmaktadır (Albanesi ve ark. 1999, Korkmaz 2005).

### **2.8.1.3. Mikronükleus Testi (MN)**

Çeşitli hücrelerin mitoz bölünmeleri sırasında ortaya çıkan mikronükleuslar; hücrenin esas çekirdeğine dahil olmayan, sentromer içermeyen kromozom parçalarından ya da tam kromozomlardan köken alabilen oluşumlardır. Çeşitli kimyasallara maruz bırakılan hücrelerin MN frekanslarındaki artış, bu kimyasalların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu teknik ile belirlenebilen anöjenler (anöploidiye sebep olan ajanlar), sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler (kromozom yapısı düzensizliklerine sebep olan ajanlar) ise kromozom kırıklarına sebep olarak MN oluşumuna katkıda bulunur (Fenech 1993, Demirel ve Zamani 2002).

Bu test sistemi sitogenetik harabiyetin belirlenmesinde, yapısal kromozom bozukluğu testine göre daha kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajlar sağlaması sonucunda yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (Fenech 1993, Demirel ve Zamani 2002).

### **2.8.2. Mikrobiyal Yöntemler**

Genellikle bakterilerin kullanıldığı mikrobiyal yöntemler, kısa zamanlı test sistemleri içerisinde yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında yer alır. Mikroorganizmaların basit besiyerlerinde kolayca üremesi, kısa hayat devirlerine sahip olmaları ve buna bağlı olarak yapılan uygulamaların pratik, hızlı ve düşük maliyetli olması gibi özellikler bu test sistemlerinin genel avantajlarıdır (Mortelmans ve Zieger 2000).

Mikrobiyal yöntemlerin kullanıldığı mutajenite ve antimutajenite testlerinin kullanım alanları 7 başlık altında toplanabilir (Barış 2007);

1. Çeşitli kimyasalların potansiyel mutajenik ve kanserojenik etkinliklerinin araştırılması

2. Kompleks içerikli materyallerden biyolojik olarak etkin bileşiklerin saflaştırılması
3. Prokanserojenlerin öncül veya nihai metabolitlerinin saptanması
4. Çeşitli vücut sıvılarının analizine bağlı olarak, insanların mutajenlere ve kanserojenlere maruz kalma potansiyelinin takibi
5. Mutajenik, antimutajenik, kanserojenik ya da antikanserojenik bileşiklerin etki mekanizmalarının aydınlatılması
6. Mutasyonlar ve konukçu organizma ilişkileri (host mediated) ile ilgili araştırmalar
7. Mutajen veya kanserojen kimyasalların sebep olduğu özgül DNA hasarlarının sınıflandırılmasına yönelik çalışmalar

Mikrobiyal yöntemlerden yaygın olarak kullanılan test sistemlerine, mutant *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin kullanıldığı maya delesyon testi (Yeast DEL Assay), histidin oksotrofu *Salmonella typhimurium* mutant bakteri ırklarının kullanıldığı Ames/*Salmonella* test sistemi ve triptofan oksotrofu *Escherichia coli* mutant bakteri ırklarının kullanıldığı *E. coli* WP2 test sistemi örnek olarak verilebilir (Mortelmans ve Riccio 2000, Mortelmans ve Zeiger 2000, Kirpnick ve ark. 2005).

### 2.8.2.1. Maya Delesyon Testi (Yeast DEL Assay)

Rekombinasyon, delesyon ve kanserogenezis arasındaki ilişkiden dolayı, genomik delesyonlar (DEL) ile sonuçlanan intrakromozomal homolog rekombinasyonların frekanslarını ölçebilen test sistemlerine ihtiyaç duyulur. Bu amaçla geliştirilen birçok test sisteminde; maya, fare, hamster, tütün ve *Arabidopsis* gibi çeşitli organizmalar kullanılmaktadır (Brennan ve Schiestl 2004).

Maya delesyon testi, *his3Δ* allellerinin birbiriyle yaklaşık 400 baz çifti mesafede homoloji gösteren iki ucu arasındaki (*his3Δ3'* ve *his3Δ5'*) rekombinasyon frekansının ölçülmesi esasına dayanır. Bu test sistemi, *Saccharomyces cerevisiae*'nin genomunda bulunan *his3* operonu içerisine aktif *Leu2* gen bölgesini taşıyan pRS6 plazmidinin yerleştirilmesi suretiyle bu bölgenin histidin yönünden inaktif hale getirilmesi şeklinde dizayn edilmiştir. Böylelikle çalışmada kullanılacak olan hasara uğratılmış inaktif *his3*

ve aktif *Leu2* marker genlerini taşıyan maya ırkı elde edilmiştir. Uygulamalar sonucunda iki *his3Δ* alleli arasında meydana gelen homolog rekombinasyonlar *Leu2* gen bölgesinin genomdan çıkarılmasına (DEL) ve *his3* gen bölgesinin yeniden aktifleşmesine sebep olur. Bu sayede çalışma başında histidin oksotrofu olan maya, uygulanan kimyasalların etkisiyle prototrof haline geri döner (Brennan ve Schiestl 2004, Kirpnick ve ark. 2005).

Maya delesyon testi, intrakromozomal rekombinasyon sistemleri içerisinde, uygulanması en kolay ve sonuçları en güvenilir olan test sistemi olarak tanımlanmaktadır. Mayalardaki delesyon rekombinasyonu; iyonizan ve iyonizan olmayan radyasyon, alkilleyici ajanlar, oksidatif stres, DNA zincir kırıklarına neden olan maddeler ve sıcaklık şoku gibi çeşitli mutajen ajanlar tarafından geniş ölçüde teşvik edilebilir. Bu test sistemi; diğer kısa zamanlı test sistemleri tarafından saptanamayan, ancak deney hayvanları kullanılarak yapılan uzun süreli *in vivo* test sistemleriyle tespit edilebilen birçok kanserojen maddeye karşı duyarlı olmasıyla da bu yönde yapılan araştırmalar açısından önem arz etmektedir (Brennan ve Schiestl 2004, Kirpnick ve ark. 2005).

#### **2.8.2.2. *Escherichia coli* WP2 Test Sistemi**

Önemli bakteriyel geri mutasyon testlerinden bir diğeri olan *E. coli* WP2 test sistemi, ilk kez 1976 yılında Green ve Muriel isimli araştırmacılar tarafından; kimyasal maddelerin mutajenik ve antimutajenik potansiyellerinin araştırılması amacıyla geliştirilmiştir (Green ve Muriel 1976).

Birçok araştırma laboratuvarında Ames/*Salmonella* testi ile birlikte uygulanan bu test sisteminde, triptofan oksotrofu olan *E. coli* bakteri suşları kullanılmaktadır. Bu suşlar ile yapılan genomik düzeydeki araştırmalar; mutajenite ve antimutajenite testlerinde en sık kullanılan *E. coli* WP2, WP2(pKM101), WP2 *uvrA* ve WP2 *uvrA* (pKM101) suşlarının da dahil olduğu her bir test suşunun, triptofan sentezindeki önemli enzimlerden birini kodlayan *trpE* geninde AT baz değişimi nokta mutasyonu taşıdığını göstermiştir. Bu mutasyonu taşıyan *E. coli* test suşlarında görülen triptofan oksotrofluğunun sebebi; meydana gelen AT baz değişiminin, *trpE* gen bölgesinde bir ochre (anlamsız, non-sense) mutasyonla sonuçlanması ile açıklamaktadır (Mortelmans ve Riccio 2000).

Ayrıca *E. coli* WP2uvrA test suşunda triptofan mutasyonuna ek olarak uvrA mutasyonu, *E. coli* WP2(pKM101) suşunda pKM101 plazmiti ve *E. coli* WP2uvrA (pKM101) test suşunda ise hem uvrA mutasyonu hem de pKM101 plazmiti bulunmaktadır. Yeni nesil test bakterileri olarak tanımlanan bu suşlardaki ekstra mutasyonların varlığı, Ames/*Salmonella* test sisteminde kullanılan bakteri suşlarında da olduğu gibi, bakterilerin çeşitli mutajenlere karşı olan hassasiyetlerinin artması ile sonuçlanmıştır (Mortelmans ve Riccio 2000).

### 2.8.2.3. Ames (*Salmonella*/Mikrozom) Test Sistemi

Ames *Salmonella*/Mikrozom test sistemi, gen mutasyonlarına neden olabilen kimyasal maddelerin önemli bir kısmını saptamak amacı ile geliştirilmiştir. Bu test, pek çok ülkenin laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden birisidir. Dr. Bruce N. Ames tarafından geliştirilmiş olduğu için Ames testi olarak da adlandırılmaktadır (Maron ve Ames 1983).

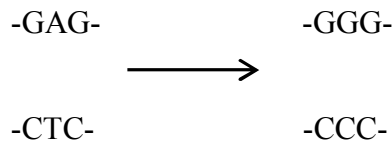
Ames test sisteminde *in vitro* mutasyonlar ile elde edilen histidin sentezini yapamayan bir dizi *Salmonella* mutant suşları kullanılmaktadır. Histidin bulunmayan ortamlarda bu bakterilerin üremesi, dolayısı ile de koloni oluşumu gerçekleşemez. Histidin genindeki mutasyon bölgesinde veya bu genin yakınındaki bir bölgede oluşan yeni bir mutasyonla bu genin fonksiyonu düzeltilebilir ve hücreler histidin olmayan ortamda üreyebilirler. Bu nedenle, bu test sıklıkla bir ‘reversiyon (geri dönüş) yöntemi’ olarak bilinmektedir (Mortelmans ve Zeiger 2000).

Bu yöntem, metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan *in vitro* genotoksik ajanların ortaya çıkarılması için kullanılan en yaygın yöntemdir. Bu test, pek çok enzimi içeren metabolik sistem ile (S9 Fraksiyonu) birlikte ‘metabolik karşılaştırma’ olanağı sunmaktadır. S9 Fraksiyonu; Sitokrom-P450 bağımlı monooksidazlar, Sitokrom-P450 bağımsız oksidazlar, epoksit hidraz, glukuronil transferaz, azoredüktaz, nitro redüktaz, amidaz ve esteraz’dan oluşmaktadır. Bu enzimlerin eklenmesiyle kimyasal maddelerin biyotransformasyon sonucu gösterebileceği etkinin saptanması ve kısa zamanda oldukça düşük bir maliyetle kanser oluşturma potansiyelleri hakkında bir tahmin yürütülmesi amaçlanmaktadır (Mortelmans ve Zeiger 2000, Paolini ve Forti 1997, Maron ve Ames 1983).

Bu test sisteminde, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar ile elde edilmiş bir seri *S. typhimurium* TA1535 TA1537, TA1538, TA98, TA100, TA97, TA102.... mutant suşları kullanılmaktadır. *Salmonella* suşları, histidin operonundaki çeşitli genlerde farklı mutasyonlara sahiptir. Bu mutasyonların her biri farklı mekanizmalar ile etki gösteren mutajenlere karşı cevap oluşturmak için dizayn edilmiştir (Maron ve Ames 1983, Aeschbacher ve ark. 1983, Levin ve Ames 1986, Mortelmans ve Zeiger 2000]. *S. typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri Çizelge 2.3.' de verilmiştir.

**Histidin Mutasyonu:** Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar ya DNA'daki tek bir bazın değişmesiyle ortaya çıkan baz değişmeleri yada çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Test edilen bileşiğin neden olduğu mutasyonun esas mekanizması, moleküler düzeyde bu suşlarla gösterilebilir (Mortelmans ve Zeiger 2000).

*S. typhimurium* his<sup>-</sup> (histidine gereksinim duyan) mutantların DNA baz dizilim analizleri yapılarak mutasyonların yerleri ve karakterleri saptanmıştır (Maron ve Ames 1983). *S. typhimurium* TA100 ve *S. typhimurium* TA1535 suşlarında bulunan *hisG46* mutasyonu, histidin biyosentezindeki ilk enzim olan pirofosforilazı kodlayan PR-ATP *hisG* geni üzerindedir. Bu mutasyon, *hisG* geninde, lösün amino asidi kodonu yerine prolin amino asidi kodonu gelmesine neden olur.



*S. typhimurium* TA100 ve *S. typhimurium* TA1535 suşları, baz çifti değişimine neden olan mutajenler tarafından geri döndürülmektedir (Levin ve Ames 1986, Mortelmans ve Zeiger 2000).

*hisD3052* mutasyonu, *S. typhimurium* TA1538 ve *S. typhimurium* TA98 test suşlarında bulunur. Bu mutasyon, histidinolü histidine çeviren, histidin biyosentezindeki son enzim olan L-histidinol dehidrogenazı kodlayan *hisD* geni üzerindedir.

*hisD3052* mutasyonu, çerçeve kayması şeklinde bir mutasyon olup tek bir nükleotidin eksikliği sonucu oluşmuştur (Bryan ve ark. 1993, Mortelmans ve Zeiger



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

2000). *hisD3052* mutasyonu, *hisD* geni içinde 8 kez tekrarlanan GC dizisine sahiptir. Bu dizi, -1 çerçeve kayması mutasyon bölgesinin yanındadır (Isano ve Yourna 1974). Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler, DNA'nın tekrarlanan dizileri ya da sıcak noktalar denilen bölgelerinde görülen kodon kaymalarını geri dönüştürerek bu kodonların yeniden doğru okunmalarını sağlarlar (Ames ve ark. 1975).

*S. typhimurium* TA1538 ve *S. typhimurium* TA98 suşları, çerçeve kayması tipi mutasyonlara neden olan 2- nitrofloren ve amino türevleri, çeşitli aromatik nitroso türevleri gibi farklı mutajenler tarafından indüklenmesi ile tekrar  $his^-$  hale geri dönüştürülmektedir (Maron ve Ames 1983, Mortelmans ve Zeiger 2000).

*S. typhimurium* TA102 suşuna ait *hisG* genindeki TAA, tüm altı muhtemel baz çifti değişimi (transisyon/transversiyon) ile geri döndürülebilir. Bu mutasyon aynı zamanda oksidatif mutajenler, x ışınları, UV ışığı, bleomisin, hidrojen peroksit, streptonigrin ve çeşitli aldehitler tarafından da geri döndürülebilir.

DNA onarım sistemi sağlam olan *S. typhimurium* TA102 suşu bleomisin ve mitomisin C gibi DNA ya çapraz bağlanan ajanları da tespit etmektedir (Levin ve ark. 1984, Mortelmans ve Zeiger 2000). Çapraz bağlı ajanların DNA üzerinde etkilerini gösterebilmesi için kesip çıkarma onarım sisteminin çalışır durumda olması zorunludur (Levin ve Ames 1986, Mortelmans ve Zeiger 2000).

Başlangıçta geliştirilen  $his^-$  mutantlarının çeşitli kimyasallara karşı duyarlılığını arttırmak üzere, bu suşlara aşağıda bahsedilen bazı mutasyonlar eklenmiştir.

***uvrB* mutasyonu:** DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan *uvrB* genindeki delesyon sonucu oluşur. *uvrB* delesyonu, kesip çıkarma mekanizmasının doğruluğunu elemine ettiği için hata oranı yüksek onarım mekanizması (SOS) tarafından daha fazla DNA lezyonunun onarılması mümkün olur. Böylece *uvrB* mutasyonu, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur (Mortelmans ve Zeiger 2000). Ancak *uvrB* geninin kesilerek uzaklaştırılması sırasında bu delesyon biyotin genine kadar uzanmaktadır. Bu nedenle, bakteriler üreyebilmek için histidinin yanında biyotine de gereksinim duyarlar (Maron ve Ames 1983).

Çizelge 2.3. *S. typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	pKM101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA1535	<i>hisG46</i>	<i>Rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	-	AT→GC transisyon	Baz çifti yer değişimine neden olan mutajenler
TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>Rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	-	C.....C yanına + 1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA1538	<i>hisD3052</i>	<i>Rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	-	CG.....CG yanından - 1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA98	<i>hisD3052</i>	<i>Rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	+	CG yanından - 1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA100	<i>hisG46</i>	<i>Rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	+	AT→CG transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA97	<i>hisD6610</i>	<i>Rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	+	CCC yanına + 4	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA102	PA Q1 <i>hisG428</i> $\Delta$ <i>his</i>	<i>Rfa</i>	+	+	G Ochre AT	Oksidantlar, X ışınları, UV, Mitomisin C, Bleomisin, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve kinonlar

**Rfa mutasyonu:** Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit (LPS) tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir. Bu durum hücre duvarının geçirgenliğinin artmasına ve büyük moleküllerin geçişine neden olur. Bu mutasyonla kimyasalların toksik etkisi ve mutajenitesi artmış olur (Claxton ve ark. 1987).

**R faktörü:** *S. typhimurium* TA98 suşu, TA1538'e ve TA100 suşu da TA1535 suşuna ampisiline dirençlilik geni taşıyan pKM 101 R plazmidinin eklenmesiyle elde edilmiştir. pKM 101 plazmidinin eklenmesiyle hata oranı yüksek onarım (SOS) ve rekombinasyonel DNA onarım yolları daha fazla devreye gireceğinden kimyasal ve UV ile indüklenen mutajenite de artırılmış olur (Mortelmans ve Zeiger 2000).

**pAQ1 Plazmidi:** Tetrasiklin dirençlilik geni taşır ve *S. typhimurium* TA102 suşunda bulunur. *S. typhimurium* TA1535 ve TA100 suşları ile saptanamayan ve baz çifti değişimine neden olan mutajenleri tespit edebilmek amacı ile geliştirilmiştir (Mortelmans ve Zeiger 2000).

### 2.9. Ames (*Salmonella*/Mikrozom) Test Sistemiyle Yapılmış Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmaları

*Salmonella*/ mikrozom test sisteminin kullanıma başlandığı 1975 yılından 1982 yılına kadar geçen süre içinde, beş binden fazla kimyasal maddenin mutajenik etkileri araştırılmıştır. Bu test sisteminde, kanserojen olarak bilinen 179 madde teste tabi tutulmuş ve bunlardan 156'sının (% 87'si) mutajenik olduğu bulunmuştur. Aynı sistem ile 117 kanserojenik olmayan maddeyi de % 86'lık bir oran ile nonmutajenik olarak sınıflandırmıştır. Bu değerden anlaşılacağı gibi *Salmonella*/mikrozom test sistemi, kanserojenik maddelerin % 13'ünü mutajenik etkili olarak saptayamamaktadır. Diğer taraftan aynı test sistemi ile kanserojenik olmayan maddelerin de % 14'ü mutajenik olarak tanımlamaktadır (Akın 1990). Çeşitli uçucu maddelerin, suda az çözünen gaz ya da sıvı bileşiklerin mutajenik özelliklerini bu test sistemi ile ortaya çıkarmak mümkündür. *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile vinil klorür gazının mutajenik etkisi gösterilmiştir (Pavanello ve ark. 2002). Sigara içenlerin idrarında mutajenik etkili kimyasal maddeler olduğu ilk kez Yamakaski ve Ames tarafından 1977 yılında gösterilmiştir. Ayrıca sigara dumanı bileşenlerinin Ames testindeki pek çok suş üzerinde mutajenik etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (White ve ark. 2001, Pavanello ve ark. 2002).

Çin tarçımının S9 yokluğunda *Bacillus subtilis* üzerinde mutajenik aktivite gösterdiği fakat Ames *Salmonella*/ mikrozom ve *Escherichia coli* WP2 uvrA test sisteminde ise mutajenik aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Sekizawa ve Shibamoto 1982).

Akın ve Sümer (1989), Sodyum benzoatın S9 varlığında ve yokluğunda test suşları üzerinde mutajenik etkisi olmadığını, sodyum nitratın ise S9 varlığında *Salmonella typhimurium* TA100 suşu üzerinde zayıf mutajenik etkili olduğunu belirlemişlerdir.

İzbırak ve ark. (1990), gıdaları renklendirmede yaygın olarak kullanılan 4 azo boyasının (Ponceau 4R, Amaranth, Sunset Yellow FCF ve Tartrazine) *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 üzerine mutajenik etki göstermediğini tespit etmişlerdir.

Sümer ve ark. (1990), bazı insektisitlerin *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; Bioallethrin'in, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşu, Propoxur ve Formulation I'in ise sadece *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde zayıf mutajenik etki gösterdiğini saptamışlardır.

Rasool ve Musthaq (1991), altı alkaloid madde ve bir sivrisinek kovucu maddeyi mutajenik aktiviteleri yönünden Ames *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile incelemiş; test edilen alkaloidlerin tümünün ve sivrisinek kovucunun mutajenik aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Bazı ilaç hammaddelerinin, bazı gıda katkı maddelerinin ve bazı tekstil boyalarının mutajenik etki gösterdiği Ames test sistemi ile belirlenmiştir.

Bir araştırmada, benzidin (azo boyalarını oluşturan esas madde) yapısındaki hidrazon boyalarının mutajenik etkisi incelenmiştir. Benzidinlerin aksine, hidrazonun mutajen olmadığı gösterilmiştir (Chung ve Stevens 1992).

Le Curieux ve ark. (1993), yedi kimyasal maddeyi SOS kromotest, Ames test sistemi ve newt mikronukleus test sistemleri ile incelemiş; test edilen kimyasal maddeleri Ames test sisteminde sodyum hipoklorit hariç diğer bütün kimyasalların *Salmonella typhimurium* TA100, TA102 ve TA98 üzerinde mutajenik aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Diğer bir araştırmada, gıdalarda ve ilaçlarda kullanılan sodyum karboksimetil nişasta ve sodyum karboksimetil selulozun mutajenik etki oluşturmadığı Ames testi ile gösterilmiştir (Strizhel 1994).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

Bir çalışmada, gıda üretiminde kullanılan bazı heterosiklik aromatik aminlerin (HAAs) mutajenik aktiviteleri Ames/*Salmonella* yöntemi ile test edilmiştir. 3 –amino – 1,4 dimetil – 5H – prido (4,3 – b) indole adlı maddenin güçlü mutajenik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Starvric 1997).

Yapılan bir çalışmada, gıda katkı maddesi olarak kullanılan uçucu yağlardan mentol, terpineol, sitral ve 1-8-sineol sitralin mutajenik etkisi Ames testi ile incelenmiştir. Bunlardan terpineolün mutajenik etkisi olduğu tespit edilmiştir (Gomes 1998).

Ramos ve ark. (2001), *Parthenium hysterophorus* bitkisinden elde edilen ham ekstraktı mutajenik potansiyeli yönünden *Salmonella*/mikrozom test sisteminde ve fare kemik iliği mikronükleus testinde incelemiştir. Bakteriyel mutajenite testi sonuçları beş farklı suşta (*Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 ve TA102) negatif olarak bulunmuştur.

Havada ve suda kirlilik yaratan polisiklik hidrokarbonların, ağır metallerin yüksek derecede mutasyon oluşturma yeteneğinde olduğu tespit edilmiştir (Monarca ve ark. 2002, Feilberg ve ark. 2002, Ohe ve ark. 2003).

Gıda sanayinde sıklıkla kullanılan gıda katkı maddelerinden askorbik asit, Fe tuzları ve potasyum sorbat metabolitlerinin mutajenik etki gösterdiği Ames test sistemi ile gösterilmiştir (Kitano ve ark. 2002).

Al-Batina ve ark. (2003), anason, aspir, çörek otu, kakule ve kimyon gibi bazı baharatlardan elde edilen uçucu yağların *Salmonella typhimurium*'un TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları üzerinde mutajenik aktivite göstermediklerini gözlemişlerdir.

Kasımpatı bitkisinin çoğunlukla apigenin, quersin, asetin ve luteolin içeren ekstraktlarının Ames testinde kullanılan *S. typhimurium* TA1535 ve *S. typhimurium* TA100 suşlarındaki 2-AF, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ve 4-NQO mutajen maddeleri tarafından oluşturulan mutajenik etkiyi önemli derecede düşürdüğü, bu mutajenler tarafından indüklenen SOS tamir mekanizmasını baskıladığı belirtilmiştir (Miyazawa ve Hisama 2003).

Sumak bitkisinin metanol ve etil asetat ekstraksiyonlarının Ames/*Salmonella* testiyle yapılan çalışmada flavonoid içerikli etkisizlerin alfatoksin B1 mutajen maddesinin aktivitesini engellediği gösterilmiştir (Park ve ark. 2004).

Vattem ve arkadaşları (2005), kızılçik bitkisinin meyve suyu ekstresinin içeriği olan fenolik bileşiklerin (rosmarinik asit ve ellagik asit) *Salmonella typhimuriumun* TA100 suşunu kullanarak sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ) ve MNNG mutajenlerine karşı antimutajenik aktivite gösterdikleri ve oksidatif hasara karşı DNA'yı korudukları belirtilmiştir.

Gıda katkı maddesi olarak kullanılan bitki uçucu yağlarından  $\beta$ -mirisin,  $\alpha$ -terpen,  $\alpha$ -pinen ve monoterpenlerin mutajenik etkileri Ames testi ile yapılan bir çalışmada incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre his<sup>+</sup> revertant (geri dönüşen) koloni sayıları, negatif kontrol değerlerinden yüksek bulunmamıştır. Bu nedenle bu maddelerin mutajen olmadığı ifade edilmiştir (Gomes 2005).

Kutlu ve ark. (2006), çalışmalarında ilaç ham maddesi olarak kullanılması düşünülen iki tetrahidrobenzimidazol türevi bileşiğin mutajenik özelliklerini *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda araştırmışlardır. Negatif kontrollerle karşılaştırıldığında bileşiklerin mutajenik özellik göstermediği belirtilmiştir.

Tolan ve arkadaşları (2009), *Hypericum lysimachioides* ekstresininin mutajenik etkisini araştırdıkları çalışmalarında ekstresinin *Salmonella typhimuriumun* TA98 ve TA100 suşları üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik etki gösterdiklerini ancak *Escherichia coli* PQ37 (SOS kromotest) üzerinde mutajenik etki göstermediklerini saptamışlardır.

Yine Tolan ve arkadaşları (2009), *Thymbra spicata* L. var *spicata* uçucu yağının *Salmonella typhimuriumun* TA98 ve TA100 suşları üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda zayıf mutajenik etki gösterdiğini, *Escherichia coli* PQ37 (SOS kromotest) üzerinde mutajenik etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Öncül (2009), bazı gıda boyalarının mutajenik potansiyellerini ve  $\beta$ -galaktozidaz üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada, test edilen gıda boyalarından ponceau 4R, tartrazin, indigotin ve sunset yellow'un *Salmonella*/mikrozom test sistemi ve  $\beta$ -

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

galaktozidaz enzim aktivitesi değişimi yöntemlerine göre mutajenik maddeler olduğunu saptamıştır.

Akın (2010), *Celtis glabrata* Steven ex Planch'ın yaprak, meyve ve çekirdek ekstraktlarını, antimutajenik aktiviteleri yönünden *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile incelemiş ve tüm ekstraktların önemli derecede antimutajenik aktiviteye sahip olduklarını bildirmiştir.

Orhan (2010), Ames/*Salmonella* test sistemi ve Maya delesyon test sistemi (Yeast DEL assay) kullanılarak Doğu Anadolu Bölgesinde yetişen *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitki türünden izole edilen Luteolin-7-O-glukozit, Luteolin-7-O-rutinozit, Luteolin-7-O-glukuronit, Apigenin-7-O- glukozit, Apigenin-7-O-rutinozit ve rozmarinik asit maddelerinin mutajenik ve antimutajenik özellikleri araştırmış ve *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*'nın bazı etken maddelerinin Ames test sisteminde kullanılan *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarında doza bağlı olarak %93'e varan antimutajenik aktivite gözlendiğini, *Saccharomyces cerevisiae* RS112 suşunda ise doza bağlı olarak bazı etken maddelerin %75'e varan oranlarda antimutajenik, mutajenik, komutajenik aktivite gözlendiğini bildirmiştir.

Güllüce ve ark. (2012), Doğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan *Origanum vulgare* L. spp. *vulgare* bitkisine ait metanol, petrol eteri, kloroform, etil asetat, *n*-butanol ve su özütleri ile *n*-butanol özütünden saflaştırılan Luteolin-7-O-glukuronit, Luteolin-7-O-ksilozit, Rozmarinik asit, Litospermik asit ve Litospermik asit B etken maddelerinin mutajenik ve antimutajenik özelliklerini Ames/*Salmonella* ve *E. coli* WP2 kısa zamanlı test sistemleri kullanarak araştırmıştır. Bitki özütleri ve etken maddelerin uygulanan konsantrasyonlarda mutajenik etki göstermediğini, buna karşın özütlerin bazı konsantrasyonlarının bazı pozitif mutajenlere karşı çeşitli oranlarda antimutajenik etki gösterdiğini belirlemiştir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitkisel Materyal

*Ajuga vestita* BOISS. Diyarbakır'ın Ergani ilçesi Hilar Mağaraları civarından *Ajuga xylorrhiza* KIT TAN Diyarbakır'ın Çermik ilçesinden 19.05.2011 tarihinde toplanmış ve Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN tarafından teşhis edilmiştir. *A. vestita* örnekleri ASE2005-126 (DUF) kodu *A. xylorrhiza* ASE2005-318 (DUF) kodu ile Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda saklanmaktadır.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

$\beta$ -karoten, linoleik asit, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), Tween-40, bakır klorür, neokuproin, ferrozin, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS), asetilkolinesteraz (AChE), bütirikolinesteraz (BChE), kersetin, pirokatekol, kateşin,  $\alpha$ - tokoferol, galantamin hidrobromür, magnezyum sülfat, sitrik asit monohidrat, D-biyotin, sodyum klorür, potasyum klorür, magnezyum klorür, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP), glukoz-6-fosfat, S9 (memeli karaciğer özütü), ampisilin trihidrat, sodyum hidroksit, D-glukoz, gallik asit Sigma firmasından, sodyum karbonat, amonyum asetat, sodyum hidrojen fosfat Riedel-de-Haen firmasından, Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR), asetil tiyokolin iyodür (AcI), 5,5-ditiyobis(2-nitro benzoik asit) (DTNB), Applichem firmasından, potasyum asetat, potasyum peroksi disülfat ( $K_2S_2O_8$ ), sodyum bikarbonat, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, 2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen (BHT), askorbik asit, sodyum amonyum fosfat, potasyum fosfat, L-histidin, kristal violet, sodyum azid, nutrient agar, nutrient broth, petrol eteri, aseton, metanol, etanol Merck firmasından, alüminyum nitrat Carlo-Erba firmasından, demir klorür, , bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), butiril tiyokolin iyodür (BcI), 2-aminofloren Fluka firmasından, baktö agar Difco firmasından temin edilmiştir.



#### 3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Steril Kabin ( Telstar AV-100)

Spektrofotometre (UV mini 1240 SHIMADZU)

Etüv ( Heraus )

Magnetik Karıştırıcı ( Stuart )

Deep-Freeze ( Harris, -95 °C )

Vorteks ( VWR International )

Çalkalayıcı ( Selecta )

İnkübatör ( Sanyo )

Hassas Terazı ( Avery )

Otoklav (Hiclave HV-50L)

Sterilizatör ( Heraus )

Rotaevaporator ( Büchi )

pH-metre ( Thermo )

Powerwave XS mikroplate spektrofotometre ( BioTek )

Ultra saf su cihazı (Younglin Instrument, aquaMAX-Ultra)

Elma S15 ultrasonic bath

Otomatik pipetler (20-200 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl) (Eppendorf)

#### 3.1.4. Kullanılan Bakteri Suşları

Antimikrobiyal aktivite belirlemede kullanılacak olan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Candida albicans* ATCC 10231 suşları Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden (Ankara, TÜRKİYE), *Salmonella*/mikrozom test sisteminde kullanılan *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları *Salmonella* Genetik Stok Merkezi'nden (SGSC) (Calgary, Kanada) temin edilmiştir.

### 3.1.5. Besi Ortamları, Çözelti ve Tamponlar

#### 3.1.5.1. Antimikrobiyal Aktivite Belirlemede Kullanılan Besi Ortamları

Sıvı besiyerleri hazırlamak için 25 g nutrient broth distile su ile 1000 ml'ye tamamlanırken, katı besiyerleri hazırlamak için 20 g nutrient agar distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp 121°C basınçta 20 dakika otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuştur.

#### 3.1.5.2. Toplam Fenolik Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

% 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 ml'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar distile su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra distile su ile hacmine tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + CuSO<sub>4</sub>): Satın alındığı şekilde kullanıldı.

#### 3.1.5.3. Toplam Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

% 10'luk Alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması: 17.6 g Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O 100 ml'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar distile su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra distile su ile hacmine tamamlandı.

1 M Potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması: 9.6150 g CH<sub>3</sub>COOK 100 ml'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar distile su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra distile su ile hacmine tamamlandı.

#### 3.1.5.4. Antioksidan Aktivite Belirlemede Kullanılan Çözeltiler

- ***β*-Karoten Renk Açılım Yönteminde Kullanılan Çözelti**

*β*-Karoten reaktifinin hazırlanması: 0.2 mg *β*-Karoten 1 ml kloroformda çözümlenerek bir balona aktarıldı. Üzerine 200 µl Tween-40 ve 20 µl linoleik asitten ilave edilip karıştırıldı. Vakum altında kloroform uçurulduktan sonra üzerine daha önceden oksijen ile doyurulmuş 50 ml su ilave edildi ve kuvvetlice çalkalandı.

- **DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yönteminde Kullanılan Çözelti**

0.1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH tartılarak 100 ml metil alkolde çözüldü.

- **ABTS Yönteminde (Kasyon Radikali Giderim Aktivitesi) Kullanılan Çözelti**

7 mM ABTS kasyon radikalinin hazırlanması: 19.2 mg ABTS tartılarak 5 ml suda çözüldü. Üzerine toz halinde 3.3 mg potasyum peroksi disülfat ( $K_2S_2O_8$ ) eklenip karıştırıldı. Karanlıkta oda sıcaklığında 12-16 saat beklendi. Bekleme süresi sonunda çözelti kullanılmaya başlamadan önce absorpsiyonu  $\sim 0.70$  olacak şekilde seyreltildi.

- **CUPRAC Yönteminde (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Kullanılan Çözeltiler**

Bakır (II) klorür dihidrat çözeltisinin hazırlanması: 42.62 mg  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  tartılarak 25 ml suda çözüldü.

Amonyum asetat tamponunun hazırlanması: 1.927 g  $NH_4OAc$  tartılarak 25 ml suda çözüldü, pH= 7'ye ayarlandı.

Neokuproin çözeltisinin hazırlanması: 76.6 mg neokuproin tartılarak 50 ml %96'lık alkolde çözüldü.

- **Standart Çözeltilerinin Hazırlanması**

Kersetin çözeltisinin hazırlanması: 25.8 mg kersetin 25 ml etil alkolde çözülerek 1000 ppm'lik konsantrasyonda kersetin çözeltisi hazırlandı.

Pirokatekol çözeltisinin hazırlanması: 10 mg pirokatekol 100 ml su ile çözülerek 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlandı.

BHT (2,6-di-*t*-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisinin hazırlanması: 10 mg BHT 10 ml etanol içide çözülerek 1000 ppm'lik BHT çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 50 000 ppm'lik çözelti de hazırlandı.

BHA (2- *t*-bütil-4-hidroksianisol) çözeltisinin hazırlanması: 10 mg BHA 10 ml etanolde çözülerek 1000 ppm'lik BHA çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 50 000 ppm'lik çözelti de hazırlandı.

$\alpha$ -Tokoferol çözeltisinin hazırlanması: %97'lik 10.31 mg  $\alpha$ -tokoferol 10 ml etanolde çözülerek 1000 ppm'lik  $\alpha$ -tokoferol çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 50 000 ppm'lik çözelti de hazırlandı.

Kateşin çözeltisinin hazırlanması: 10 mg kateşin 10 ml etanolde çözülerek 1000 ppm'lik kateşin çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 50 000 ppm'lik çözelti de hazırlandı.

Gallik asit çözeltisinin hazırlanması: 47 mg gallik asit 10 ml etanolde çözülerek 2500 ppm'lik gallik asit çözeltisi hazırlanmış olur.

### **3.1.5.5. Antikolinesteraz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

0.1 M  $H_2PO_4^-$  çözeltisinin hazırlanması: 1.56 g  $H_2PO_4^-$  tartılıp 100 ml distile suda çözüldü.

0.1 M  $HPO_4^{2-}$  çözeltisinin hazırlanması: 3.556 g  $HPO_4^{2-}$  tartılıp 200 ml distile suda çözüldü.

0.1 M pH=8 tampon çözeltisinin hazırlanması: 94.7 ml  $HPO_4^{2-}$  ve 5.3 ml  $H_2PO_4^-$  çözeltilerinden alındıktan sonra 100 ml distile su eklenerek hazırlandı.

0.1 M pH=7 tampon çözeltisinin hazırlanması: 3.9 ml  $H_2PO_4^-$  ve 6.1 ml  $HPO_4^{2-}$  çözeltilerinden alınarak 10 ml distile su eklenerek hazırlandı.

DTNB çözeltisinin hazırlanması: 16 mg DTNB 1 ml pH=7 tampon çözeltisinde ve 7.5 mg  $NaHCO_3$  1 ml pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra iki çözelti karıştırıldı. Hazırlanan bu çözelti karışımı, 2 ml pH=7 tampon çözeltisi ile 4 ml'ye tamamlandı. Kullanma aşamasında 4 ml pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi.

Asetil tiyokolin iyodür (AcI): 32.8 mg AcI alınarak, 8 ml distile su eklendi. Kullanma aşamasında 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 ml'ye tamamlandı.

Butiril tiyokolin iyodür (BuI): 4 mg BuI alınarak, 8 ml distile su eklendi. Kullanma aşamasında 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 ml'ye tamamlandı.

Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimleri: 1.17 mg AChE enzimi alınarak 5 ml pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 1'er ml'lik beş bölüme ayrıldı. Her biri için 0.235 mg/ml'lik konsantrasyon sağlanmış olur. 8 ml distile su eklenmesi sonucu 125  $\mu$ l'lik enzim çözeltileri elde edildi. Her bir 125  $\mu$ l'lik örnekte 0.02925 mg enzim bulunur. 125  $\mu$ l'lik enzim çözeltisine 460  $\mu$ l pH=8 tampon çözeltisi eklendi. 585  $\mu$ l çözelti 25  $\mu$ l'ik 23 küçük şişelere doldurulup ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 3000  $\mu$ l'ye tamamlanır.

### 3. MATERYAL ve METOT

---

Butirilkolinesteraz (BChE) Enzimleri: 1 mg BChE enzimi alınarak 5 ml pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü. Bu çözeltiden 300 µl'lik stoklar oluşturulup küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1800 µl pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirilir.

#### 3.1.5.6. Ames Salmonella/Mikrozom Test Sisteminde Kullanılan Bakteri Besi Ortamları ve Stok Çözeltiler

**Vogel-Bonner-E Ortamı (50×VB tuzları):** Minimal glukoz agarda (MGA) kullanılmak üzere hazırlandı.

	<u>1000 ml için</u>
Distile su (45°C)	670 ml
Magnezyum sülfat (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	10 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	500 g
Sodyum amonyum fosfat (NaH <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O)	175 g

Tuzlar distile suya sırasıyla ilave edilerek otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilizasyona tabi tutuldu.

**0.5 mM Histidin/Biyotin Çözeltisi:** Mutajenite/antimutajenite deneylerinde kullanılmak üzere hazırlandı. 100 ml'lik yumuşak agara 10 ml eklendi.

	<u>250 ml için</u>
D-biyotin (MA: 247.3)	30.9 mg
L-histidin-HCl (MA:191.7)	24.0 mg
Distile su	250 ml

Su kaynama derecesine kadar ısıtılarak biyotin çözüldü. Otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilizasyona tabi tutularak 4 °C 'de muhafaza edildi.

**Yumuşak (üst) Agar:**100 ml için

Agar	0.6 g
Sodyum klorür	0.5 g
Distile su	100 ml

Çözelti otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilizasyona tabi tutuldu.

**Ampisilin Çözeltisi (8 mg/ml):** Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolünde, R faktör plazmidi taşıyan suşların master plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

100 ml için

Ampisilin trihidrat	0.8 g
Sodyum hidroksit (0.02 N)	100 ml

**Kristal Viyole Çözeltisi:** Suşların rfa mutasyonunu kontrol amacıyla kullanıldı.

100 ml için

Kristal viyole	0.1 g
Distile su	100 ml

### 3. MATERYAL ve METOT

---

**Tuz Çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M MgCl<sub>2</sub>):** S9 fraksiyonu karışımında kullanıldı.

500 ml için

Potasyum klorür (KCl)	61.5 g
Magnezyum klorür (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	40.7 g

Distile suyla son hacim 500 ml'ye tamamlanarak otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilizasyona tabi tutuldu.

**0.2 M Sodyum Fosfat Tamponu pH 7.4:** S9 fraksiyonu karışımında kullanıldı.

500 ml için

0.2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O)	60 ml
0.2 M Disodyum dihidrojen fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	440 ml

Çözelti pH=7'ye ayarlanarak otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilizasyona tabi tutuldu.

**0.1 M β-NADP (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) Çözeltisi:**

S9 fraksiyonu karışımında kullanıldı.

5 ml için

β-NADP (MA: 765.4)	383 mg
Steril distile su	5 ml

Kullanılmadan kısa süre önce kuru buz üzerinde taze olarak hazırlandı.

**1 M Glukoz-6-Fosfat Çözeltisi:** S9 fraksiyonu karışımında kullanıldı.

	<u>10 ml için</u>
Glukoz-6-fosfat	2.82 g
Steril distile su	10 ml

**S9 Fraksiyonu Karışımı (Rat Karaciğeri Mikrozomal Enzimleri ve Kofaktörler):** Mutajenite deneylerinde kullanılmak üzere hazırlandı.

	<u>50 ml için</u>
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml
MgCl <sub>2</sub> -KCl tuz çözeltisi	1 ml
1 M glukoz-6-fosfat	0.25 ml
0.1 M β-NADP	2 ml
0.2 M fosfat tamponu	25 ml
Steril distile su	9.75 ml

Karışım kuru buz üzerinde kullanılmadan kısa süre önce taze olarak hazırlandı.

**Minimal Glukoz Agarlı Ortam (MGA):** Mutajenite/antimutajenite deneylerinde kullanılmak üzere hazırlandı.

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
Distile su	930 ml
50×VB çözeltisi	20 ml
Glukoz (%40'lık)	50 ml



### 3. MATERYAL ve METOT

---

15 g agar erlene konduktan sonra 930 ml distile su ilave edildi, karıştırıldı ve 20 dk 120 °C' de otoklavlandı. Daha önce otoklavlanmış steril tuz çözeltisi (50X VB) ve %40'lık glukoz çözeltisi agara ilave edildi, karıştırılıp petrilere döküldü.

**Histidin/Biyotin İçeren Katı Besiyerleri:** Suşların histidin gereksinimi kontrolü amacıyla hazırlandı.

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
Distile su	914 ml
50×VB tuz çözeltisi	20 ml
%40'lık glukoz	50 ml
Steril Histidin-HCl. H <sub>2</sub> O (400 ml H <sub>2</sub> O için 2 g )	10 ml
Steril Biyotin (0.5mM)	6 ml

15 g agar erlene konduktan sonra 914 ml distile su ilave edildi, karıştırıldı ve 20 dk 120 °C' de otoklavlandı. Daha önce otoklavlanmış steril tuz çözeltisi (50X VB), %40'lık glukoz çözeltisi, histidin ve biyotin agara ilave edilerek karıştırılıp petrilere döküldü.

**Sıvı Besi Yeri (Nutrient Broth):** Bakterileri üretmek amacıyla kullanıldı.

	<u>1000 ml için</u>
Oxoid nutrient broth No:2	25 g
Distile su	1000 ml

Karışım otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilizasyona tabi tutuldu.

**Nutrient Agarlı Besi Yeri:** Test suşlarının kristal viyole ve UV'ye duyarlılık özelliklerinin test edilmesi ve sitotostik etkinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

	<u>1000ml için</u>
Oxoid broth No:2	25 g
Difco bacto agar	15 g
Distile su	1000 ml

Karışım otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilizasyona tabi tutuldu.

**Pozitif Mutajenler :** TA98 test suşu için 2-Aminofluoren (S9 varlığında) ve Daunomycine (S9 yokluğunda), TA100 test suşu için Sodyum azid (S9 varlığında ve yokluğunda) pozitif mutajen olarak kullanılmıştır.

	<u>100 ml için</u>		<u>100 ml için</u>
2-Aminofluoren	10 mg	Sodyum Azid	1.5 mg
DMSO	100 ml	Distile su	100 ml

	<u>100 ml için</u>
Daunomycin	0.6 mg
Distile su	100 ml

#### 3.2. Metot

##### 3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

Doğal ortamından toplanan *A. vestita* ve *A. xylorrhiza*'nın toprak üstü kısımları gölgede kurutulup öğütüldükten sonra önce petrol eteri (3x24 saat), sonra aseton (5x24 saat) ve en son metanol (6x24 saat) ile oda sıcaklığında ara sıra çalkalanarak masere edildi. Çalışmada kolaylık sağlamak adına *A. vestita* petrol eteri ekstresi AVP, *A. vestita* aseton ekstresi AVA, *A. vestita* metanol ekstresi AVM, *A. xylorrhiza* petrol eteri ekstresi AXP, *A. xylorrhiza* aseton ekstresi AXA, *A. xylorrhiza* metanol ekstresi AXM olarak kodlanıp +4 °C'de muhafaza edildi.

##### 3.2.2. Ekstrelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için Disk Difüzyon yöntemi uygulanmıştır (NCCLS 1997). Taze kültürden öze ile alınan mikroorganizmalar nutrient broth (NB) sıvı besi yerinde 0.5 Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  Kob/ml) türbidite oluşana kadar 37 °C'de inkübe edildi. Türbidite kontrolü spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda absorbansları 0.08-0.10 olacak şekilde yapıldı. Kültürü hazırlanan test mikroorganizmalarından 100 µl alınarak nutrient agar katı besi yerine yayma ekim yapıldı. Ardından DMSO'da hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki (10, 20, 40 mg/ml) bitki ekstraları emdirilmiş steril diskler ekim yapılan petrilere yerleştirildi. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes* bakterileri için 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon, *Candida albicans* için 30 °C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Aynı işlem pozitif (imipenem (10 µg), vankomisin (30 µg), eritromisin (15 µg), Nystatin (30 µg)) ve negatif kontrol (DMSO) için de tekrarlandı. Her test farklı zamanlarda 3 tekrar halinde gerçekleştirildi.

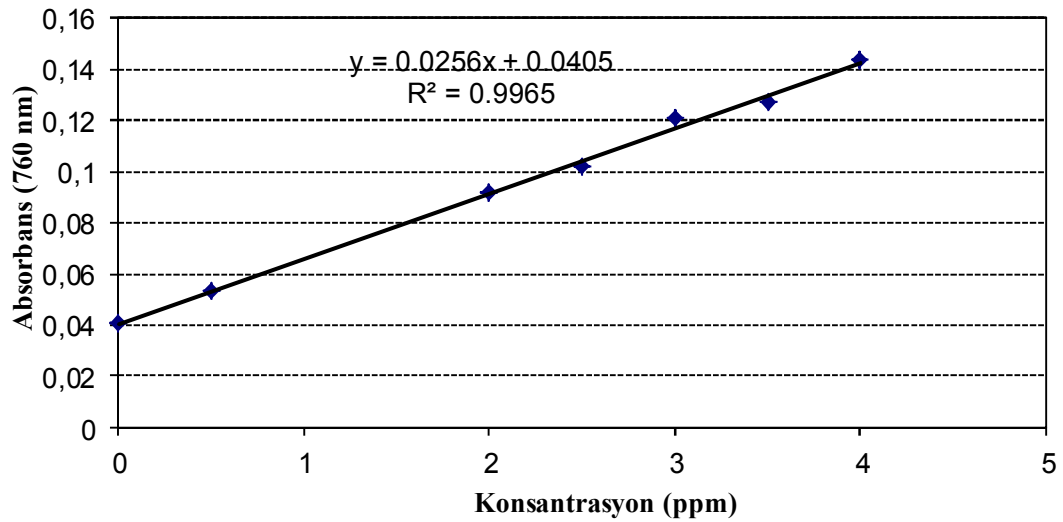
##### 3.2.3. Ekstrelerin Toplam Fenolik Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton 1977). 4 µl FCR'ye etanolde hazırlanmış 1000 ppm konsantrasyondaki bitki ekstralarından 4 µl ve son hacmi 200 µl'ye tamamlamak için 180 µl distile su eklenerek 3 dakika inkübasyona

bırakıldı. Ardından 12 µl %2 lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Farklı konsantrasyonlardaki pirokatekol çözeltileri için de aynı işlem uygulanarak inkübasyon sonrasında 760 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alındı. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden (Şekil 3.1.) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

$$\text{Absorbans} = 0.0256 \text{ pirokatekol } (\mu\text{g}) + 0.0405$$

$$(R^2 = 0.9965)$$

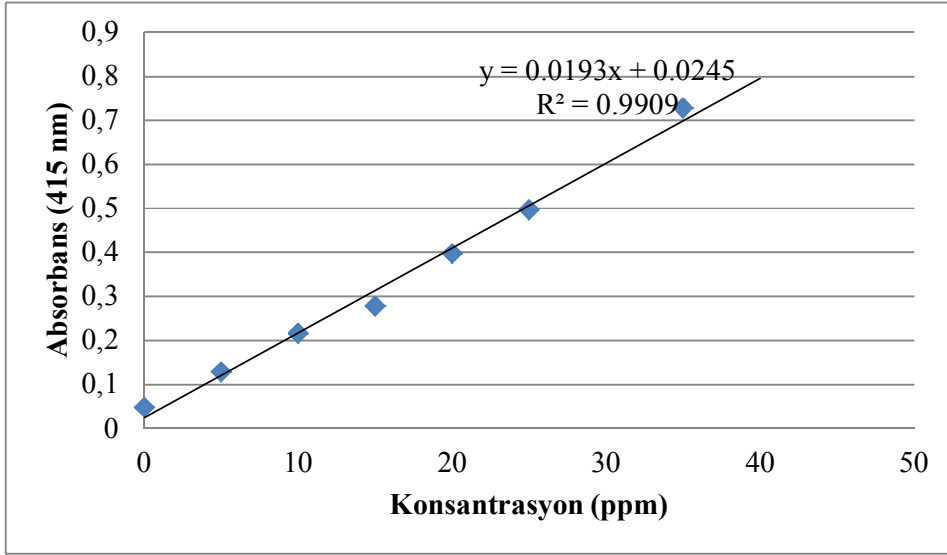


Şekil 3.1. Pirokatekol ölçü grafiği

#### 3.2.4. Ekstrelerin Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi (Moreno ve ark. 2000). 4 µl 1 M potasyum asetat çözeltilisine etanolde hazırlanmış 1000 ppm konsantrasyondaki bitki ekstrelerinden 20 µl ve son hacmi 200 µl'ye tamamlamak için 172 µl %80'lik etanol eklenerek 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 4 µl %10'luk Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> eklenerek oda sıcaklığında 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Farklı konsantrasyonlardaki kesretin çözeltileri için de aynı işlem uygulanarak inkübasyon sonrasında 415 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alındı. Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları standart kersetin grafiğinden (Şekil 3.2.) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

$$\text{Absorbans} = 0.0193 \text{ kersetin } (\mu\text{g}) + 0.0245 \text{ (R}^2 = 0,9909\text{)}$$



Şekil 3.2. Kersetin ölçü grafiği

#### 3.2.5. Ekstrelerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlemesi

##### 3.2.5.1. $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yöntemi

Toplam antioksidan aktivite, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan  $\beta$ -karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlendi (Miller 1971). Bu yöntem,  $\beta$ -karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. 1 mg  $\beta$ -karoten bir miktar kloroformda çözülüp üzerine 100  $\mu$ l Tween 40 eklendi. Evaporatör yardımıyla kloroform uzaklaştırılıp üzerine 200  $\mu$ l oksijenle doyurulmuş su ilave edildi. 10 dakika kuvvetlice çalkalanarak emülsiyon sistem hazırlanmış oldu. Bu testte pozitif kontrol olarak BHT, BHA ve  $\alpha$ -tokoferol kullanıldı. Pozitif kontroller ve örneklerden stok çözeltiler hazırlanarak bu stok çözelti üzerinden farklı konsantrasyonlarda örnekler hazırlandı. Farklı konsantrasyonlardaki örneklerden 40  $\mu$ l alınarak üzerine 160  $\mu$ l emülsiyon sistemden eklendi ve 490 nm dalga boyunda başlangıç (t=0) absorbansları alındı. 50 °C'de 120 dakika inkübasyona bırakılarak sonrasında tekrar absorbansları alındı (t=120 dk). Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi.  $\beta$ -Karotenin renk açılım oranı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$R = \ln (a/b)/t$$

In: Doğal logaritma, a: Başlangıç absorbansı, b: Inkübasyonundan sonraki absorbans

t: Zaman (dakika)

Toplam antioksidan aktivite, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Antioksidan Aktivite (\%İnhibisyon)} = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100$$

$R_{\text{kontrol}}$  kontrolün renginin açılma hızı ve  $R_{\text{örnek}}$  örneğin renginin açılma hızıdır.

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

### 3.2.5.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

Ekstrelerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Blois 1958). 160 µl %0.004 metanol DPPH çözeltisine metanolde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstrelerinden 40 µl eklenerek karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Ardından 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alındı. Aynı işlem pozitif kontrol olarak kullanılan BHT, BHA ve  $\alpha$ - tokoferol için de uygulandı. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine yerleştirilerek inhibisyon yüzdesi (%I) hesaplandı.

$$\%I = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}/A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

$A_{\text{kontrol}}$  kontrol tüpünün (test bileşikleri dışında tüm ayıraçları içeren tüp) absorbans değerini,  $A_{\text{örnek}}$  ise her bir konsantrasyon için hazırlanan tüpün absorbans değerini ifade etmektedir. Her test farklı zamanlarda 3 tekrar halinde gerçekleştirildi.

### 3.2.5.3. ABTS (Kasyon Radikali Giderim Aktivitesi) Yöntemi

Ekstrelerin ABTS kasyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi (Re ve ark. 1999). ABTS,  $K_2S_2O_8$ ,  $MnO_2$ ,  $H_2O_2$  gibi güçlü yükseltgenler ile tepkimeye sokulup  $ABTS^{++}$  oluşturulur. 7 mM 5 ml ABTS çözeltisi üzerine 3.3 mg  $K_2S_2O_8$  eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 16 saat bekletildi. Ardından 734 nm dalga boyunda absorbansı

0.7 olacak şekilde etanol ile seyreltildi. 160 µl ABTS<sup>+</sup> reaktifine 40 µl farklı konsantrasyonlardaki örneklerden eklenerek karanlıkta bekletildi. 6, 15 ve 30 dakikalarda 734 nm dalga boyunda ölçüm alındı. Örneklerin absorban değerleri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT, BHA ve kateşin kullanıldı.

#### **3.2.5.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)**

CUPRAC yönteminde, örneklerdeki antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenir ve bu kelatın 450 nm dalga boyunda absorbanı ölçülür (Apak ve ark. 2004). 67 µl örnek üzerine 61 µl CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, neokuprin ve amonyum asetat tamponu eklendi ve 1 saat sonra 450 nm dalga boyunda absorban ölçüldü. Örneklerin absorban değerleri kontrole karşı değerlendirildi.

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA, α-tokoferol kullanıldı.

#### **3.2.6. Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu olarak (Ellman ve ark. 1961) bilinen spektrofotometrik yöntem temel alınarak ölçüldü (Kıvrak ve ark. 2009). Enzim olarak elektrik balığından elde edilen asetilkolinesteraz ve at serumundan elde edilen bütirikolinesteraz enzimleri, substrat olarak asetil tiyokolin iyodür ve butiril tiyokolin iyodür kullanıldı. Aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanıldı. Kontrol olarak etanol, standart olarak ise galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanıldı.

### 3.2.6.1. AChE % İnhibisyon Testi

130 µl 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (pH=8) üzerine 200 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmış olan örneklerden 10 µl ve AChE enzim çözeltisinden 20 µl konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 20 µl DTNB reaktifi ve 20 µl AcI ilave edildi.

### 3.2.6.2. BChE % İnhibisyon Testi

130 µl 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (pH=8) üzerine 200 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmış olan örneklerden 10 µl ve BChE enzim çözeltisinden 20 µl konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 20 µl DTNB reaktifi ve 20 µl BcI ilave edildi. Aynı işlem standart olarak kullanılan galantamin için de uygulandı.

Substratların (AcI ve BcI) hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlendi. Antikolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\%I = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}/A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

### 3.2.7. Ames *Salmonella*/Mikrozom Mutajenite ve Antimutajenite Testleri

#### 3.2.7.1. Test Suşlarının Üretilmesi

*Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 test suşları liyofilize olarak temin edilmiştir. Aseptik koşullarda kültürü sulandırmak için 1 ml nutrient broth eklenmiştir. Daha sonra, sulandırılmış kültür 4 ml nutrient buyyon içerisine transfer edilmiştir. Sulandırılmış kültürün bir damlası alınarak nutrient agarlı plaklara tek koloni ekimi yapılmıştır. Suşların genetik özelliklerinin kontrolü yapılanaya kadar tek koloni düşürülen plaklar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2.7.2. Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü

Mutasyon testlerinde test maddesinin mutant suşu, atasal suş tipine döndürme gücü ölçüldüğü için, suşun genotip bakımından mutant karakterlere sahip olup olmadığını kontrol edilmesi, testin güvenilirliği açısından gereklidir. Ames



*Salmonella*/Mikrozom mutajenite testinde kullanılan *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 bakteri suşlarının genetik özelliklerinin kontrolü çalışmalar öncesinde aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

**Histidin Gereksinimi Kontrolü:** Test suşları, histidin okzotrofu olduklarından histidini sentez edememektedirler. Besin eksikliğinde veya mutajenik kimyasallar varlığında üreyemezler. Ortama konan az miktardaki histidin çözeltisi bakterinin bir ya da iki kez bölünmesine olanak sağlar. Suşlar; *uvrB* delesyonu nedeniyle histidine ek olarak biyotine de gereksinim duydukları için histidin/biyotin içeren ve histidin içermeyen minimal glukoz agar plaklarına ekilerek üreme yetenekleri kontrol edildi. Suşların histidin varlığında üreyip, histidin yokluğunda ürememeleri, his<sup>-</sup> karakterini doğrulamaktadır (Maron ve Ames 1983, Mortelmans ve Zeiger 2000).

**R Faktörünün Kontrolü:** Ampisilin içeren nutrient agara ekim yapılarak R faktörü test edilmiştir. Suşların plakta üremesi ampisilin dirençliliği göstermektedir.

**Rfa Mutasyonu Kontrolü:** Test suşlarının gecelik kültüründen alınan 0.1 ml'lik örnekler, Nutrient agarlı petrilere yayma ekim yöntemiyle ekildi. 10 µl kristal viyole çözeltisi (1mg/ml) emdirilmiş steril hazır boş diskler, petrilere yerleştirilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu büyük molekülü kristal viyole çözeltisinin bakteri içerisine girip, onu öldürmesine izin veren rfa mutasyonunun varlığının göstergesidir (Ames ve ark. 1973b).

***uvrB* Mutasyonu Kontrolü:** Bu mutasyonun varlığı ultraviyole ışınlarına duyarlılık testi ile ölçüldü. Tek koloni düşürülen test suşları, steril kürdanla alınarak nutrient agarlı plağa çizgi ekim yöntemi ile ekildi. Plagın kapağı açılıp 30 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 saniye süre ile ışınlandı. UV'ye maruz bırakılan plak 37 °C'de bir gece inkübe edildi. *uvrB* delesyonu taşıyan suşların UV ile ışınlanmış plakta üremediği gözlemlendi (Ames ve ark. 1973a).

**Kendiliğinden Geri Dönen Koloni Sayısının Kontrolü:** Test suşlarının, histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geriye dönüş, mutajenite/antimutajenite deneylerinde rutin olarak ölçülür ve her plakta kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısı olarak ifade edilir. Söz konusu kendiliğinden geriye dönüş her suş için belirli limitler içinde olmaktadır. (TA98 için 20-50 revertant / plak, TA100

için 80-200 revertant / plak). Bu bakterilerin kolonileri, oksotrofik mutant bakterilerin geliştiği bir besi yerinde kolayca gözlenebilir.

Kendiliğinden geriye dönüş frekansını saptayabilmek için minimal glukoz agar plakları hazırlandı. 50 °C'de 2 ml yumuşak agara 0.1 ml gecelik bakteri kültürü, 0.1 ml 0.5 mM histidin/biyotin çözeltisi eklenerek karışım MGA plağının yüzeyine yayıldı. 37 °C'de 48-72 saat arası inkübasyondan sonra geriye dönen kolonilerin sayımı yapıldı.

### 3.2.7.3. Test Suşlarının Saklanması

#### • Master Plaklarının Hazırlanması

Bakteri suşlarının +4 °C'de iki ay süreyle saklanabilmesi için master plaklar hazırlanmıştır. Master plakların hazırlanması genetik özelliklerin kontrolü ile eş zamanlı olarak yapıldı. Her bir özelliğin kontrolü için hazırlanan seçici besi yeri içeren plaklara tek koloni düşürülen test suşlarından steril kürdan ile sırasıyla MGA, MGA+histidin/biyotin, ampicilinli nutrient agar ve iki adet nutrient agar (UV ve master plak için) plağına aynı koloniden çizgi ekim yapıldı. Her biri ayrı bir genetik özelliği test edecek olan plaklar 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında genetik özelliklerin tümünü taşıyan koloniler master plakta işaretlendi ve kültür hazırlamada kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi.

#### • Dondurulmuş Örneklerin Hazırlanması

Genetik işaretleri doğrulanan test suşlarının, genetik işaretleri korunarak, uzun süre saklanabilmesi için dondurulmuş örnekler hazırlanmıştır. Bunun için, test suşları öncelikle nutrient broth besi yerinde  $1-2 \cdot 10^9$  bakteri / ml olacak şekilde üretilmişlerdir. 1 ml bakteri kültürlerine 0.09 ml spektrofotometrik saflıkta dimetil sülfoksit (DMSO) eklenip yavaşça karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış kültürler, aseptik koşullarda 2 ml'lik plastik tüplere dağıtılmıştır. Tüpler hemen kuru buz üzerine yerleştirilerek dondurulduktan sonra -80 °C'lik derin dondurucuya kaldırılmıştır. Test suşlarının genetik işaretleri kaybolmaksızın bu şekilde 3 yıl muhafaza edilebildiği bildirilmektedir (Maron ve Ames 1983).

#### 3.2.7.4. Pozitif ve Negatif Kontroller

Bakterilerin bilinen standart mutajenlere karşı tepkilerini saptamak için belirlenmiş bir mutajen, pozitif kontrol amacıyla esas denemeye paralel olarak yapıldı. *Salmonella typhimurium* TA98 suşu için indirekt mutajen olan, 2-aminofluren S9 karışımı varlığında ve direkt mutajen olan dounomycine S9 karışımı yokluğunda kullanıldı. *Salmonella typhimurium* TA100 için direkt mutajen olarak S9 karışımı varlığında ve yokluğunda sodyum azid kullanıldı (Maron ve Ames 1983).

Bitki ekstraları ve mutajen maddeleri çözmek için kullanılan DMSO'nun her iki bakteri suşu üzerine etkisi olup olmadığını kontrol etmek amacı ile esas denemeye paralel olarak yapıldı.

#### 3.2.7.5. Mutajenite Testi

Ames *Salmonella*/mikrozom test sistemini çalışırken 'standart plate incorporation' yöntemi kullanıldı. Bu teknikte; S9 varlığında ve yokluğunda olmak üzere iki farklı deney yapıldı.

*Salmonella typhimurium* standart test suşları ile yapılan mutajenite/antimutajenite çalışmalarında, bakteri kültürünün bir ml'sinde  $1-2 \times 10^9$  Koloni Oluşturan Birim (kob) olması öngörülmektedir.

Deney için öncelikle gecelik kültür hazırlandı. Master plaktan öze ile alınan koloni 40 ml'lik sıvı besi yerine ekilerek 37 °C'de 120 rpm'de 11-13 saat çalkalayıcıda üremeye bırakıldı ( $1-2 \times 10^9$  kob/ml,  $OD_{540}=0.1-0.2$ ).

S9 yokluğunda yapılan deneylerde, önceden sıcak su banyosunda sıvı hale getirilip sıcaklığı 45-50 °C'ye ayarlanan 100 ml yumuşak agara 10 ml 0.5 mM Histidin/biyotin çözeltisi eklenerek 2'şer ml  $13 \times 100$  mm'lik steril cam tüplere dağıtıldı. Ardından tüplere 0.1 ml bakteri kültürü ve 0.1 test bileşiği (farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraları) eklenerek 3 saniye düşük devirde vortekslendikten sonra oda sıcaklığındaki MGA içeren plaklara yayıldı. Yumuşak agarın donmadan, plağın tüm yüzeyine yayılmasını sağlamak için karıştırma-dökme-yayma işlemi 20 saniyeyi geçmeyecek şekilde yapılmıştır. Pozitif ve negatif kontrollere de aynı işlem uygulandı.

S9 varlığında yapılan deneylerde de aynı şekilde, önceden sıcak su banyosunda sıvı hale getirilip sıcaklığı 45-50 °C'ye ayarlanan 100 ml yumuşak agara 10 ml 0.5 mM

Histidin/biyotin çözeltisi eklenerek 2'şer ml 13×100 mm'lik steril cam tüplere dağıtıldı. Ardından tüplere 0.1 ml bakteri kültürü, 0.5 ml S9 karışımı ve 0.1 ml test bileşiği (farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraları) eklenerek 3 saniye düşük devirde vortekslendikten sonra oda sıcaklığındaki MGA içeren plaklara yayıldı. Pozitif ve negatif kontrollere de aynı işlem uygulandı. Plaklar 48-72 saat arası 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında oluşan koloni sayısı kaydedildi. Her doz paralel üç plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda üç bağımsız deney yapılmıştır.

### 3.2.7.6. Antimutajenite Testi

Antimutajenite deneyleri *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile S9 yokluğunda gerçekleştirildi.

Antimutajenite deneylerinde, mutajenite testinde açıklandığı şekilde öncelikle gecelik kültür hazırlandı. Sıcak su banyosunda sıvı hale getirilip sıcaklığı 45-50 °C'ye ayarlanan 100 ml yumuşak agara 10 ml 0.5 mM Histidin/biyotin çözeltisi eklenerek 2'şer ml 13×100 mm'lik steril cam tüplere dağıtıldı. Ardından tüplere 0.1 ml bakteri kültürü, 0.1 ml pozitif mutajen (TA98 için dounomycine, TA100 için sodyum azid) ve 0.1 ml test bileşiği (farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraları) eklenerek 3 saniye düşük devirde vortekslendikten sonra oda sıcaklığındaki MGA içeren plaklara yayıldı. Plaklar 48-72 saat arası 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında oluşan koloni sayısı kaydedildi. Her doz paralel üç plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda üç bağımsız deney yapılmıştır. Koloni sayısındaki düşüş inhibisyon yüzdesi olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%I = (1 - (a-b)/(c-b)) \times 100$$

a: Denenen dozdaki koloni sayısı (test bileşiği+bakteri suşu+pozitif mutajen)

b: Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı (sadece bakteri suşu)

c: Pozitif mutajen uygulanan plaktaki koloni sayısı (bakteri suşu+pozitif mutajen)

### 3.2.8. Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada yapılan tüm testler paralel üç tekrar halinde çalışılmış ve sonuçlar bu tekrarların ortalaması ± standart sapması olarak verilmiştir.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.'de *A. vestita* ve *A. xylorrhiza* bitkilerinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının disk difüzyon yöntemine göre yapılan antimikrobiyal aktivite sonuçları üç paralel testin inhibisyon zon çapı ölçümünün ortalama ve standart sapması olarak verilmiştir.

AVP, çalışılan tüm mikroorganizmalar üzerinde aktivite göstermezken, AVA ve AVM farklı konsantrasyonlarda bazı mikroorganizmalar üzerinde orta ve düşük derecede aktivite göstermiştir. Çalışılan mikroorganizmalar arasında *Ajuga vestita* ekstralarına karşı en duyarlı mikroorganizmanın *S. pyogenes* olduğu görülmektedir. AVA ve AVM, *S. pyogenes*'e karşı orta derecede antimikrobiyal aktivite gösterirken (inhibisyon zonu <20-12 mm), *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda düşük aktivite göstermiştir (inhibisyon zonu <12 mm). *E. coli* ve *C. albicans*'ın tüm *Ajuga vestita* ekstralarına karşı dirençli olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. *A. vestita* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi ortalama değerleri<sup>a</sup>

		Mikroorganizmalar					
		<i>E.coli</i>	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>	
İnhibisyon zon çapı (mm)	AVP	10mg/ml	ZY	ZY	ZY	ZY	ZY
		20 mg/ml	ZY	ZY	ZY	ZY	ZY
		40 mg/ml	ZY	ZY	ZY	ZY	ZY
	AVA	10 mg/ml	ZY	11±1.1	ZY	10±1.1	ZY
		20 mg/ml	ZY	13.3±1.1	7±0.5	10±1	ZY
		40 mg/ml	ZY	15±0.5	7±0	10±0.5	ZY
	AVM	10 mg/ml	ZY	10±1.5	9±1	9.3±0.5	ZY
		20 mg/ml	ZY	12±1	ZY	11.6±0.5	ZY
		40 mg/ml	ZY	15±0.5	ZY	12±1	ZY

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

ZY: Zon Yok

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Genel olarak bakıldığında *A. xylorrhiza* ekstrelerinin antimikrobiyal açıdan aktif olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.2.). AXP çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermezken AXA *S. pyogenes* ve *E. coli*'ye karşı orta derecede (inhibisyon zonu < 20-12 mm), AXM ise *P.aeruginosa*'ya karşı düşük derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir (inhibisyon zonu <12 mm). AXA'nın en yüksek aktiviteyi 40 mg/ml konsantrasyonda *S. pyogenes*'e karşı gösterdiği gözlemlenmiştir (inhibisyon zonu 15±0.5). *C. albicans*'ın çalışılan tüm ekstrelelere karşı dirençli olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2. *A. xylorrhiza* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi ortalama değerleri<sup>a</sup>

		Mikroorganizmalar					
		<i>E.coli</i>	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>	
İnhibisyon zon çapı (mm)	AXP	10 mg/ml	ZY	ZY	ZY	ZY	ZY
		20 mg/ml	ZY	ZY	ZY	ZY	ZY
		40 mg/ml	ZY	ZY	ZY	ZY	ZY
	AXA	10 mg/ml	11±1	ZY	ZY	ZY	ZY
		20 mg/ml	11.6±0.5	11±1.1	7±0	ZY	ZY
		40 mg/ml	14±1	15±0.5	7.5±0.7	ZY	ZY
	AXM	10 mg/ml	ZY	ZY	7.3±0.5	7.6±0.5	ZY
		20 mg/ml	ZY	ZY	ZY	8±1	ZY
		40 mg/ml	ZY	ZY	ZY	9.3±0.5	ZY

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

ZY: Zon Yok

Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin (imipenem, eritromisin, vankomisin) mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisine bakıldığında; imipenem ve eritromisinin *S.pyogenes* ve *S.aureus*'a karşı güçlü aktivite gösterdiği, diğer mikroorganizmalara karşı düşük ve orta derecede aktivite gösterdiği görülmüştür. Vankomisin *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.3.).

**Çizelge 4.3.** Pozitif ve negatif kontrollerin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkisine ilişkin ortalama değerleri<sup>a</sup>

Mikroorganizmalar	İnhibisyon zonu (mm)				DMSO <sup>c</sup>
	İmipenem <sup>b</sup> (10µg)	Eritromisin <sup>b</sup> (15 µg)	Vankomisin <sup>b</sup> (30 µg)	Nystatin <sup>b</sup> (30 µg)	
<i>E.coli</i>	19±1.4	12.6±2.7	ZY	-	ZY
<i>S.pyogenes</i>	39.5±0.7	20.2±2.6	11.5±0.7	-	ZY
<i>S.aureus</i>	27.5±0.7	22.25±0.6	12.5±2.12	-	ZY
<i>P.aeruginosa</i>	12±0	12.6±3.1	ZY	-	ZY
<i>C. albicans</i>	-	-	-	25±0.5	ZY

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

b:Pozitif kontrol (bakteriler için imipenem, eritromisin, vankomisin; maya için nystatin kullanıldı)

c: Negatif kontrol ZY: Zon Yok

#### 4.2. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayinleri Sonuçları

Tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi.

*A. vestita* ekstrelerinden metanol ekstresinin fenolik ve flavonoit miktarının diğer ekstrelerden fazla olduğu, *A. xylorrhiza* ekstrelerinden metanol ekstresinin fenolik miktarının ve aseton ekstresinin de flavonoit miktarının diğer ekstrelerden daha fazla olduğu belirlendi (Çizelge 4.4).

1 mg AVM'deki pirokatekole eşdeğer toplam fenolik madde miktarı 31 µg, kersetine eşdeğer toplam flavonoit miktarı ise 55 µg olduğu tespit edilmiştir.

1 mg AXM'deki pirokatekole eşdeğer toplam fenolik madde miktarı 39 µg, 1 mg AXA'daki kersetine eşdeğer toplam flavonoit miktarı 64 µg olarak belirlenmiştir.



Çizelge 4.4. Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları <sup>a</sup>

Ekstreler	Fenolik Miktar (µgPEs/mg ekstre) <sup>b</sup>	Flavonoit Miktar (µgQEs/mg ekstre) <sup>c</sup>
AVP	26.37 ± 0.00	37.22 ± 1.50
AVA	21.16 ± 1.13	36.87 ± 2.85
<b>AVM</b>	<b>31.25 ± 1.38</b>	<b>55.53 ± 3.45</b>
AXP	14.00 ± 1.13	33.07 ± 1.20
AXA	21.16 ± 1.13	<b>64.68 ± 2.85</b>
AXM	<b>39.06 ± 1.38</b>	28.41 ± 2.56

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

b: Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik ( $y= 0.0256x+0,0405$   $R^2=0,9965$ )

c: Kersetine eşdeğer flavonoit içerik ( $y=0,0193x-0,0245$   $R^2=0,9909$ )

### 4.3. Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları

#### 4.3.1. $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yöntemi Bulguları

*A. vestita* ve *A. xylorrhiza* bitkilerinden hazırlanan petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinin  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemine göre antioksidan aktiviteleri en yüksek aktivite değerini belirleyene kadar farklı konsantrasyonlarda çalışıldı.

AVP'nin 5 mg/ml konsantrasyonda %85, AVA'nın 500 µg/ml konsantrasyonda %95, AVM'nin 100 µg/ml konsantrasyonda %38, AXP'nin 500 µg/ml konsantrasyonda %87, AXA'nın 100 µg/ml konsantrasyonda %72, AXM'nin ise 100 µg/ml konsantrasyonda %56 inhibisyonla en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edildimiştir (Çizelge 4.5., Şekil 4.1., Şekil 4.2.).

Sonuçlara göre en yüksek aktiviteyi 500 µg/ml konsantrasyonda AVA'nın gösterdiği ve aynı konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den daha yüksek etkiye sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4.5.).

#### 4.3.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Bulguları

*A. vestita* ve *A. xylorrhiza* bitkilerinden hazırlanan petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemine göre antioksidan aktiviteleri yedi farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100, 500 µg/ml, 1, 5 mg/ml) belirlendi.

Ekstrelerden AVP'nin 1 mg/ml konsantrasyonda (%75 inhibisyon), AVA'nın 1 mg/ml konsantrasyonda (%77 inhibisyon), AVM'nin 500 µg/ml konsantrasyonda (%86 inhibisyon), AXP'nin 1 mg/ml konsantrasyonda (%49 inhibisyon), AXA'nın 500 µg/ml konsantrasyonda (%79 inhibisyon), AXM'nin ise 500 µg/ml konsantrasyonda (%85 inhibisyon) en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).

Sonuçlara göre bu yöntemde en yüksek aktiviteyi 500 µg/ml konsantrasyonda AVM ve AXM'nin gösterdiği ve aynı konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den daha yüksek etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.6.).

#### 4.3.3. ABTS Yöntemi (Kasyon Radikali Giderim Aktivitesi) Bulguları

Ekstrelerin kasyon radikali giderim aktivitesi yöntemine göre antioksidan aktiviteleri farklı konsantrasyonlarda belirlendi.

Örneklerin en yüksek aktiviteyi 1 mg/ml konsantrasyonda gösterdiği belirlenmiş olup, bu konsantrasyonda AVP %25, AVA %74, AVM %86, AXP %22, AXA %75 ve AXM %86 inhibisyona sahiptir. (Çizelge 4.7., Şekil 4.5., Şekil 4.6.).

Kasyon radikali giderim aktivitesi en yüksek ekstreler %86 inhibisyon ile AVM ve AXM olarak belirlenmiştir. Tüm ekstraların standart olarak kullanılan BHT, BHA, α-tokoferol ve kateşin'den daha düşük etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7.).

##### **4.3.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Bulguları**

*A. vestita* ve *A. xylorrhiza* bitkilerinden hazırlanan petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktiviteleri en yüksek absorbans değerini belirleyene kadar farklı konsantrasyonlarda çalışıldı.

AVP 10 mg/ml konsantrasyonda 2.67, AVA 1 mg/ml konsantrasyonda 3.24, AVM 1 mg/ml konsantrasyonda 3.99, AXP 10 mg/ml konsantrasyonda 3.86, AXA 1 mg/ml konsantrasyonda 3.61, AXM ise 500 µg/ml konsantrasyonda 3.43 absorbans değerleriyle en yüksek aktiviteye sahiptir (Çizelge 4.8., Şekil 4.7., Şekil 4.8.).

1 mg/ml konsantrasyonda AVM'nin pozitif kontrol olarak kullanılan  $\alpha$ -tokoferolden daha yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.8.)

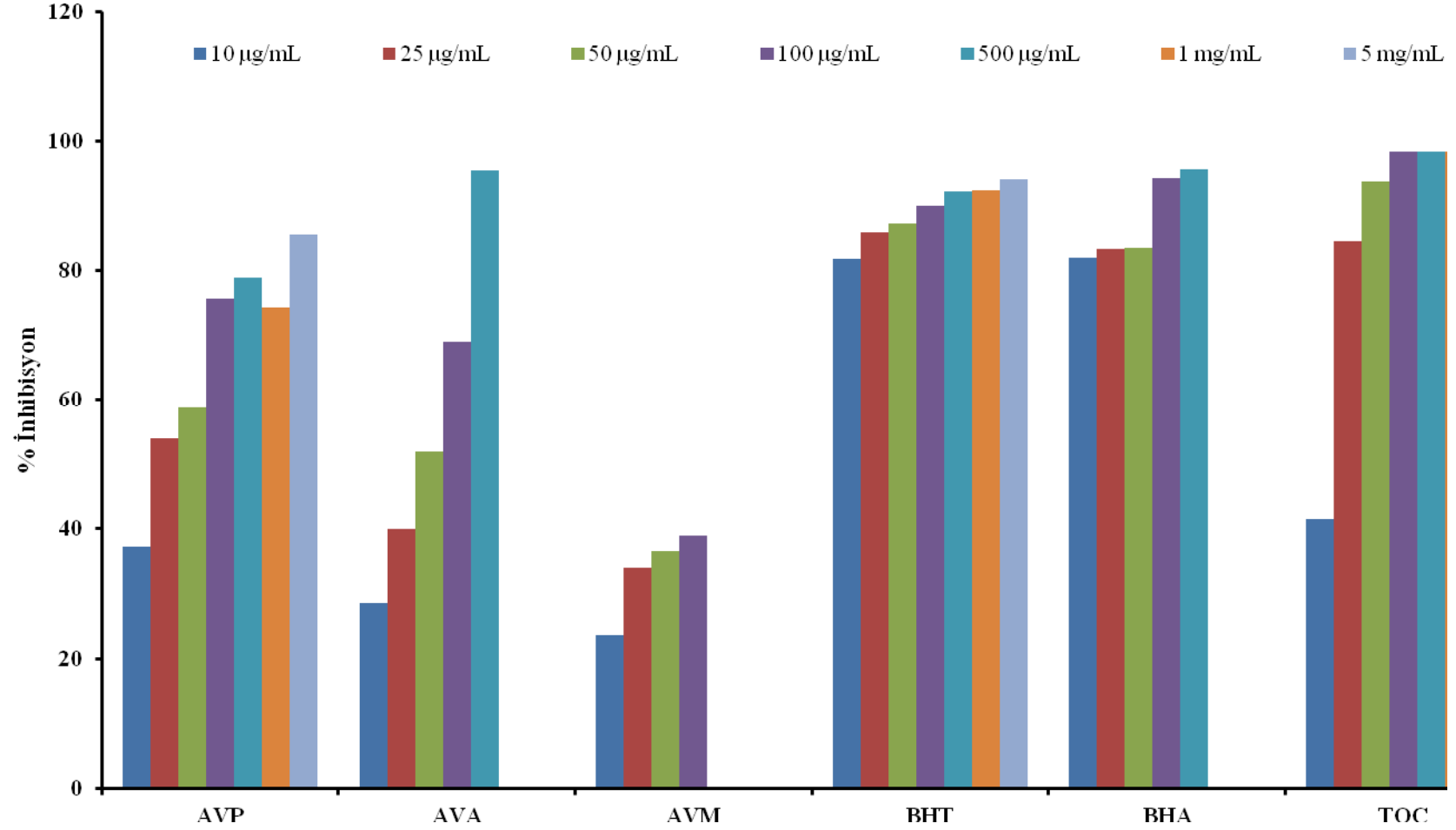
**Çizelge 4.5.** Ekstre ve pozitif kontrollerin  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemiyle belirlenen inhibisyon yüzdesi değerleri<sup>a</sup>

Konsantrasyonlar	AVP	AVA	AVM	AXP	AXA	AXM	BHT	BHA	$\alpha$ -TOC
<b>10 <math>\mu</math>g/ml</b>	37.31 $\pm$ 2.70	28.51 $\pm$ 0.47	23.61 $\pm$ 0.49	49.36 $\pm$ 0.98	45.25 $\pm$ 1.19	42.25 $\pm$ 0.60	81.83 $\pm$ 1.17	81.91 $\pm$ 1.27	41.58 $\pm$ 1.19
<b>25 <math>\mu</math>g/ml</b>	53.98 $\pm$ 0.53	40.05 $\pm$ 1.17	34.02 $\pm$ 0.23	53.89 $\pm$ 0.86	48.75 $\pm$ 3.04	49.30 $\pm$ 0.68	85.97 $\pm$ 0.53	83.29 $\pm$ 3.52	84.48 $\pm$ 0.49
<b>50 <math>\mu</math>g/ml</b>	58.72 $\pm$ 1.56	51.99 $\pm$ 0.56	36.60 $\pm$ 3.88	62.54 $\pm$ 1.27	51.90 $\pm$ 0.68	56.51 $\pm$ 3.99	87.25 $\pm$ 1.96	83.51 $\pm$ 0.23	93.69 $\pm$ 3.51
<b>100 <math>\mu</math>g/ml</b>	75.69 $\pm$ 1.96	69.06 $\pm$ 5.86	<b>38.92<math>\pm</math>3.52</b>	78.04 $\pm$ 1.54	<b>72.89<math>\pm</math>3.51</b>	<b>56.99<math>\pm</math>2.62</b>	90.07 $\pm$ 1.06	94.35 $\pm$ 1.17	98.30 $\pm$ 0.98
<b>500 <math>\mu</math>g/ml</b>	78.98 $\pm$ 1.06	<b>95.38<math>\pm</math>0.86</b>	-	<b>87.62<math>\pm</math>3.70</b>	-	-	92.28 $\pm$ 0.56	95.55 $\pm$ 0.53	98.32 $\pm$ 2.62
<b>1 mg/ml</b>	74.28 $\pm$ 2.00	-	-	63.43 $\pm$ 2.59	-	-	92.36 $\pm$ 0.75	-	98.40 $\pm$ 0.47
<b>5 mg/ml</b>	<b>85.52<math>\pm</math>2.43</b>	-	-	58.10 $\pm$ 3.67	-	-	94.18 $\pm$ 0.86	-	98.76 $\pm$ 2.70

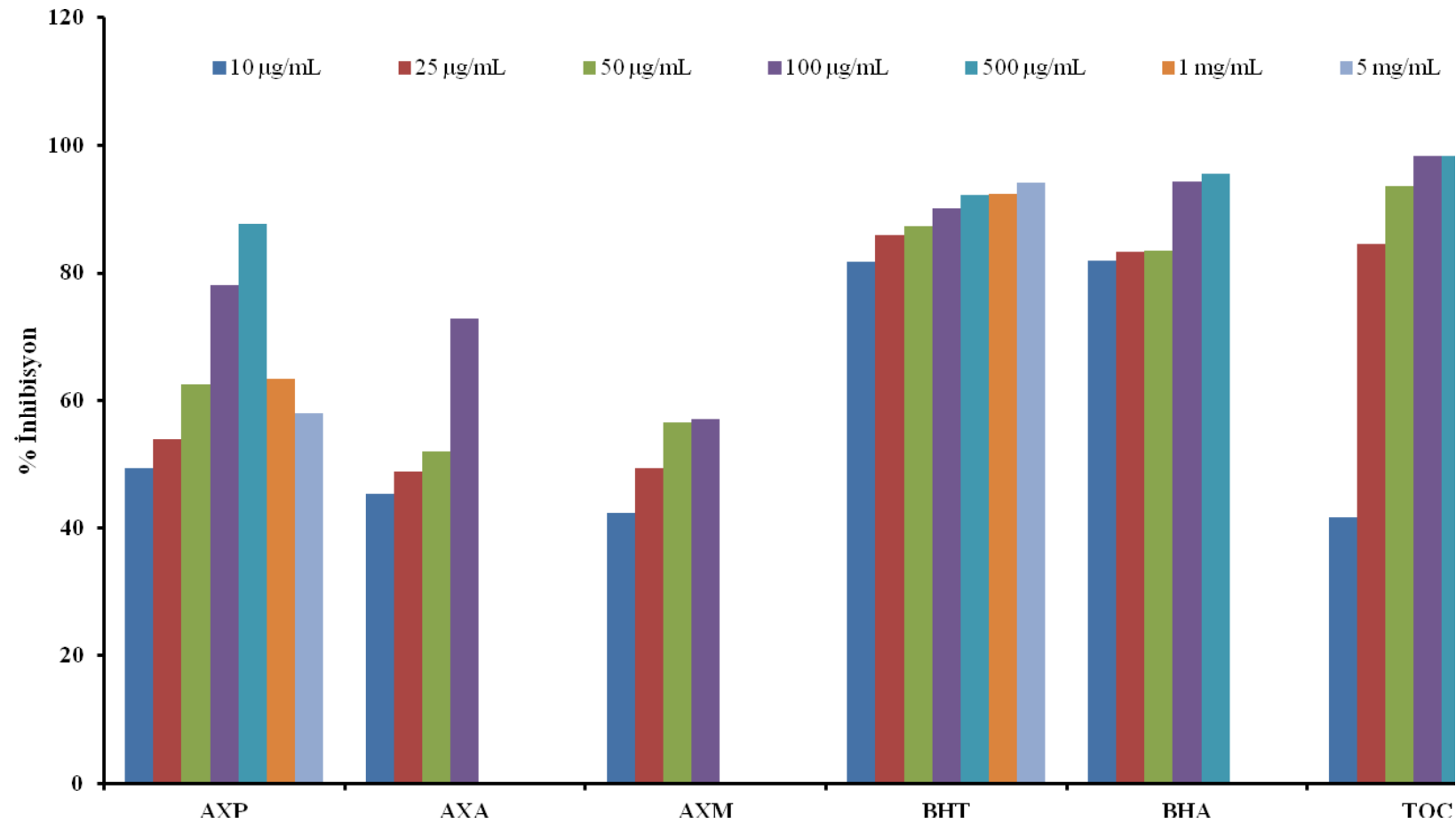
a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

-: Ölçülmedi

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.1. *A. vestita* ekstralarının  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemi ile antioksidan aktiviteleri



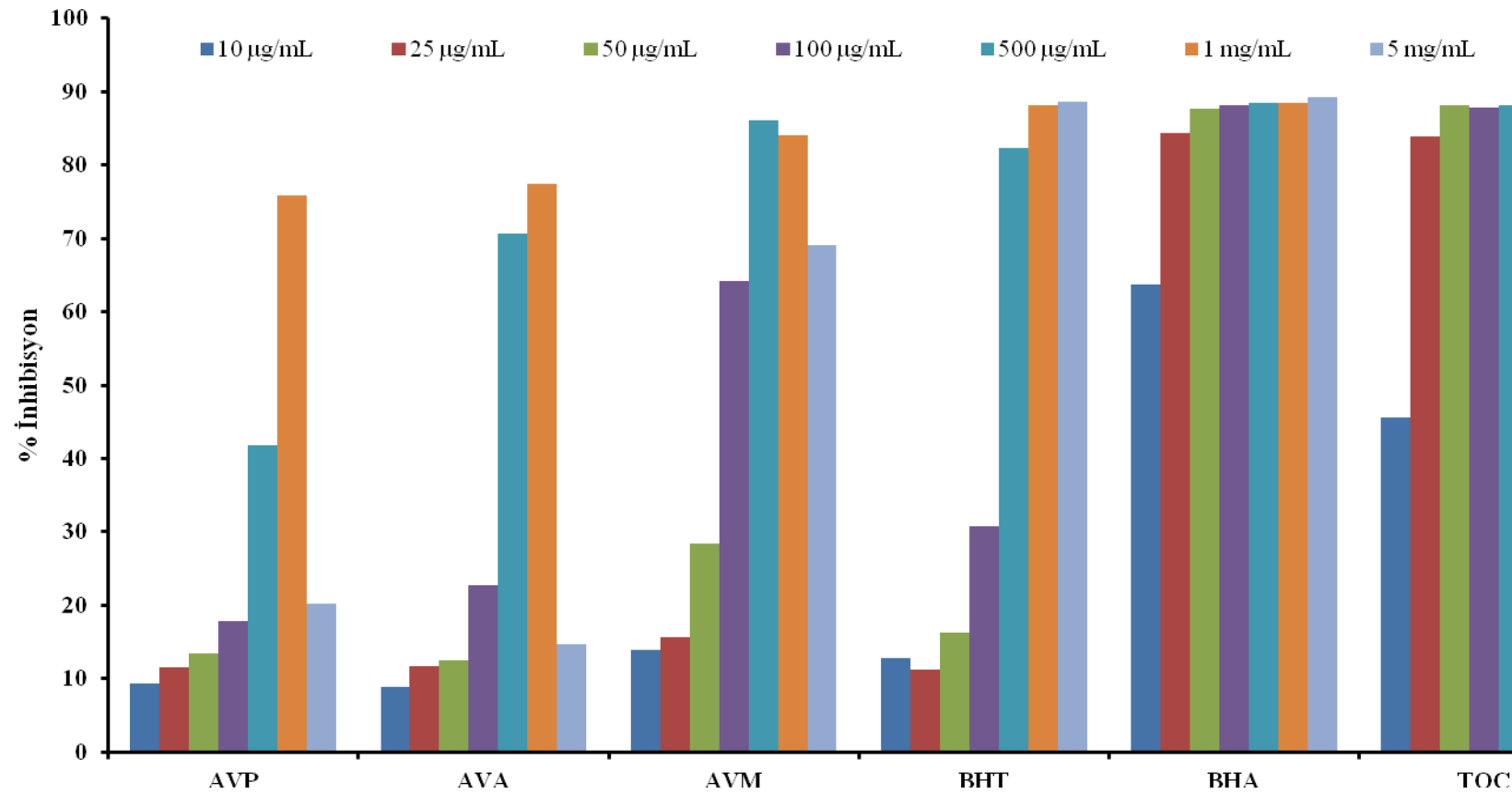
Şekil 4.2. *A. xylorrhiza* ekstralarının  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.6. Ekstre ve pozitif kontrollerin DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi yöntemiyle belirlenen inhibisyon yüzdesi değerleri<sup>a</sup>

Konsantrasyonlar	AVP	AVA	AVM	AXP	AXA	AXM	BHT	BHA	$\alpha$ -TOC
10 $\mu$ g/ml	9.37 $\pm$ 0.94	8.93 $\pm$ 1.03	13.90 $\pm$ 0.98	2.91 $\pm$ 1.47	8.19 $\pm$ 0.39	13.16 $\pm$ 0.93	12.87 $\pm$ 0.40	63.78 $\pm$ 1.02	45.62 $\pm$ 2.02
25 $\mu$ g/ml	11.54 $\pm$ 0.93	11.64 $\pm$ 1.42	15.70 $\pm$ 0.93	4.04 $\pm$ 0.13	10.91 $\pm$ 0.28	19.77 $\pm$ 0.39	11.23 $\pm$ 0.81	84.30 $\pm$ 0.94	83.92 $\pm$ 2.15
50 $\mu$ g/ml	13.46 $\pm$ 0.78	12.52 $\pm$ 0.60	28.35 $\pm$ 0.13	7.18 $\pm$ 0.26	15.78 $\pm$ 0.39	41.98 $\pm$ 0.39	16.23 $\pm$ 0.54	87.64 $\pm$ 0.58	88.08 $\pm$ 0
100 $\mu$ g/ml	17.87 $\pm$ 1.06	22.78 $\pm$ 0.68	64.22 $\pm$ 0.40	7.45 $\pm$ 0.53	29.19 $\pm$ 0.53	80.82 $\pm$ 0.53	30.73 $\pm$ 2.58	88.15 $\pm$ 0.11	87.83 $\pm$ 0.11
500 $\mu$ g/ml	41.85 $\pm$ 0.53	70.67 $\pm$ 0.43	<b>86.09<math>\pm</math>0.10</b>	25.59 $\pm$ 0.18	<b>79.24<math>\pm</math>0.61</b>	<b>85.13<math>\pm</math>0.43</b>	82.32 $\pm$ 0.27	88.53 $\pm$ 0.13	88.08 $\pm$ 0.13
1 mg/ml	<b>75.83<math>\pm</math>0.32</b>	<b>77.47<math>\pm</math>0.21</b>	84.07 $\pm$ 0.10	<b>49.03<math>\pm</math>0.93</b>	75.26 $\pm$ 0.39	82.22 $\pm$ 0.10	88.15 $\pm$ 0.11	88.40 $\pm$ 0.22	87.89 $\pm$ 0.21
5 mg/ml	20.23 $\pm$ 0.40	14.66 $\pm$ 0.01	69.16 $\pm$ 2.26	2.05 $\pm$ 0.32	12.87 $\pm$ 0.26	39.92 $\pm$ 1.47	88.60 $\pm$ 0.22	89.30 $\pm$ 0.15	88.79 $\pm$ 0.53

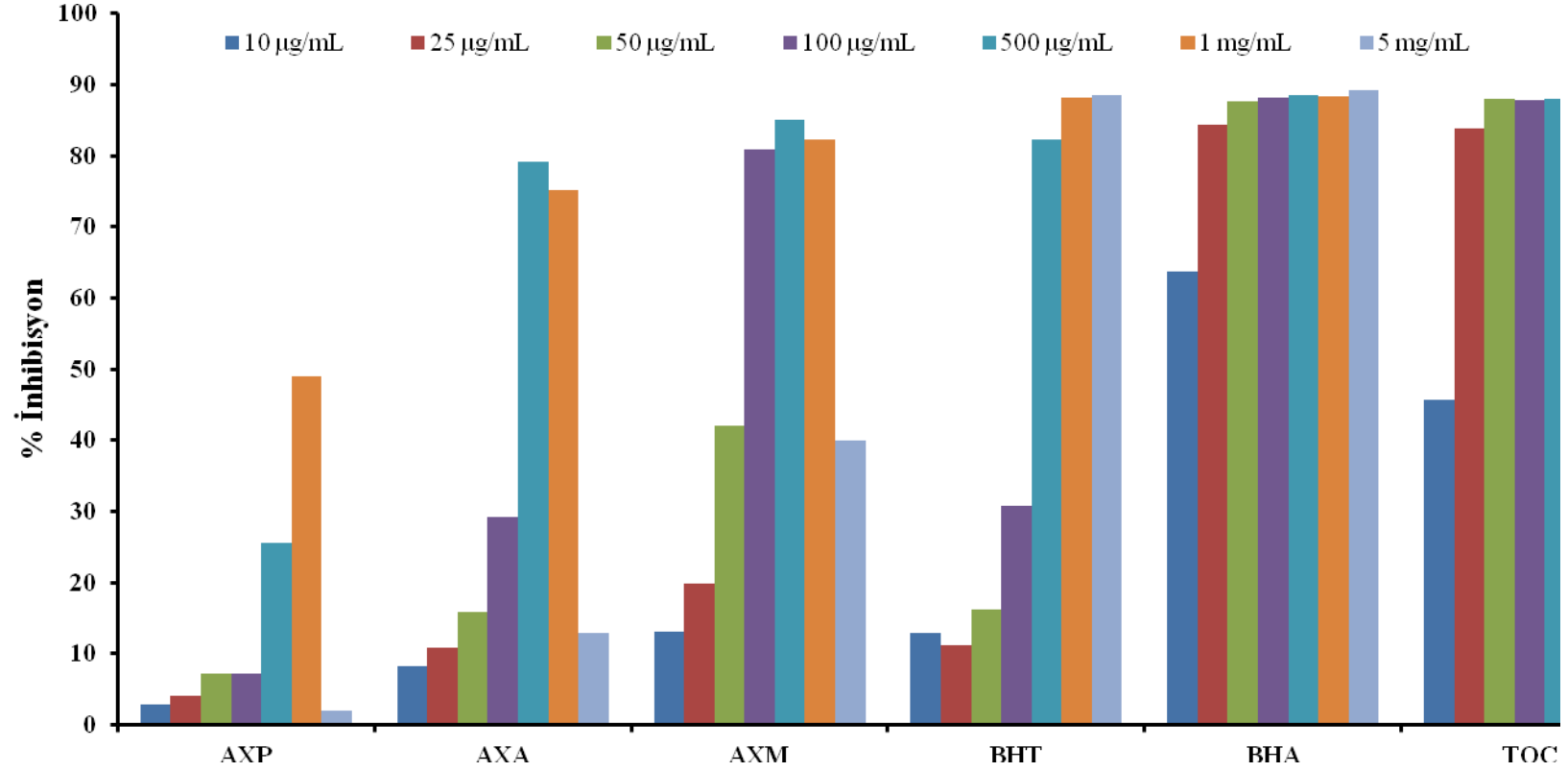
a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir



Şekil 4.3. *A. vestita* ekstralarının DPPH yöntemi ile antioksidan aktiviteleri



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.4. *A. xyloxyloides* ekstrelerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

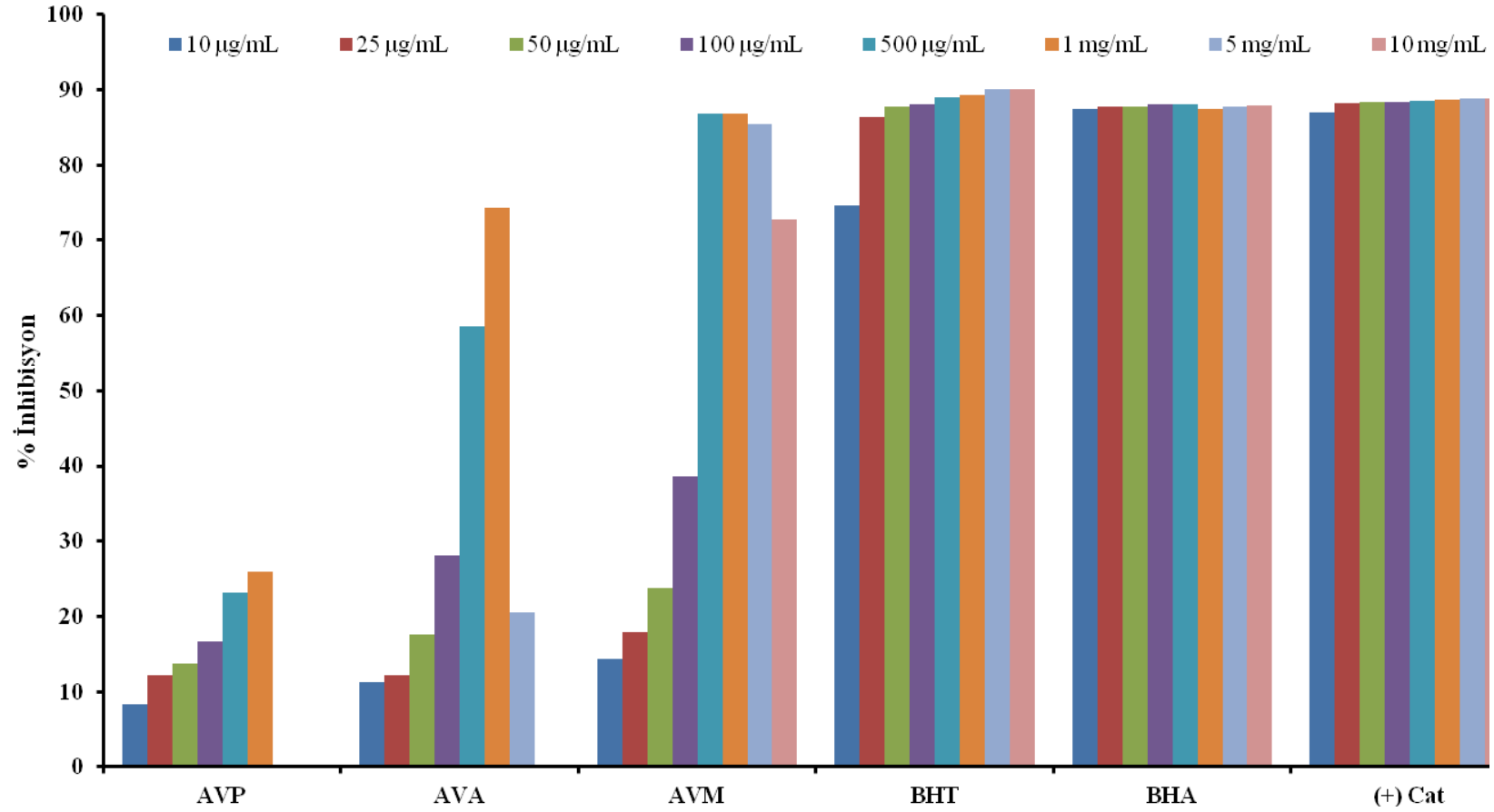
Çizelge 4.7. Ekstre ve pozitif kontrollerin ABTS yöntemiyle belirlenen inhibisyon yüzdesi değerleri<sup>a</sup>

Konsantrasyonlar	AVP	AVA	AVM	AXP	AXA	AXM	BHT	BHA	(+) Cat.
10 µg/ml	8.23±0.37	11.29±0.46	14.40±0.23	3.56±0.37	12.69±0.93	20.31±2.44	74.69±0.91	87.54±1.15	87.04±0.23
25 µg/ml	12.11±0.69	12.11±0.23	17.94±0.50	4.53±0.98	12.37±0.32	25.36±0.67	86.34±0.42	87.75±0.50	88.25±0.69
50 µg/ml	13.74±1.62	17.51±0.46	23.73±0.05	7.43±0.18	17.84±0.87	41.25±2.98	87.85±0.50	87.75±0.69	88.35±2.44
100 µg/ml	16.69±1.15	28.09±0.50	38.62±0.69	12.63±0.99	27.67±0.68	45.39±1.59	88.05±0.87	88.04±0.99	88.35±0.93
500 µg/ml	23.07±0.46	58.59±0.69	86.90±0.56	15.91±0.64	60.21±2.96	80.50±1.13	89.01±0.64	88.15±0.68	88.59±0.37
1 mg/ml	<b>25.85±0.69</b>	<b>74.30±0.23</b>	<b>86.90±0.11</b>	<b>22.51±4.32</b>	<b>75.51±0.91</b>	<b>86.68±0.18</b>	89.25±0.23	87.47±1.59	88.72±0.23
5 mg/ml	-	20.45±0.46	85.37±0.18	-	-	69.71±0.45	90.02±0.69	87.82±1.13	88.91±0.46
10 mg/ml	-	-	72.83±2.31	-	-	-	90.12±0.85	87.88±2.31	88.91±0.37

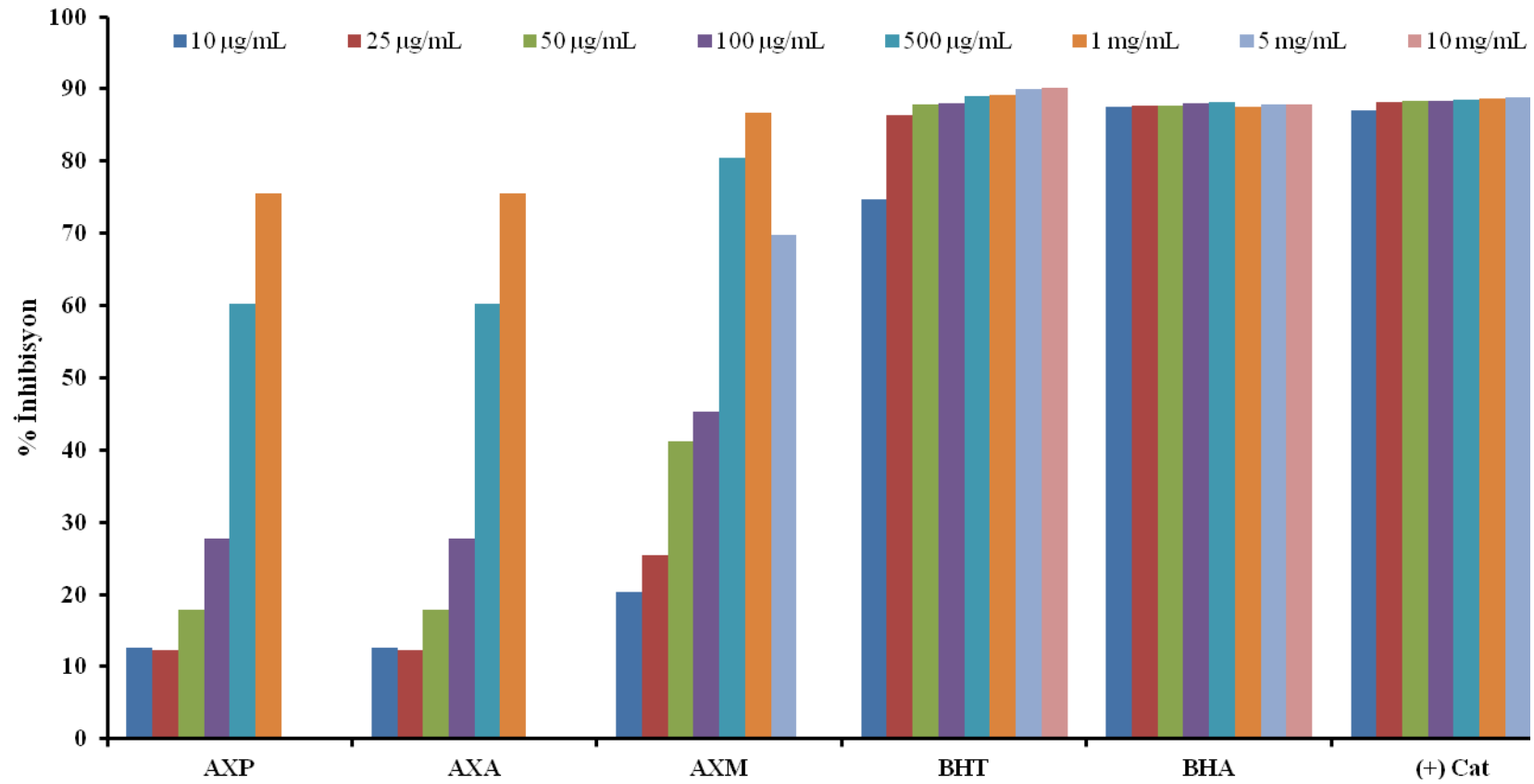
a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

-: Ölçülmedi

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.5. *A. vestita* ekstrelerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktiviteleri



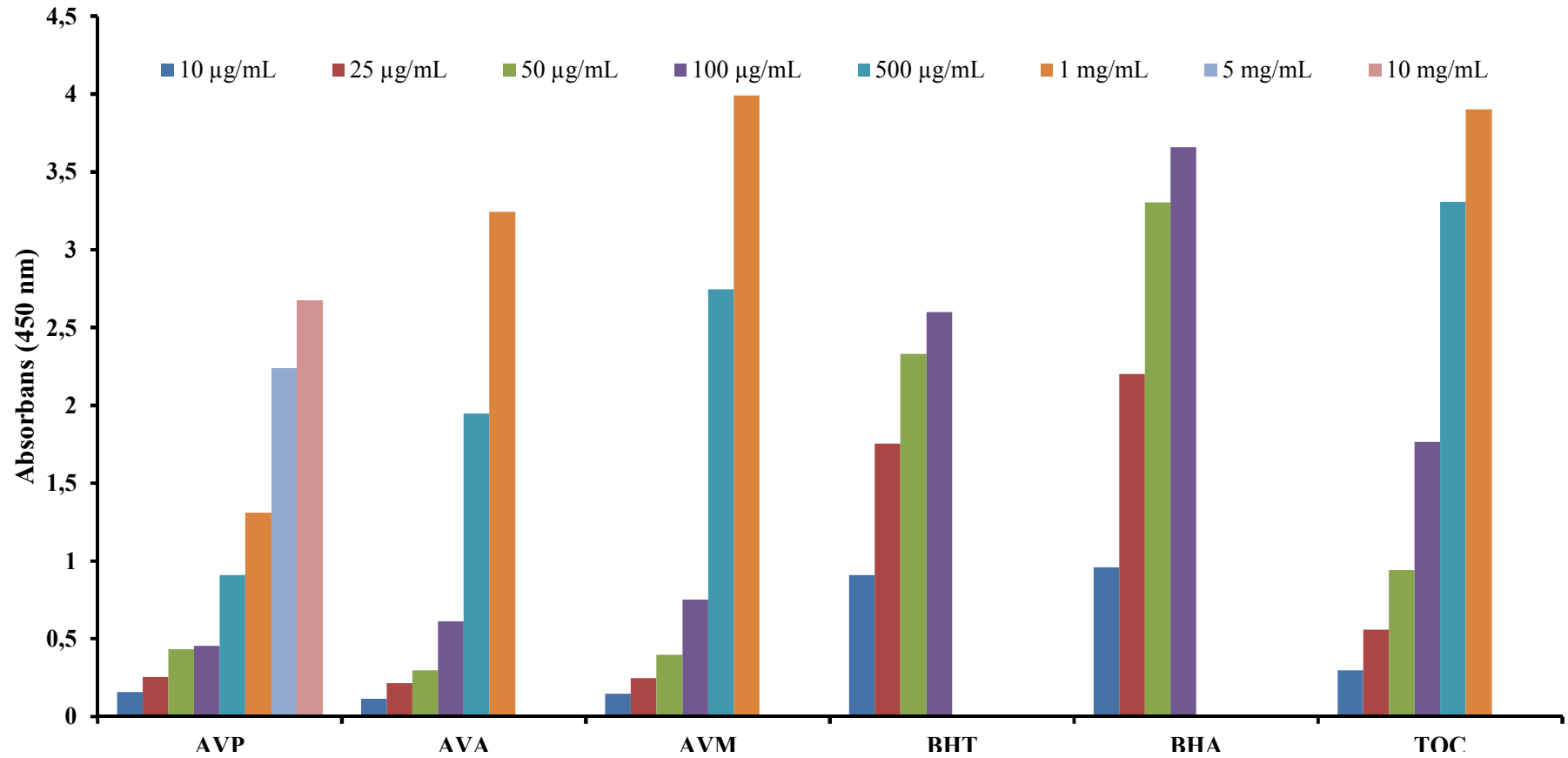
Şekil 4.6. *A. xylorrhiza* ekstralarının ABTS yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.8. Ekstre ve pozitif kontrollerin CUPRAC yöntemiyle belirlenen absorbens değerleri<sup>a</sup>

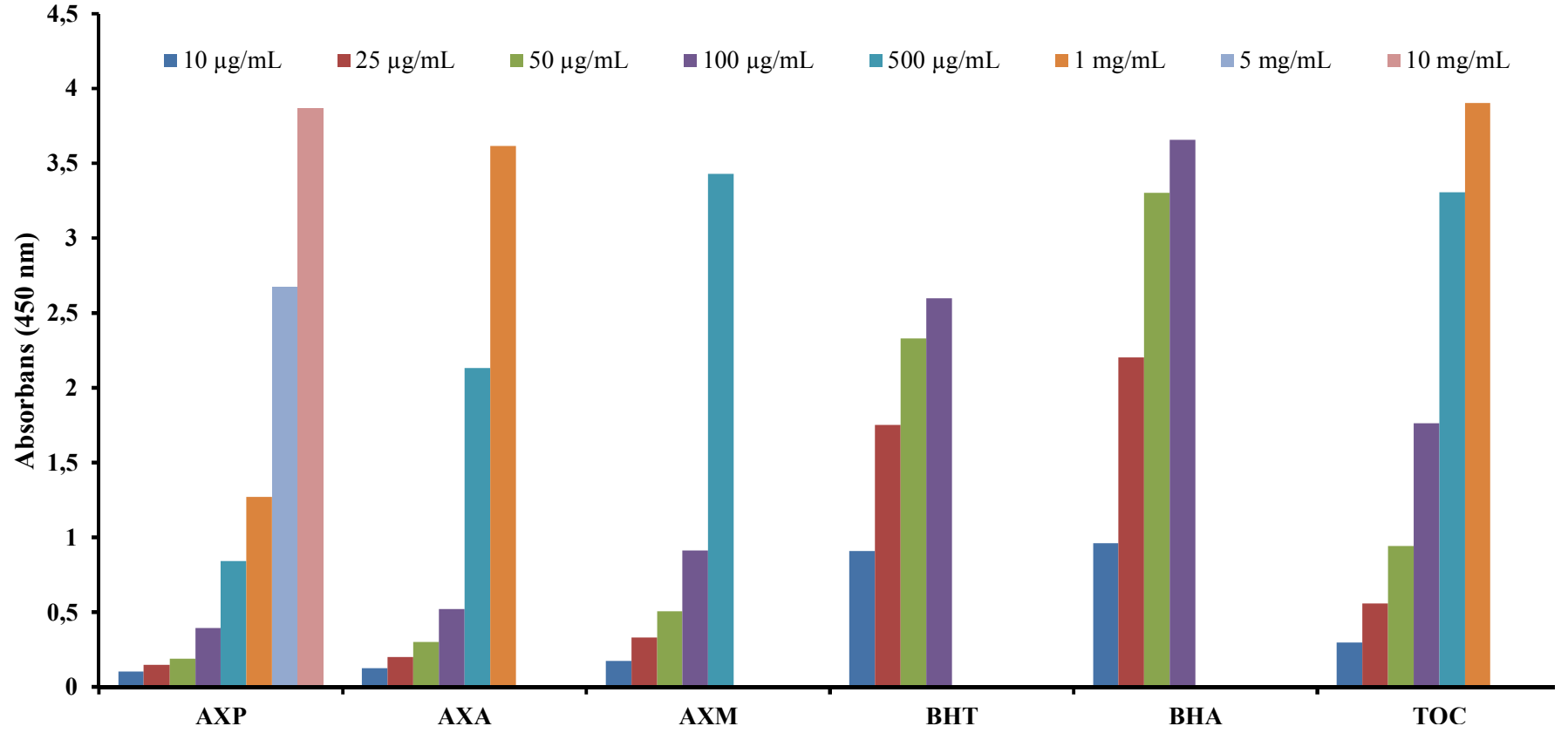
Konsantrasyonlar	AVP	AVA	AVM	AXP	AXA	AXM	BHT	BHA	$\alpha$ -TOC
10 $\mu$ g/ml	0.15 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0	0.14 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0	0.12 $\pm$ 0	0.17 $\pm$ 0.02	0.90 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.01
25 $\mu$ g/ml	0.25 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0	0.14 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0	0.33 $\pm$ 0.03	1.75 $\pm$ 0.12	2.20 $\pm$ 0.19	0.55 $\pm$ 0.02
50 $\mu$ g/ml	0.43 $\pm$ 0.16	0.29 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0	0.30 $\pm$ 0	0.50 $\pm$ 0.01	2.33 $\pm$ 0.51	3.30 $\pm$ 0.10	0.94 $\pm$ 0.04
100 $\mu$ g/ml	0.45 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.15	0.75 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0	<b>2.6<math>\pm</math>0.61</b>	<b>3.65<math>\pm</math>0.26</b>	1.76 $\pm$ 0.03
500 $\mu$ g/ml	0.90 $\pm$ 0.09	1.94 $\pm$ 0.16	2.74 $\pm$ 0.21	0.84 $\pm$ 0.03	2.13 $\pm$ 0.05	<b>3.43<math>\pm</math>0.13</b>	$\geq 4$	$\geq 4$	3.30 $\pm$ 0.22
1 mg/ml	1.31 $\pm$ 0.07	<b>3.24<math>\pm</math>0.19</b>	<b>3.99<math>\pm</math>0.01</b>	1.27 $\pm$ 0.03	<b>3.61<math>\pm</math>0.09</b>	$\geq 4$	$\geq 4$	$\geq 4$	<b>3.90<math>\pm</math>0.04</b>
5 mg/ml	2.24 $\pm$ 0.1	$\geq 4$	$\geq 4$	2.67 $\pm$ 0.13	$\geq 4$	$\geq 4$	$\geq 4$	$\geq 4$	$\geq 4$
10 mg/ml	<b>2.67<math>\pm</math>0.19</b>	$\geq 4$	$\geq 4$	<b>3.86<math>\pm</math>0.02</b>	$\geq 4$	$\geq 4$	$\geq 4$	$\geq 4$	$\geq 4$

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir



Şekil 4.7. *A. vestita* ekstrelerinin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

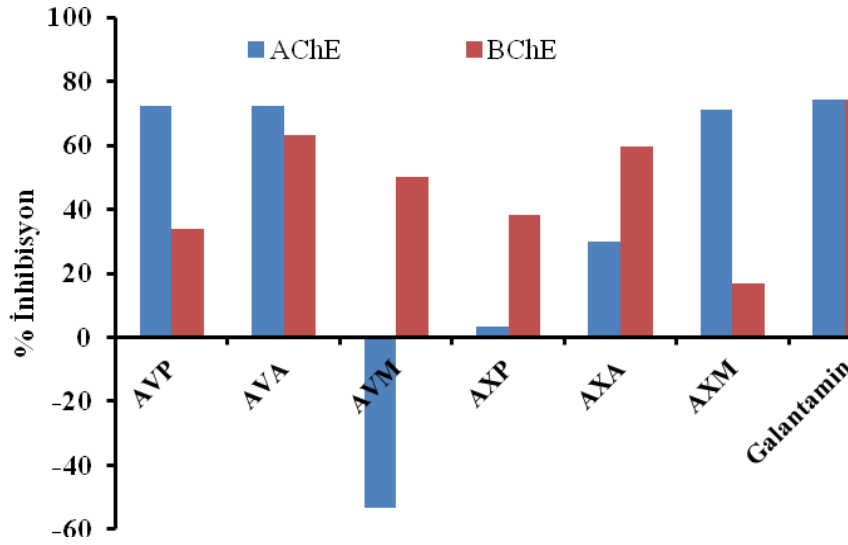
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.8. *A. xylorhiza* ekstrelerinin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

#### 4.4. Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite Bulguları

*A. vestita* ve *A. xylorrhiza* bitkilerinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının antikolinesteraz aktiviteleri Ellman metoduna göre belirlenmiş olup sonuçlar Şekil 4.9. ve Çizelge 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Ekstrelerin AChE ve BChE % inhibisyonu

AChE % inhibisyonu sonuçları AVP'nin %72, AVA'nın %72, AVM'ni -%53, AXP'nin %3, AXA'nın %29, AXM'nin ise %70 inhibisyona sahip olduğunu göstermektedir. En yüksek aktiviteyi AVP ve AVA göstermiştir ki bu da Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan Galantamin'nin aktivitesine (%74) çok yakın bir değerdedir. AVM'nin negatif değerde aktivite göstermesi antikolinesteraz aktivitesi olmadığını ifade etmektedir.

Ekstreler BChE % inhibisyonuna göre değerlendirildiğinde AVP'nin %33, AVA'nın %63, AVM'nin %49, AXP'nin %38, AXA'nın %59, AXM'nin ise %16 inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. BChE inhibisyonunda en iyi aktiviteyi AVA ve AXA'nın gösterdiği tespit edilmiştir.



Çizelge 4.9. Ekstrelerin AChE ve BChE % inhibisyon değerleri<sup>a</sup>

Örnekler	AChE	BChE
	% inhibisyon	% inhibisyon
AVP	72.20 ± 0.15	33.89 ± 4.85
AVA	72.42 ± 0.45	63.05 ± 0.88
AVM	-53.25 ± 4.37	49.95 ± 5.51
AXP	3.19 ± 2.26	38.10 ± 0.88
AXA	29.93 ± 6.02	59.77 ± 1.54
AXM	70.93 ± 5.27	16.89 ± 0.22
Galantamin	74.12 ± 0.15	74.48 ± 0.63

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

#### 4.5. Ames *Salmonella*/Mikrozom Mutajenite ve Antimutajenite Testi Bulguları

##### 4.5.1. Mutajenite Bulguları

Mutajenite deneylerinde her ekstreten 9 doz ile pozitif ve negatif kontroller eş zamanlı olarak 3 tekrar halinde denenmiştir. Çalışma *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Mutajenik etki değerlendirmesi bu sisteme özgü olan ‘iki kat artış’ kuralı ve ‘doza bağlı artan yanıt’a göre yapılmıştır. Çizelge 4.10., Çizelge 4.11., Çizelge 4.12., Çizelge 4.13., Çizelge 4.14., Çizelge 4.15.’te her ekstretenin mutajenite test sonuçları görülmektedir.

Sonuçlara bakıldığında test edilen ekstrelerin *S. typhimurium*’un her iki suşunda S9 varlığında ve yokluğunda, tüm dozlarda, koloni sayısında artışa sebep olmadığı dolayısıyla mutajenik etki göstermediği görülmektedir.

**Çizelge 4.10.** AVP'nin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
0 µg/petri	42±2	40±4	141±18	149±26
10 µg/petri	46±13	41±7	147±60	151±17
25 µg/petri	43±4	40±2	144±18	165±26
50 µg/petri	40±2	43±8	152±27	163±17
100 µg/petri	43±9	44±5	144±21	185±12
250 µg/petri	44±6	40±10	145±19	178±14
500 µg/petri	40±13	42±3	146±16	177±24
750 µg/petri	43±6	42±4	140±12	169±11
1000 µg/petri	45±7	44±6	136±16	152±18
(-)Kontrol	42±3	41±4	133±11	151±50
(+)Kontrol	692±31	284±38	1302±80	553±38

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması ve standart sapma olarak verilmiştir

(-) Kontrol: DMSO

(+) Kontrol: TA98 suşu için S9 varlığında 2AF, S9 yokluğunda Daunomycine; TA100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda sodyum azid kullanılmıştır

**Çizelge 4.11.** AVA'nın *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
0 µg/petri	42±2	40±4	141±18	149±26
10 µg/petri	44±7	33±2	174±43	155±9
25 µg/petri	41±5	40±2	144±10	143±21
50 µg/petri	49±8	32±5	152±13	146±8
100 µg/petri	46±4	50±11	144±18	161±38
250 µg/petri	41±15	39±7	152±27	155±21
500 µg/petri	30±2	34±4	145±19	144±14
750 µg/petri	42±5	43±2	139±8	153±8
1000 µg/petri	45±4	51±7	150±17	158±11
(-)Kontrol	42±3	41±4	133±11	151±50
(+)Kontrol	692±31	284±38	1302±80	553±38

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması ve standart sapma olarak verilmiştir

(-) Kontrol: DMSO

(+) Kontrol: TA98 suşu için S9 varlığında 2AF, S9 yokluğunda Daunomycine; TA100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda sodyum azid kullanılmıştır

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

**Çizelge 4.12.** AVM'nin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
0 µg/petri	42±2	40±4	141±18	149±26
10 µg/petri	47±5	42±7	146±7	153±8
25 µg/petri	42±2	39±1	155±39	138±7
50 µg/petri	30±3	34±9	174±43	163±17
100 µg/petri	45±4	34±2	144±10	185±12
250 µg/petri	52±3	32±5	152±13	178±14
500 µg/petri	47±7	31±2	126±8	177±24
750 µg/petri	49±5	38±6	148±10	165±12
1000 µg/petri	51±7	36±5	143±8	168±18
(-)Kontrol	42±3	41±4	133±11	151±50
(+)Kontrol	692±31	284±38	1302±80	553±38

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması ve standart sapma olarak verilmiştir

(-) Kontrol: DMSO

(+) Kontrol: TA98 suşu için S9 varlığında 2AF, S9 yokluğunda Daunomycine; TA100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda sodyum azid kullanılmıştır

**Çizelge 4.13.** AXP'nin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
0 µg/petri	44±8	43±7	137±16	149±18
10 µg/petri	33±7	39±7	139±15	167±20
25 µg/petri	45±7	44±6	140±26	169±9
50 µg/petri	43±6	39±4	136±21	128±5
100 µg/petri	45±7	51±6	141±26	137±14
250 µg/petri	56±7	42±4	134±6	165±20
500 µg/petri	46±2	45±8	139±23	117±24
750 µg/petri	43±5	44±3	135±12	145±12
1000 µg/petri	48±7	46±5	140±15	152±18
(-)Kontrol	42±3	41±4	133±11	122±5
(+)Kontrol	692±31	284±38	1302±80	553±38

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması ve standart sapma olarak verilmiştir

(-) Kontrol: DMSO

(+) Kontrol: TA98 suşu için S9 varlığında 2AF, S9 yokluğunda Daunomycine; TA100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda sodyum azid kullanılmıştır

**Çizelge 4.14.** AXA'nın *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
0 µg/petri	44±8	43±7	137±16	149±18
10 µg/petri	45±8	44±4	143±21	155±20
25 µg/petri	48±8	45±5	146±20	153±18
50 µg/petri	46±5	54±8	124±12	146 ±13
100 µg/petri	44±8	70±11	142±17	147±10
250 µg/petri	43±3	49±13	137±10	163±19
500 µg/petri	42±3	43±7	145±19	150±22
750 µg/petri	40±2	42±3	140±13	153±8
1000 µg/petri	46±7	48±6	145±12	155±6
(-)Kontrol	42±3	41±4	133±11	122±5
(+)Kontrol	692±31	284±38	1302±80	553±38

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması ve standart sapma olarak verilmiştir

(-) Kontrol: DMSO

(+) Kontrol: TA98 suşu için S9 varlığında 2AF, S9 yokluğunda Daunomycine; TA100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda sodyum azid kullanılmıştır

**Çizelge 4.15.** AXM'nin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile mutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
0 µg/petri	44±8	43±7	137±16	149±18
10 µg/petri	55±6	46±11	135±15	125±15
25 µg/petri	46±3	50±7	146±24	106±3
50 µg/petri	51±10	47±2	127±9	133±17
100 µg/petri	45±5	45±5	139±15	153±15
250 µg/petri	45±3	43±3	137±8	148±7
500 µg/petri	45±7	55±3	128±5	140±5
750 µg/petri	47±2	52±4	146±12	142±7
1000 µg/petri	46±5	48±5	140±8	150±10
(-)Kontrol	42±3	41±4	133±11	122±5
(+)Kontrol	692±31	284±38	1302±80	553±38

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması ve standart sapma olarak verilmiştir

(-) Kontrol: DMSO

(+) Kontrol: TA98 suşu için S9 varlığında 2AF, S9 yokluğunda Daunomycine; TA100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda sodyum azid kullanılmıştır

### 4.5.2. Antimutajenite Bulguları

Antimutajenite deneylerinde her ekstreden 9 doz ile negatif kontrol eş zamanlı olarak 3 tekrar halinde denenmiştir. Çalışma *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile S9 yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Antimutajenik etki değerlendirmesi varolan mutasyonun geri çevrilmesi sonucunda koloni sayısındaki düşüşe göre (% inhibisyon olarak) yapılmıştır. Çizelge 4.16., Çizelge 4.17., Çizelge 4.18., Çizelge 4.19., Çizelge 4.20., Çizelge 4.21.'de her ekstrenin antimutajenite test sonuçları görülmektedir.

*A. vestita* ekstreleri antimutajenik etki açısından değerlendirildiğinde AVP'nin TA98 suşu üzerinde antimutajenik etki göstermediği, TA100 suşu üzerinde 500 µg/petri dozda %91 inhibisyonla en yüksek antimutajenik etkiyi gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.16.).

AVA, TA98 suşu üzerinde en yüksek etkiyi 25 µg/petri dozda (%13 inhibisyon) gösterirken TA100 suşu üzerinde en iyi etkiyi 500 µg/petri (%77 inhibisyon) ve 10 µg/petri (%63 inhibisyon) dozlarında göstermiştir (Çizelge 4.17.).

AVM, TA98 suşu üzerinde en yüksek etkiyi 250 µg/petri dozda (%31 inhibisyon) gösterirken TA100 suşu üzerinde en iyi etkiyi 100 µg/petri, 250 µg/petri ve 500 µg/petri (sırasıyla %59, %58, %59 inhibisyon) dozlarında göstermiştir (Çizelge 4.18.).

Genel olarak değerlendirildiğinde *A. vestita* ekstrelerinin TA 100 suşunda TA 98 suşuna göre daha yüksek antimutajenik aktivite gösterdiği görülmektedir.

**Çizelge 4.16.** AVP'nin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
		% İnhibisyon		% İnhibisyon
0 µg/petri	660±34	%0	1302±80	%0
10 µg/petri	652±41	%1.24	766±23	%46.36
25 µg/petri	670±54	-%1.61	961±16	%29.46
50 µg/petri	682±29	-%3.61	902±24	%34.54
100 µg/petri	599±70	<b>%9.81</b>	782±71	%44.92
250 µg/petri	686±16	-%4.26	777±41	%45.35
500 µg/petri	650±72	%1.56	241±81	<b>%91.75</b>
750 µg/petri	650±30	%1.61	701±21	%51.96
1000 µg/petri	654±16	%0.86	909±38	%33.93
(-)Kontrol	612±95	%7.65	1224±31	%6.68
Kontrol	42±2.1	%99.94	146±6	%99.95

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması± standart sapma ve % inhibisyon olarak verilmiştir  
 (-) Kontrol: DMSO

**Çizelge 4.17.** AVA'nın *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
		% İnhibisyon		% İnhibisyon
0 µg/petri	660±34	%0	1302±80	%0
10 µg/petri	645±86	%2.37	562±20	<b>%63.95</b>
25 µg/petri	577±57	<b>%13.43</b>	920±58	%33.04
50 µg/petri	630±18	%4.74	941±87	%31.19
100 µg/petri	706±28	-%7.44	1173±170	%11.13
250 µg/petri	683±44	-%3.82	982±155	%27.68
500 µg/petri	646±46	%2.26	403±38	<b>%77.76</b>
750 µg/petri	637±11	%3.66	961±56	%29.46
1000 µg/petri	661±9	-%0.26	992±18	%26.78
(-)Kontrol	612±95	%7.65	1224±31	%6.68
Kontrol	42±2.1	%99.94	146±6	%99.95

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması± standart sapma ve % inhibisyon olarak verilmiştir  
 (-) Kontrol: DMSO

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

**Çizelge 4.18.** AVM'nin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
		% İnhibisyon		% İnhibisyon
0 µg/petri	660±34	%0	1302±80	%0
10 µg/petri	632±46	%4.24	798±89	%43.54
25 µg/petri	711±26	-%8.30	1075±67	%19.60
50 µg/petri	654±72	%0.91	855±48	%38.63
100 µg/petri	656±30	%0.59	616±11	<b>%59.28</b>
250 µg/petri	466±98	<b>%31.28</b>	625±7	<b>%58.56</b>
500 µg/petri	619±20	%6.63	619±90	<b>%59.41</b>
750 µg/petri	617±22	%6.85	815±26	%40.91
1000 µg/petri	615±30	%7.22	848±18	%40.36
(-)Kontrol	612±95	%7.65	1224±31	%6.68
Kontrol	42±2.1	%99.94	146±6	%99.95

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması± standart sapma ve % inhibisyon olarak verilmiştir  
(-) Kontrol: DMSO

*A. xyloirrhiza* ekstreleri antimutajenik etki açısından değerlendirildiğinde; AXP'nin TA98 suşu üzerinde 10 µg/petri dozda %36 inhibisyonla, TA100 suşu üzerinde 500 µg/petri dozda %90 inhibisyonla en yüksek etkiyi gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.19.).

AXA, TA98 suşu üzerinde en yüksek etkiyi 50 µg/petri dozda (%9 inhibisyon) gösterirken TA100 suşu üzerinde en iyi etkiyi 500 µg/petri dozda %80 inhibisyonla göstermiştir (Çizelge 4.20.).

AXM, TA98 suşu üzerinde en yüksek etkiyi 10 µg/petri dozda (%6 inhibisyon) gösterirken TA100 suşu üzerinde en iyi etkiyi 250 µg/petri (%73 inhibisyon) ve 500 µg/petri (%70 inhibisyon) dozlarında göstermiştir (Çizelge 4.21.).

Her iki suş üzerindeki antimutajenite sonuçlarını genel olarak değerlendirildiğinde *A. xyloirrhiza* ekstrelerinin TA100 suşu üzerinde TA98 suşuna göre daha yüksek antimutajenik aktivite gösterdiği görülmektedir.

**Çizelge 4.19.** AXP'nin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
		% İnhibisyon		% İnhibisyon
0 µg/petri	660±34	%0	1302±80	%0
10 µg/petri	436±35	<b>%36.24</b>	685±50	%53.34
25 µg/petri	630±18	%4.74	786±28	%44.63
50 µg/petri	598±72	%9.92	558±73	%64.30
100 µg/petri	650±70	%1.51	578±39	%62.62
250 µg/petri	558±23	%16.45	416±25	%76.58
500 µg/petri	568±68	%14.77	257±29	<b>%90.39</b>
750 µg/petri	583±11	%12.35	778±30	%45.27
1000 µg/petri	600±19	%9.65	907±28	%34.16
(-)Kontrol	612±95	%7.65	1224±31	%6.68
Kontrol	42±2.1	%99.94	146±6	%99.95

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması± standart sapma ve % inhibisyon olarak verilmiştir  
 (-) Kontrol: DMSO

**Çizelge 4.20.** AXA'nın *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
		% İnhibisyon		% İnhibisyon
0 µg/petri	660±34	%0	1302±80	%0
10 µg/petri	636±5	%3.88	716±20	%50.63
25 µg/petri	687±20	-%4.42	598±28	%60.89
50 µg/petri	604±31	<b>%9.06</b>	696±5	%52.42
100 µg/petri	638±19	%3.47	570±14	%63.26
250 µg/petri	609±31	%8.17	627±16	%58.39
500 µg/petri	621±28	%6.31	366±50	<b>%80.96</b>
750 µg/petri	647±34	%2.10	692±8	%52.71
1000 µg/petri	651±37	%1.34	690±10	%52.94
(-)Kontrol	612±95	%7.65	1224±31	%6.68
Kontrol	42±2.1	%99.94	146±6	%99.95

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması± standart sapma ve % inhibisyon olarak verilmiştir  
 (-) Kontrol: DMSO



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

**Çizelge 4.21.** AXM'nin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile antimutajenite testi sonuçları<sup>a</sup>

Dozlar	TA98		TA100	
		% İnhibisyon		% İnhibisyon
0 µg/petri	660±34	%0	1302±80	%0
10 µg/petri	619±4	<b>%6.63</b>	709±73	%51.26
25 µg/petri	691±15	-%5.01	524±80	%67.24
50 µg/petri	662±29	-%0.32	657±69	%55.73
100 µg/petri	667±15	-%1.13	627±52	%58.39
250 µg/petri	660±14	%0	447±31	<b>%73.93</b>
500 µg/petri	625±7	%5.66	486±44	<b>%70.58</b>
750 µg/petri	648±32	%1.94	771±19	%45.87
1000 µg/petri	649±11	%1.97	786±17	%44.60
(-)Kontrol	612±95	%7.65	1224±31	%6.68
Kontrol	42±2.1	%99.94	146±6	%99.95

a: Sonuçlar geri dönen koloni sayısı ortalaması± standart sapma ve % inhibisyon olarak verilmiştir

(-) Kontrol: DMSO

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda *Ajuga vestita* ve *Ajuga xylorrhiza* bitkilerinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının bazı biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir.

İlk olarak ekstraların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle yapılan çalışmada genel olarak ekstraların test edilen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal açıdan çok aktif olmadıkları görülmektedir. Ancak bazı ekstralar (AVA, AVM, AXA) *S. pyogenes* üzerinde orta derecede aktivite göstermiştir (Çizelge 4.1., Çizelge 4.2.). Bu değerlerin de pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerden olan Vankomisin'in *S. pyogenes* üzerinde gösterdiği antimikrobiyal etkiden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde *A. xylorrhiza* aseton ekstresinin *E. coli* üzerinde orta derecede, metanol ekstresinin de *P. aeruginosa* üzerinde düşük derecede aktivite gösterdiği belirlenmiştir ki, bu değerlerin Vankomisin'in aynı mikroorganizmalar üzerindeki etkisinden daha yüksek olduğu görülmektedir. (Çizelge 4.2., Çizelge 4.3.). Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin çalışılan mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri karşılaştırıldığında, antibiyotiklerin her mikroorganizma üzerinde farklı derecede aktivite gösterdiği veya aktivite göstermediği görülmektedir. Bu açıdan bakıldığında; ekstraların farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin araştırılmasının farklı sonuçlar elde edebilmek adına faydalı olacağını düşündürmektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler temel alınarak daha geniş mikroorganizma yelpazesinde ekstraların antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması önerilmektedir.

Fenolikler, diyet yoluyla alınan, ateroskleroz ve kanser inhibisyonu ile ilişkili bileşiklerin büyük bir grubunu oluşturmaktadır (Williams ve Iatropoulos 1997). Polifenolik bileşikler açısından zengin sebze ve meyvelerin günlük tüketiminin insanda mutagenез ve kanserogenezi inhibe edici etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Tanaka ve ark. 1998). Flavonoidlerin antimikrobiyal, antitrombotik, antimutajenik, antikanserojenik gibi farmakolojik ve biyokimyasal aktivitelerde rol aldığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Cook ve Samman 1996, Kandaswami ve Middleton 1997, Sahu ve Green 1997). Fenolik bileşikler antioksidatif etkiye doğrudan katkıda bulunabilmektedirler (Duh ve ark. 1999). Antioksidan aktivitenin fenolik madde içeriği

ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (Velioglu ve ark. 1998). Bu nedenle, toplam fenolik içerik ekstraların antioksidan etkinliği açısından önem arz etmektedir.

Ekstreler toplam fenol ve flavonoid miktarı açısından değerlendirildiğinde metanol ekstralarının fenolik madde açısından diğer ekstralardan daha zengin olduğu, *A. vestita* metanol ekstresi ile *A. xylorrhiza* aseton ekstresinin flavonoid miktar açısından diğer ekstralardan daha zengin olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, çalışılan bitkilerin aseton ve metanole yakın polaritedeki fenolik ve flavonoid madde açısından daha zengin olduğunu göstermektedir. Bu veriler ışığında metanol ve aseton ekstralarının kromatografik yöntemlerle sekonder metabolitlerinin saflaştırılıp elde edilen maddelerin spektroskopik yöntemlerle yapı tayinini yapılabileceği önerilmektedir. Literatürde çalıştığımız söz konusu endemik bitkiler ile ilgili herhangi bir biyolojik aktivite veya kimyasal analiz sonucuna ulaşamamış olması da bu durumun gerekliliğini desteklemektedir. Buradan yola çıkılarak, bu tez çalışmasına paralel olarak yürütülen TÜBİTAK (proje no:111T581) tarafından desteklenen ‘Diyarbakır Çevresinde Yetişen Endemik *Ajuga vestita* Ekstresinin Sekonder Metabolitlerinin ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi’ konulu proje ile *Ajuga vestita* BOISS. ekstralarının sekonder metabolitleri kromatografik tekniklerle izole edilerek spektroskopik yöntemlerle metabolitlerin yapı tayini yapılmış ve aktiviteden sorumlu maddelerin belirlenmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir.

Antioksidan aktivite testleri literatürde yer alan çeşitli metodlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bitki ekstralarının, farklı fonksiyonel gruplara sahip onlarca bileşiğin karışımı halinde olması sebebiyle içerdiği bileşiklerin polarite ve kimyasal davranışlarına bağlı olarak; ekstralar uygulanan test sisteminde farklı sonuçlar verebilmektedirler. Bu nedenle ekstraların antioksidan potansiyellerinin değerlendirilmesinde birden fazla test sonucuna göre değerlendirme yapılması gereklidir. Bu çalışmada antioksidan aktivite  $\beta$ -karoten renk açılım, DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, ABTS (katyon giderim aktivitesi) ve CUPRAC yöntemi olmak üzere dört farklı testle belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında ekstraların genel olarak yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Öyle ki;  $\beta$ -karoten renk açılım ve DPPH serbest radikal giderim aktivitesi bakımından bazı ekstralar (AVA, AVM, AXM ) pozitif kontrol olarak kullanılan BHT’den daha yüksek aktivite göstermiştir (Çizelge 4.5., Çizelge 4.6.). Aynı şekilde CUPRAC yönteminde de AVM,

pozitif kontrol olarak kullanılan  $\alpha$ -tokoferolden daha yüksek aktivite göstermiştir (Çizelge 4.8.). ABTS (katyon giderim aktivitesi) yöntemine göre her iki bitkinin petrol eteri ekstraları düşük aktivite göstermiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda söz konusu bitki ekstralarıyla yapılmış olan antioksidan aktivite çalışmalarının sonuçları umut verici kabul edilmektedir. Günümüzde, geleceğe yönelik sentetik antioksidanların yerini alabilecek doğal antioksidan arayışları hızla sürmektedir. Bu tip çalışmalarla yüksek antioksidan aktiviteye sahip bitki ekstraları belirlenerek, bunların gıda sistemlerindeki antioksidan etkilerinin incelenmesi ile çalışmaların endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığı sağlanabilmektedir.

Ekstraların antikolinesteraz aktiviteleri Ellman metoduna göre belirlenmiş olup AChE ve BChE % inhibisyonuna göre değerlendirme yapılmıştır. AChE inhibisyonunda bazı ekstralar (AVP, AVA, AXM) Alzheimer hastalığı tedavisinde ilaç olarak kullanılan Galantamin'e çok yakın değerlerde aktivite gösterirken, BChE inhibisyonunda Galantamin'den daha düşük aktivite göstermiştir. Her iki enzim inhibisyonunda da *A. vestita* aseton ekstresi en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Yüksek antikolinesteraz aktiviteye sahip ekstraların aynı zamanda yüksek antioksidan aktiviteye de sahip olduğu dikkat çekicidir. Oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk adımlarından biri olup, hastalıkta patojenik bir rol oynama durumuna sahip olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiş ve bu da antioksidanların hastalığı tedavi etme potansiyeline sahip olabileceğini akıllara getirmiştir (Leo ve ark. 2006). Bu düşüncede çok yönlü ilaçların yararları savunulmakta ve bu da yeni, doğal kaynaklı anti-AChE/BChE ve antioksidan ilaç araştırmalarına hız katmaktadır. Son yıllarda antioksidan-antikolinesteraz aktivite ilişkisi ve aktiviteden sorumlu bileşiklerin izole edilmesi üzerine çalışmalar hız kazanmıştır. Bu açıdan çalışılan bitkilerin yüksek antioksidan-antikolinesteraz aktivitesiyle Alzheimer hastalığı tedavisinde yeni ajanlar bulunmasına katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Loizzo ve arkadaşları (2009), iki *Origanum* türünün uçucu yağını antioksidan, antiinflamatuar ve antikolinesteraz aktiviteleri yönünden araştırmışlardır. Araştırmacılar antioksidan aktivite belirlemede DPPH ve  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemlerini kullanırken, antikolinesteraz aktiviteyi belirlemede Ellman metodunu kullanmışlardır. Her iki bitki uçucu yağının yüksek antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Orhan ve arkadaşları (2011), beş *Pinus* türünün (*Juniperus communis* ssp. *nana*, *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus*, *Juniperus sabina*, *Juniperus foetidissima*, ve *Juniperus excelsa*) yaprak, olgun meyve ve genç meyvelerinden elde edilen su ve etanol ekstralarını antikolinesteraz ve antioksidan aktivite açısından araştırdıkları çalışmalarında; ekstraların AChE inhibisyonu açısından aktivite göstermezken *J. foetidissima* yaprak-su ekstresinin BChE inhibisyonu açısından yüksek aktivite gösterdiğini (%93.94) ve çalışılan ekstralardan yaprak-su ekstralarının yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Adewusi ve arkadaşları (2011), Kuzey Afrika'da geleneksel tedavide kullanılan bazı bitkileri (*Salvia tiliifolia* Vahl., *Chamaecrista mimosoides* L., *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. ve *Schotia brachypetala* ) antikolinesteraz ve antioksidan aktivite açısından araştırdıkları çalışmalarında; çalışılan tüm bitki ekstralarının antikolinesteraz aktivite gösterdiğini ancak *C. mimosoides* ekstresinin en yüksek AChE inhibisyonu aktivitesine sahip olduğunu ( $IC_{50}=0.03\pm 0.08$  mg/ml) ve *B. salviifolia* ekstresinin de en yüksek antioksidan aktiviteye (ABTS;  $IC_{50}=0.14\pm 0.08$  mg/ml ve DPPH;  $IC_{50}=0.23\pm 0.01$  mg/ml) sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Küpeli Akkol ve arkadaşları (2012), *Citrus laurifolius* yapraklarından elde ettikleri etanol ekstresinin hegzan, kloroform, etil asetat, su ve bütanol fraksiyonlarının antikolinesteraz ve antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. En yüksek AChE inhibisyonunu (%80 inhibisyon, 200 µg/ml) etanol ekstresinin, DPPH ve FRAP yöntemlerinde en iyi antioksidan aktiviteyi ise etil asetat fraksiyonunun gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ekstraların mutajenik ve antimutajenik özellikleri Ames *Salmonella*/mikrozom test sistemine göre belirlenmiştir. Ames'e (1972) göre mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his<sup>-</sup> durumundan his<sup>+</sup> durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 30–50 revertant/plak; TA100 için 75–200 revertant/plaktır. Çalışmamızda belirlenen revertant koloni sayıları uygun değerde bulunmuştur. Revertant koloni sayıları; kullanılan MGA bileşimi içine giren glukoz ve tuz çözeltisinin derişimi ile glukoz–6-fosfat, β-NADP, fosfat tamponu, plaklardaki MGA'nın hacmi, top agarın miktarı ve yayılma şekli, ortamdaki hava sirkülasyonu ve sıcaklığı, etüvdeki nem oranı, S9 fraksiyonunun miktarı gibi

farklılıklardan dolayı değişebilmektedir. Ekstrelerin denenen tüm dozlarda *S. typhimurium*'un her iki suşunda S9 varlığında ve yokluğunda koloni sayısında artışa sebep olmadığı ve dolayısıyla mutajenik etki göstermediği saptanmıştır. (Çizelge 4.10., 4.11., 4.12., 4.13., 4.14., 4.15.).

Bu çalışmayla, çalışılan ekstrelerin *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde çerçeve kayması, TA100 suşu üzerinde de baz çifti değişimi mutasyonunu indüklediği ortaya konulmuştur.

Ekstreler antimutajenik açıdan değerlendirildiğinde, ekstrelerin TA98 suşu üzerinde gösterdikleri inhibisyon oranı genel olarak düşük bulunmuştur. TA100 suşu üzerinde antimutajenik aktivite petrol eteri, aseton ve metanol sırasına göre bulunmuştur. Petrol eteri ekstrelerinin %90 oranında antimutajenik etki gösterdiği saptanmıştır. Ekstrelerin TA98 suşu üzerinde gösterdikleri antimutajenik inhibisyon oranları, TA100 göre daha düşük bulunmuştur. Bu da çerçeve kayması mutasyonuna sahip olan suşun (TA98), baz değişikliği mutasyonuna (TA100) sahip olan suşa göre daha kararlı olduğunu göstermektedir.

Literatüre bakıldığında bitki ekstreleriyle yapılan çalışmalar çalışmamızla birçok yönden uyum göstermektedir. Edenharder ve arkadaşları (1993), flavonoidlerin ve flavonoid yapı benzerleri maddelerin konsantrasyona bağımlı veya bağımsız antimutajenik etki gösterebileceğini bildirmişlerdir.

Zahin ve arkadaşları (2010) çalışmalarında, nar (*Punica granatum*) kabuğu ekstrelerinin antioksidan ve antimutajenik etkilerini araştırmıştır. Metanol, etanol, aseton ve etil asetat ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri DPPH, FRAP ( $Fe^{3+}$  indirgeme gücü), fosfomolibden ve CUPRAC yöntemleriyle belirlenmiş ve en iyi aktivitenin metanol ekstresinde tespit edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada elde edilen umut verici antioksidan aktivite sonuçlarını temel alarak metanol ekstresini Ames *Salmonella* / mikrozom test sistemiyle antimutajenik açıdan araştırmıştır. Ekstrenin test suşları (TA97a, TA98, TA100 ve TA102) üzerinde mutajenik etki göstermediği, sodyum azid ve metil metan sülfonata karşı %66.76 – 91.86, 2-AF ve benzo(a)Pirene karşı %81.2-88.58 arasında inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir.

Sghaier ve arkadaşları (2011) çalışmalarında *Teucrium ramosissium* bitkisinin total oligomer flavonoit, etil asetat ve petrol eteri ekstrelerinin *S. typhimurium* TA98,

TA100 ve TA1535 suşları üzerindeki mutajenik ve antimutajenik etkileri ile antioksidan aktivitelerini araştırmış ve antimutajenik etki ile antioksidan aktivite arasındaki korelasyona dikkat çekmiştir. Araştırmacılar ekstrelerin çalışılan suşlar üzerinde mutajenik etkiye sahip olmadıklarını, bununla birlikte etil asetat ve petrol eteri ekstresinin TA98 suşu üzerinde %92.25 inhibisyon, etil asetat ekstresinin TA100 suşu üzerinde % 83.22 inhibisyon oranıyla yüksek antimutajenik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ekstrelerin aynı zamanda DPPH ve ABTS yöntemleriyle antioksidan aktivitelerinin de araştırılmış olup yüksek aktivite sonuçları elde edildiği bildirilmiştir.

Vinod ve arkadaşları (2011) *Azadirachta indica* bitki tohumlarının mutajenik ve antimutajenik aktivitelerini Ames *Salmonella*/mikrozom ve fare kemik iliği mikronükleus testi ile araştırmışlardır. Araştırmacılar *Salmonella*/mikrozom testinin farklı suşlar üzerinde (TA1535, TA1537, TA98, TA100 ve TA102) S9 varlığı ve yokluğunda gerçekleştirildiğini, tohumların uçucu yağının ve bu yağdan elde ettikleri DMSO ekstresinin her iki test sisteminde de mutajenik etki göstermediğini, ayrıca uçucu yağın DMSO ekstresine göre daha iyi antiutajenik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Mutajenler tarafından oluşturulan hasara karşı korumada iki görüş mevcuttur. Bunlardan biri; kanserojenlerin pirol pigmentlerinde (hemin ve klorofilin gibi) absorbe olmasına benzer şekilde bitki ekstralarının de mutajenleri absorbe edebiliyor olmalarıdır (Ferguson ve ark. 2004, Ikuma ve ark. 2006). Diğeri ise; bitki ekstralarının alkilenmiş DNA bazlarını onarma yeteneğine sahip DNA glikozilaz enzimini indükleyebilir olması görüşüdür (Steele ve Kelloff 2005).

Mikrozomal enzim aktivasyonu sürecinde DNA'da zincir kırıklarına sebep olabilen birçok metabolik ara ürün ve reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bitki ekstraları mikrozomal enzim aktivasyonunu engelleyebilir veya DNA'yı doğrudan elektrofilik kanserojenik metabolitler ve ara ürün olarak oluşan diğer mutajenlerden koruyabilmektedirler (Harris ve ark. 2003). Böylece enzim fonksiyonunda meydana gelen bir bozukluk, mutajen ve kanserojen metebolizmasında değişime uğramış reaksiyon hızı ve farklı reaksiyon yollarıyla sonuçlanır. Bazı durumlarda bu modifikasyon kimyasal nedenlerle oluşmuş mutajeneze karşı koruma sağlamaktadır. Bu etkinin bazı bitki ekstralarının antimutajenik aktivitelerinde rol oynadığı bilinmektedir (Horn ve Ferrao 2003). Bitki ekstraları DNA'yı mutajenlerin elektrofilik

metabolitlerinden koruyabilmektedirler. Ekstrelerde bulunan flavonoidler güçlü nükleofilik merkezler oluştururlar ki; bu da onların elektrofilik mutajenlerle reaksiyona girerek genotoksik hasarın önlenmesiyle sonuçlanır (Marnewick ve ark. 2000).

Sonuç olarak; Diyarbakır çevresinde yetişen endemik *Ajuga vestita* BOISS. ve *Ajuga xylorrhiza* KIT TAN bitkilerinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının antimikrobiyal, antioksidan, antikolinesteraz aktiviteleri ile mutajenik ve antimutajenik özelliklerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında antioksidan, antikolinesteraz, mutajenik ve antimutajenik aktivite açısından elde edilen sonuçlar umut vadeci kabul edilmektedir. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip ekstraların gıda sistemlerindeki antioksidan etkilerinin incelenmesi ile ekstraların endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığının sağlanabileceği ve aynı şekilde yüksek antikolinesteraz aktivitesiyle Alzheimer hastalığı tedavisinde yeni ajanlar bulunmasına katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışılan bitkilerin endemik bitkiler olmasıyla çalışmamız sahip olduğumuz doğal zenginliğin çok yönlü kullanımını ortaya koyması açısından önem taşımaktadır. Çalışılan bitkilerin söz konusu biyolojik özelliklerinin ilk kez bu çalışmayla araştırılıyor olması, çalışmanın özgün değerini arttırmaktadır.





## 6. KAYNAKLAR

Abbasi, A.M., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M., Khan, H., Muhammad, N. and Sultana, S. 2009. Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation. *African Journal of Biotechnology*, 8 (8): 1643-1650.

Abdullaev, F.I., Riverón-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Hernández, J.M., Pérez-López, I., Pereda-Miranda, R., Espinosa-Aguirre, J.J. 2003. Use of *in vitro* assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology in Vitro*, 17: 731-736.

Adewusi, E.A., Moodley, N., Steenkamp, V. 2011. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 77: 638–644.

Aeschbacher, H. V., Friedrich, U., Seiler, J. P. 1983. Criteria for the standardization of salmonella mutagenicity test. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 3: 195-203.

Akın, A., Sümer, S. 1989. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat ve sodyum nitratın *Salmonella* / mikrozom test sisteminde mutajenik etkilerinin araştırılması. *Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10: 21-27.

Akın, A. 1990. Bazı gıda katkı maddelerinin *Salmonella*/ mikrozom test sistemi ile mutajenik etkilerinin saptanması. Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Akın, D. 2010 *Celtis glabrata*'nın Bazı Ekstraktlarının Ames/Salmonella Mikrozom Test Sistemi ile Antimutajenik Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya. 49.

Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R. and Perticone, P. 1999. DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells *in vitro*. *Mutation Research*, 429: 239-248.

Al-Batina, B.A., Maslat, A. O., Al-Kofahl, M.M. 2003. Element analysis and biological studies on ten oriental spices using XRF and Ames test. *J. Trace Elem in Med. Biol.*, 17(2):85-90.

Alho, H., Leinonen, J. 1999. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods in Enzymol*, 299: 3-14.

Aliotta, G., Pollio, A. 1994. Useful plants in renal therapy according to Pliny the elder. *Am. J. Nephrol.*, 14: 399-411.

Alzheimer, A. 1906. Uber einen eigenartigen schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde. *Zentralbl Nervenkrankheiten*, 25:1134.

Ames, B.N. 1972. A Bacterial systems for detecting mutagens and carcinogens. Editörler; E.H. Sutton, and I.M. Haris, *Mutagenic Effects of Environmental Contaminants* Academic Press, New 57-66.York.

Ames, B. M., Shigena, M. K., Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antiacidants and the degenerative diseases of ageing. *Proceedings of national Academy of Sciences USA*, 90: 7915-7922.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, 70: 2281-2285.

Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E. 1973b. An improved bacterial test systems for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 782-786.

Ames, B. N., Mc. Cann, J., Yamasaki, E. 1975. Methods for detection carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31: 347-364.

Ancos, B., Gonzalez, E. M., Cano, M.P. 2000. Ellagic Acid, Vitamin C and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4565-4570.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J Agric Food Chem*, 52: 7970–7981.

Aruoma, O. I., Cuppett, S. L. 1997. Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. AOCS Press, 241.

Astorg, P., Gradelet, S., Berges, R., Suschetet, M. 1997. Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutrition Cancer*, 29: 60-68.

Backhouse, N., Delporte, C., Apablaza, C., Farías, M., Goity, L., Arrau, S., Negrete, R., Castro, C., Miranda, H. 2008a. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 160-165.

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

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

Barcelos, G.R.M., Angeli, J.P.F., Serpeloni, J.M., Rocha, B.A., Mantovani, M.S., Antunes, L.M.G. 2009. Effect of Annatto on Micronuclei Induction by Direct and Indirect Mutagenesis in HepG2 Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50: 808-814.

Barış, Ö. 2004. Doğu Anadolu Bölgesinde Yetişen Bazı *Salvia* Türlerinin Biyolojik Aktivite ve Genetik Profillerinin Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Barış, A. 2007. Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.

- Başer, K. H. C. 1994. Essential Oil of Labiatae from Turkey:Recent Results. *Lamiales Newsletter*, 3: 6-11.
- Başer, K.H.C., Kırimer, N. 2006. Essential Oils of Lamiacea Plants of Turkey. *Acta Horticulturae*, 723: 163–171.
- Baytop, T. 1984. Therapy with Medicinal Plants (Past and Present); Istanbul University Publications, Sayfa:298- 416, İstanbul.
- Baytop, A. 1996. Farmasötik Botanik Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 3637, İstanbul.
- Beudet, A. L., Roufa, A. J., Cassay, C. T. 1973. Mutations effecting the structure of hypoxanthine guanin phosphoribosyltransferase in cultered Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70: 320-324.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”; the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239: 70-76.
- Berić, T., Nikolić, B., Stanojević, J., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J. 2008. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 724-732.
- Berlett, B. S., Stadtman, E. R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stres. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 20313- 20316.
- Bhuvanewari, V. and Nagini, S. 2005. Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Current Medicine Chemical Anticancer Agents*, 5: 627-635.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Branen, A.L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 52: 59-63.
- Brennan, R. J., Schiestl, R.H. 2004. Detecting Carcinogens With the Yeast DEL Assay. *Methods in Molecular Biology*, 262: 111-124.
- Brockman, H. E., Serres, I. J., Ong, T.M., DeMarini, D.M., Katz, A.J., Griffiths, A.J., Stafford, R.S. 1984. Mutation test in *Neurospora crassa*. *Mutat. Res.*, 133: 87-134.

Brown, T.A. 2007. Genomes 3. Garland Science Publishing, Sayfa:713. New York, USA.

Bryan, B., Timothy, M., Poul, T. 1993. General Applied Toxicology. Macmillan, 2: 897-898.

Cadenas, E., Davies, K. J. A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29: 222–230.

Cameron, I.L., Munoz, J., Barnes, J.C., Hardman, E.W. 2003. High dietary level of synthetic vitamin E on lipid peroxidation, membrane fatty acid composition and cytotoxicity in breast cancer xenograft and in mouse host tissue. *Cancer Cell International*, 3 (3): 1-8.

Camps, F., Coll, J. 1993. Insect allelochemicals from *Ajuga* plants. *Phytochemistry*, 32: 1361-1370.

Cantrell, C.L., Rajab, M.S., Franzblau, S.G., Fronczek, F.R., Fisher, N.H. 1999. Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. *Planta. Med.*, 65:732-734.

Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Bio Med*, 14: 303-311.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3426-3431.

Cao, G., Prior, R.L. 1999. In Vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Bio Med*, 27: 1173-1181.

Chai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004. Antioksidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, 74: 2157-2184.

Chandel, S., Bagai, U. (2011) Screening of antiplasmodial efficacy of *Ajuga bracteosa* Wall ex. Benth. *Parasitol Res*, 108:801–805.

Chenni, A., Yahia, D.A., Boukourt, F.O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M. 2007. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma

lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *J. Ethnopharmacol.*, 109:207-213.

Chung, T. K., Stevens, E. S. 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews in Microbiology*, 18 (3): 175-190.

Cimanga, R.K., Kambu, K., Tona, L., Hermans, N., Apers, S., Totté, J., Pieters, L., Vlietnick, A.J. 2006. Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 83-90.

Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., Zeiger, E. 1987. Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome test for bacterial Mutagenicity. *Mutat. Res.*, 189: 83-91.

Coll, J., Tandron, Y.A. 2008. *Neo-clerodane* diterpenoids from *Ajuga*: structural elucidation and biological activity. *Phytochem. Rev.*, 7: 25-49.

Cook, N.C., Samman, S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J Nutr Biochem*, 7:66-76.

Cosentino, M., Bombelli, R., Carcano, E., Luini, A., Marino, F., Crema, F., Dajas, F., Lecchini, S. 2008. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: A study on human leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 501-507.

Czy'z, A., Szpilewska, H., Dutkiewicz, R., Kowalska, W., Biniewska Godlewska, A., Wegrzyn, G. 2002. Comparison of the Ames test and a newly developed assay for detection of mutagenic pollution of marine environments. *Mutat. Res.*, 519: 67-74.

Dağcı, E.K., İzmirli, M., Dığrak, M. 2002. Kahramanmaraş İlinde Yetişen Bazı Ağaç Türlerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 5(1): 38-46.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329: 23-38.

Daniel, S. A., Kornecook, T. J., Bastianetto, S., Quirion, R. 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to  $\beta$ -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies, *Neurobiology*, 68: 209–245.

Davies, K. J. A. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 50:279-289.

Davis, P. H., 1988. Flora of Turkey and The East Aegaen Islands. Edinburg University Press,10.

Davis, S.C., Perez, R. 2009. Cosmeceuticals and natural products: wound healing. *Clinics in Dermatology*, 27: 502-506.

De Groot H., Rauen U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 12: 249-255.

Delazar, A., Delnavazi, M.R., Yassa, N., Parkhideh, S., Delazar, N., Nahar, L., Sarker S.D. 2012. Essential oil composition and isolation of free-radical-scavenging phenolic glycosides from the aerial parts of *Ajuga chamaepitys* growing in Iran. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(2): 299-305.

Demirel, S., Zamani, A.G. 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3): 123-127.

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

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. ve Almeida, L. M. 1994. Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315: 161-169.

Duh, P.D., Tu, Y.Y., Yen, G.C. 1999. Antioxidant activity of water extract of harn jyu (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT Food Sci Technol*, 32:269–277.

Edenharder, R., Petersdorff, I.V., Rauscher, R. 1993. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutat. Res.*, 287: 261–274.



Elesperu, E., Yarmolinsky, M. B. 1979. A colorimetric assay of lizogenic induction designed for screening potential carcinogenetic and carcinostatic agents. *Environ. Mutagen.*, 1: 65-78.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*, 7: 88-95.

Ercan, Z. S. 2002. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Kolinesteraz İnhibitörleri. *Demans Dergisi*, 2: 5-9.

Evandri, M.G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P., Mazzanti G. 2005. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 1381-1387.

Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567: 1-61.

Feil, R., Metzger, D. 2007. Conditional Mutagenesis: An Approach to Disease Models. Springer, Yayın No:178, Sayfa:500. Heidelberg, Germany.

Feilberg, A., Nielsen, T., Binderup M.L., Skov, H., Poulsen, M.W.B. 2002. Observations of the effect of atmospheric process on the genotoxic potency of airborne matter. *Atmospheric Environment*, 36: 4617-4625.

Fenech, M. 1993. The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 101 (3), 101-107.

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

Franke, S.I.R., Ckless, K., Silveira, J.D., Rubensam, G., Brendel, M., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. 2004. Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chemistry*, 88: 45-55.

Fridovich, I. 1986. Superoxide Dimutases. *Meth. Enzymol*, 58: 61-97.

Gentile, M.J., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, J.G., Ferguson, L.R. 1998. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutation Research*, 402: 289-298.

Gomes, M. R. 1998. Mutagenicity testing 1,8-cineple, citral, citroneal, menthol and terpineal with *Salmonella* microsome assay. *Mutat Res.*, 416 (1): 129-136.

Gomes, M. R. 2005. Evaluation of beta-myricene, alpha-terpinene alpha pinen in *Salmonella* microsome assay. *Food and Chem. Toxicol.*, 43(2): 247-252.

Gottwald, M. D., Rozanski, R. I. 1999. Rivastigmine a brainregion selective acetylcholinesterase inhibitor for treating Alzheimer's disease: review and current status. *Expert Opin. Invest. Drugs*, 8:1673-1682.

Gören, A.C., Zhou, B.N., Gülaçtı, T., Kökdil, G., Kingston, D.G. 2005. DNA damaging activities of methanol extract of *Ajuga reptans* and iridoid glucoside reptoside. *Natural Product Research*, 19 (5) : 457-460.

Green, M. H. L., Muriel, W. J. 1976. Mutagen testing using Trp<sup>+</sup> reversion in *E. Coli*. *Mutat. Res.*, 38: 3-32.

Gulluce, M., Agar, G., Baris, O., Karadayi, M., Orhan, F., Sahin, F. 2010. Mutagenic and Antimutagenic Effects of Hexane Extract of some *Astragalus* species Grown in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Phytotherapy Research*, 24: 1014-1018.

Gulluce, M., Karadayi, M., Guvenalp, Z., Ozbek, H., Arasoglu, Baris, O. 2012. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare* and determination of their genotoxic potentials. *Food Chemistry*, 130: 248-253.

Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83: 371-382.

Gülçin, İ. 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56: 491-499.

Gümüş, F., İzgü, F. Algül, Ö. 1996. Sythesis and structural characterization some 5(6)-substitued-2-hydroxymethylbenzimidazoles derivates and their platinum(II) complexes and determination of their in vitro antitumor activities by rec-assay test. *Fabad J. Pharm. Sci.*, 21: 7-15.

Halliwell, B., Gutteridge J.M.C. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, 543, Oxford.

Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev*, 52: 253–265.

Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 16: 845-850.

Harris, C.C., Vahakangas, K., Newman, M.J., Trivers, G.E., Del Carmen Hernandez-Preteline, M., Dominguez-Ortiz, M.A., Fattel-Fazenda, S., Vialla-Trevino, S. 2003. Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of Rhoe discolor ethanolic crude extract. *Toxicology in Vitro*, 17: 77–83.

Hartman, R. E. 2010. Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer’s Disease Pathology. Taylor& Francis Group, Chapter 16.

Hoareau, L., DaSilva, E.J. 1999. Medicinal plants: a re-emerging health aid. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 2 (2): 56-70.

Horn, R.C., Ferrao, V.V.M. 2003. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutagenesis*, 18: 113–118.

Horn, R.C., Vargas, V.M.F. 2003. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis*, 18 (2): 113-118.

Hsu, T.Y., Sheu, S.C., Liaw, E.T., Wang, T.C., Lin, C.C. 2005. Antioxidant activity and effect of *Pinus morrisonicola* on the survival of leukemia cell line U937. *Phytomedicine*, 12: 663–669.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 53: 1841–1856.

IARC, 1980. Monographs on the carcinogenic risks of chemicals to humans. Supp. Z. Long Term Screening Assays for Carcinogens. A Critical Appraisal, IARC Monographs Supp. 2. IARC Lyon, International Agency for Research on Cancer.

Ikuma, N.E.M., Passoni, H.M., Bisio, I.F., Longo, C.M., Cardoso, P.R.C., Campaner, S.L., Varanda, A.E. 2006. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicology in Vitro*, 20: 361–366.

Imaida, K., Fukushima. S., Shivai. T., Ohtani. M., Nakanishi. K., Ito. N. 1983. Promoting activities of buthylated hydroxyanisole and buthylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of  $\gamma$ - glutamyl trans peptidase-positive foci development in the liver of rats. *Carcinogenesis*, 4: 969–978.

Isano, K., Yourna, J. 1974. Chemical carcinogens as frame shift mutagens: *Salmonella* DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71: 1621-1617.

Israili, Z. H., Lyoussi, B. 2009. Ethnopharmacology of The Plants of Genus *Ajuga*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(4): 425-462.

Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Ogiso, T. 1983. Carcinogenicity of buthylated hydroxianisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 70: 343-347.

İzbrak, A., Sümer, S., Diril, N. 1990. Gıdalara katılan azo boyalarının mutajenik etkilerinin test edilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 24: 48-56.

Jang, S., Kelley, K.W., Johnson, R.W. 2008. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (21): 7534-7539.

John, B., Standridge, M. D. 2004. Pharmacotherapeutic Approaches to the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clinical Therapeutics*, 26: 5.

Kada, T., Hirano, K. 1980. Chemical mutagens, principles and methods for their detection. Hollanendes, A., De Serres, F. Screening of environmental chemical

mutagens by the recassay system with *Bacillus subtilis*. Plenum press, 6: 165-172, New York.

Kadioğlu, A., Demirbağ, Z., şahin, B. 2008. Temel Biyoloji. Gündüz Ofset Matbaacılık, Trabzon.

Kandaswami, C., Middleton, E. 1997 Flavonoids as antioxidants. Shahidi, F. Natural antioxidants. Chemistry, health effects and practical applications. AOCS, Champaign, Sayfa: 174–194, USA.

Karadayı, M. 2010. *Origanum Vulgare* L. ssp. *Vulgare*'den Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/*Salmonella* ve *E. Coli* Wp2 Test Sistemleri ile Mutajen ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 110.

Karaker, V., Joshi, S., Shinde, S.L. 2000. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. ***Mutation Research***, 468: 183-194.

Kelly, C.A., Harvey, R.J., Cayton, H. 1997. Drug treatments for Alzheimer's disease. ***Br. Med. J.*** 314: 693–694.

Kıvrak, I.A., Duru, M. E., Öztürk, M., Mercan, N., Harmandar, M., Topcu, G. 2009. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. ***Food Chemistry***, 116: 470–479.

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

Kitano, K., Fukukawa, T., Ohtsuji, Y., Masuda, T., Yamaguchi, H. 2002. Mutagenicity and DNA damaging activity caused by decomposed products of potassium sorbate reacting with ascorbic acid in the presence of Fe salt. ***Food and Chemical Toxicology***, 40: 1589-1594.

Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A. 2009. Genetik Kavramlar. Editörler: Öner, C., Sümer, S., Öner, R., Öğüş, A., Açık, L Palme Yayıncılık, Yayın No: 506, sayfa:677. Ankara.

Kohen, R., Yannai, E., Berry, E.M., Tirosh, O. 1999. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissue by cyclic voltammetry. *Method Enzymol*, 300: 285-296.

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

Korkmaz, B. 2005. Bazı 2-Süstitüe perimidin bileşiklerinin mutajenik aktivitelerinin Ames mutajenite testi ile belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Korosou, R. 1997. Distribution and linal variation of *salvia fruticosa* mill. on the Island of Crete. *Willdenowia*, 27: (1-2), 113-120.

Kökdil, G., Gülaçtı, T., Gören, A.C., Wolfgang, V. 2002. **Steroids and Terpenoids from *Ajuga relict***. *Zeitschrift für Naturforschung B Journal of Chemistry*, 57 (b): 957- 960.

Kuete, V., Ngameni, B., Simo, C.C.F., Tankeu, R.K., Ngadjui, B.T., Meyer, J.J.M., Lall, N., Kuate, J.R. 2008. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 17-24.

Kuria, K.A.M., Chepkwony. H., Govaerts, C., Roets, E., Busson, R., de Witte, P., Zupko, I., Hoornaert, G., Quiryne, L., Maes, L., Janssens, L., Hoogmartens, J., Laekeman, G. 2002. The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*. *J. Nat. Prod.*, 65: 789-793.

Kuru, M., Gözükar, S.E. 2001. Genetik. Palme Yayıncılık, Yayın No:186, Sayfa:360. Ankara.

Kutlu, M., Aydoğan, G., Isıkdag, İ. 2006. İki yeni benzimidazol türevinin sentezi, yapısal analizi ve mutajenik aktivitelerinin belirlenmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 5 (1-2): 25-36.

Küpeli Akkol, E., Erdogan Orhan I., Yeşada E. 2012. Anticholinesterase and antioxidant effects of the ethanol extract, ethanol fractions and isolated flavonoids from *Cistus laurifolius* L. Leaves. *Food Chemistry*, 131: 626–631.

Lampe, J.W. 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (3): 475-490.

Lanari, A., Amenta, F., Silvestrelli, G., Tomassoni, D., Parnetti, L. 2006. Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, 127: 158–165.

Larson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27: 969–978.

Le Curieux, F., Marzin, D., Erb, F. 1993. Comparison of three short-term assays: results on seven chemicals. *Mutat. Res.*, 319: 223-236.

Leifer, Z., Kada, T., Mandel, M., Zeiger, E., Stafford, R., Rosenkranz, H. S. 1981. An evaluation of test using DNA repair deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat. Res.*, 87: 211-297.

Levin, D., E., Hollstein, M., Christman, M. F., Ames, B. N. 1984. Detection of oxidative mutagens with a new *Salmonella* tester strain TA 102. *Meth. Enzymol.*, 105: 249-254.

Levin, D. E., Ames, B. N. 1986. Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transistions and tranversions: a simple analysis using the *Salmonella* mutagenicity assay. *Environ. Mutagen.*, 8: 9-28.

Liston, D. R., Nielsen, J.A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbart, S. T., Shalaby, I. A., Ramirez, A., Nason, D., White, W. F. 2004. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 486: 9– 17.

Liu, F., Ooi, V.E.C., Chang, S.T. 1997. Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci*, 60: 763–771.

Lleo, A., Greenberg, S.M., Growdon, J.H. 2006. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine*, 57: 513–533.

Loh, D.S.Y., Er, H.M., Chen, Y.S. 2009. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. **Journal of Ethnopharmacology**, 126: 406-414.

Loizzo, M.R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A. M., Statti, G. A., Cindio, B., Houghton, P.J., Menichini, F., Frega, N. G. 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. **Food Chemistry**, 117: 174–180.

Mamadaliyeva, N.Z., El-Readi, M. Z., Ovidi, E., Ashour, M.L., Hamoud, R., Sagdullaev, S.S., Azimova, S.S., Tiezzi, A., Wink, M. 2013. Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*. **Phytopharmacology**, 4(1):1-18.

Mann, D. M. 1989. The pathogenesis and progression of the pathological changes of Alzheimer's disease. **Ann Med**, 21(2): 133–136.

Marc, E.B., Nelly, A., Annick, D.D., Frederic, D. 2008. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. **J. Ethnopharmacol.**, 120: 315-334.

Marnewick, L.J., Gelderblom, C.A.W., Joubert, E. 2000. An investigation on the antimutagenic properties of South African teas. **Mutation Research**, 471: 157–166.

Maron, D.M., Ames, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella Mutagenicity Test. **Mutation Research**, 113: 173-215.

Mavi, A. 2005. İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 52–53.

Metcalf, C. R., Chalk, L. 1972. *Anatomy of Dicotyledon*. Clarendon Press, 502-535, Oxford.

Miller, H.M. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J Am Oil Chem Soc**. 48: 91.



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

Monarca, S., Feretti, D., Zerbini, I., Alberti, A., Zani, C., Resola, R., Geltti, U., Nardi, G. 2002. Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analysis. *Environmental Research*, 88: 64-69.

Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of Propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 109–114.

Moreu, P., Bailone, A., Devoret, R. 1976. Induction in *E.coli* K12 uvrA uvrB a highly sensitive test for potential carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 3700-3704.

Morgaris, N., Koedam, A., Vokou, D., 1982. Aromatic Plants. Martinus Nijhoff Publisher, 265-269, London.

Mortelmans, K., Riccio, E.S 2000. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research*, 455: 61-69.

Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella/ microsome Mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29-60.

Moss, G.P., Harborne, J.B., Baxter, H. 1993. Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Taylor&Francis Ltd, Sayfa: 755. London.

Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J. 2007. Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants. *Phytomedicin*, 14: 289–300.

Nakasugi, T., Nakashima, M., Komait, K. 2000. Antimutagens in Gaiyou (*Artemisia argyi* Levl. Et Vant.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3256-3266.

Nakipoğlu, M., Otan, H. 1992. Tibbi Bitkilerin Flavanoitleri. *Anadolu J. Of AARI*, 4(1): 70-93.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1997. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. 6th ed. Approved Standard, Wayne Pa. M2-A6.

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

Newman, L.F. 1948. Some notes on the pharmacology and therapeutic value of folk-medicine. *II. Trans. Folk Lore Soc.*, 59: 145-156.

Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P.A.M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418-425.

Nikolić, B., Stanojević, J., Mitić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, Simić, D. 2004. Comparative study of the antimutagenic potential of Vitamin E in different E. coli strains. *Mutation Research*, 564: 31-38.

Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T. 1991. Antioxidizing component, Musizin, in *Rumex japonicus* Houtt. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68: 735-739.

Ntandou, G.F.N., Banzouzi, J.T., Mbatchi, B., Elion-Itou, R.D.G., Etou-Ossibi, A.W., Ramos, S., Benoit-Vical, F., Abena, A.A., Oumba, J.M. 2010. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. stem bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 127: 108-111.

Ohe, T., White, P. A., DeMarini, D. M. 2003. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas North America. *Mutation Research*, 534: 101-112.

Ooi, L.S.M., Wang, H., He, Z., Ooi, V.E.C. 2006. Antiviral activities of purified compounds from *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 187-191.

Oraler, G. 1990. Genetik. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, Sayfa:177. İstanbul.

Orhan, F. 2010. *Mentha Longifolia* L. Hudson Ssp. *Longifolia*'dan Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/*Salmonella* Ve Maya Delesyon Test Sistemleri İle Mutajen Ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 132.

Orhan, N., Erdogan Orhan, I., Ergun, F. 2011. Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five Juniperus species. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2305–2312.

Osawa, T., Namiki, M.A. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45: 735–739.

Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44: 307-315.

Öncül, Ö. 2009. Bazı Gıda Boyalarının Mutajenik Potansiyellerinin Ames/Mikrozom Testi ile Araştırılması ve  $\beta$ -Galaktozidaz Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 99.

Özbek, T. 2006. Doğu Anadolu Tıbbi Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/Salmonella Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Özbek, T., Güllüce, M., Şahin, F., Özkan, H., Sevsay, S., Barış, Ö. 2008. Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 32: 271-276.

Öztürk, M. 2008. *Micromeria cilicica* ve *M. juliana* türlerinde antioksidan bileşiklerin HPLC ile analizi ve yapılarının aydınlatılması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. 200.

Paolini, M., Forti, G.C. 1997. On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays a review. *Mutat. Res.*, 387: 17-34 (1997).

Papas, A. M. 1996. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, 31: 77–82.

Park, K. Y., Jung G.O., Lee, K. T., Choi, J., Choi, M. Y., Kim, G. T., Jung, H. J., Park, H. J. 2004. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 73-79.

Pastori, M., Pfander, H., Boscoboinik, D., Azzi, A. 1998. Lycopene in association with alpha-tocopherol inhibits at physiological concentrations proliferation of prostate carcinoma cells. *Biochemistry Biophysics Research Community*, 250: 582-585.

Pavanello, S., Simioli, P., Carrieri, M., Gregorio, P., Clonfero, E. 2002. Tobacco smoke exposure indicators and urinary mutagenicity. *Mutat. Res.*, 521: 1-9.

Petek, M. 1999. İstanbul Boğazındaki Toplam Kirliliğin Canlılardaki Mutajenik Etkilerinin, Salmonella/mikrozom Test Sistemi İle Araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, İstanbul.

Piazzì, L., Cavalli, A., Colizzi, F., Belluti, F., Bartolini, M., Mancini, F., Recanatini, M., Andrisano, V. and Rampa, A., 2008. Multi-target-directed coumarin derivatives: AChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8: 423–426.

Pokorny, J. 1991. Natural antioxidant for food use. *Trends in Food Sci Technol*, 9: 223–227.

Pratt, D. E., Hudson, B. J. F. 1990. Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants. Elsevier, 17-192, Amsterdam.

Quillardet, P., Hofnung, M. 1985. The SOS chromotest a colorimetric bacterial assay for genotoxins. *Mutat. Res.*, 147: 65-78.

Ramanathan, K., Anusuyadevi, M., Shimila, S., Pannerseelvam, C. 2005. Ascorbic acid and  $\alpha$ -tokoferol as potent modulators apoptozis on arsenic inducedtoxicity in rats. *Toxicology Letters*, 156: 297-306.

Ramos, A., Rivero, R., Victoriab, M. C., Visozo, A., Piloto, J., Garcia, A. 2001. Assessment of mutagenicity in *Parthenium hysterophorus* L.. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 25-30.

Rasool, A.S., Musthaq, R. 1991. Genetic activity of certain chemicals in *Salmonella* microsomal screening system. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 4(4): 301-304.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Bio Med*, 26: 1231-1237.

Rosenkranz, H. S., Mermelstein, R. 1983. Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes all nitro containing chemicals were not created equal. *Mutat. Res.*, 114: 217-267.

Sahu, S.C., Green, S. 1997. Food antioxidants: their dual role in carcinogenesis. Baskin, S., Salem, H. Oxidants, antioxidants and free radicals. Taylor & Francis, Sayfa:329–330, Washington.

Salvatore, S., Pellegrini, N., Brenna, O.V., Del Rio, D., Frasca, G., Brighenti, F., Tumino, R. 2005. Antioxidant characterization of some Sicilian edible wild greens. *J Agric Food Chem*, 53: 9465–9471.

Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H., Danno, G. 1995. Luteolin: A Strong Antimutagen against Dietary Carcinogen, Trp-P-2, in Peppermint, Sage, and Thyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 410-414.

Scolastici, C., Lima, R.O.A., Barbisan, L.F., Ferreira, A.L.A., Ribeiro, D.A., Salvadori, D.M.F. 2008. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicology in Vitro*, 22: 510-514.

Scott, L.J., Goa, K.L. 2000. Galantamine: a Review of Its Use in Alzheimer's Disease. *Drugs*, 60:1095–1122.

Sekizawa, J., Shibamoto, T. 1982. Genotoxicity of saffrole-related chemicals in microbial test systems. *Mutat. Res.*, 101(2): 127-40.

Sghaier, M.B., Bhour, W., Bouhlel, I., Skandrani, I., Boubaker, J., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K. 2011. Inhibitory effect of *Teucrium ramosissimum* extracts on aflatoxin B1, benzo[a]pyrene, 4-nitro-o-henylenediamine and sodium azide induced

mutagenicity: Correlation with antioxidant activity. *South African Journal of Botany*, 77: 730–740.

Shukla, Y., Singh, M. 2007. Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 683-690.

Silva, F.A.M., Borges, F., Guimaraes, C., Lima Jose.L.F.C., Matos, C., Reis, S. 2000. Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radikal scavenginig activity, and physicochemical parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2122-2126.

Slater, E. E., Anderson, M. D., Rosenkranz, H. S. 1971. Rapid detection of mutagens and carcinogens. *Cancer Res.*, 31: 970-973.

Slinkard, K., Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult*, 28: 49–55.

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

Stadtman, E. R. 2002. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 597-604.

Starvric, B. 1997. Mutagenic heterocyclic aromatic amines in food flavour. *Food and Chem. Toxicol.*, 35(2): 185-197.

Steele, V.E., Kelloff, G.J. 2005. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Mutation Research*, 591: 16–23.

Stoltzfus, A. 2006. Mutationism and the dual causation of evolutionary change. *Evolution & Development*, 8 (3): 304-317.

Strizhel, N. G. 1994 The mutagenic and modifying properties of new gelatinous substances studied by using the Ames tes. *Tsitol Genet.*, 28 (3): 91-92.

Sümer, S., Diril, N., İzbrak, A. 1990. *Salmonella* / Mikrozom test sistemi ile bazı insektisitlerin mutajeniteleri üzerine bir çalışma. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 24: 103-110.

Tanaka, M., Kuei, C.W., Nagashima, Y., Taguchi, T. 1998 Application of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakk*, 54:1409–1414.

Tolan, V., Kızıl, S., Özdemir, S., Demirci, Ö. 2009. Genotoxicity of essential oil of *Thymbra spicata* L. var *spicata* in *Salmonella*/microsome and SOS chromotest. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(5): 533-537.

Tolan, V., Toker, Z., Özdemir, S., Demirci, Ö., Otludil, B., Özen, H.Ç. 2009. Mutagenicity of *Hypericum lysimachioides* extracts. *Pharmaceutical Biology*, 27(11): 1035-1041.

Tshikalange, T.E., Meyer, J.M.M., Hussein, A.A. 2005. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 515-519.

Tsukagoshi, S., Ohashi, F. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against Mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma Ah-13 by oral use. *Gann*, 65 (6): 557-558.

Turkoglu, S., Turkoglu, I., Kahyaoglu, M., Celik, S. 2010. Determination of antimicrobial and antioxidant activities of Turkish endemic *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* P.H. Davis (Lamiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(13): 1260-1268.

Valkonen, M., Kuusi, T. 1997. Spektrophotometric assay for total radical trapping antioxidant potential in human serum. *J Lipid Res*, 38: 823-833.

Vattem, D. A., Jang, H. D., Levin, R., Shetty, K. 2005. Synergism of Cranberry Phenolics with Ellagic Acid and Rosmarinic Acid For Antimutagenic and DNA Protection Functions. *Journal of Food Biochemistry*, 30: 98-116.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agr Food Chem*, 46:4113–4117.

Vinod, V., Tiwari, P.K, Meshram, G.P. 2011. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of neem (*Azadirachta indica*) seed oil in the in vitro Ames

*Salmonella*/microsome assay and in vivo mouse bone marrow micronucleus test. *Journal of Ethnopharmacology*, 134: 931–937.

Vogel, E., Sobels, F. H. 1976. The function of drosophyla in genetic toxicology testing, chemical mutagens, principles and methods for their detection. Plenum Press, 4:93-142, London.

Von-Sonntag, C. 1987. The Chemical Basis of Radiation Biology. Taylor & Francis, 15-49, London.

Watson, L., Dallwitz, M. T. 1978. The Families of Flowering Plants. Oxford University Press, London.

Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K., Locke, U.S. 1985. Qualitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett*, 187: 33-37.

Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K., Locke, U.S. 1986. The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration dependent. *Biochimica et Biophysica Acta*, 884: 119-123.

Wessner, M., Champion, B., Girault, J.P., Kaouadji, N., Saidi, B., Lafont R (1992). Ecdysteroids from *Ajuga iva*. *Phytochemistry*, **31**: 3785-3788.

White, J. L., Conner, B. T., Perfetti, T. A., Bombick, B. R., Avols J. T., Fowler, K.W., Smith, C. J., Doolittle, D. J. 2001. Effect of pyrolysis temperature on the mutagenicity of tobacco smoke condensate. *Food Chem. Toxicol.*, 39: 499-505.

Whitehead, T.P, Thorpe, G.H.G., Maxwell, S.R.J. 1992. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, 266: 265-277.

Williams, G.M., Iatropoulos, M. 1997. Anticarcinogenic effects of synthetic phenolic antioxidants. Baskin, S.I., Salem, H. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Taylor & Francis, Sayfa: 341–350, New York.

Yu, T., Xu, M., Dashwood, R.H. 2004. Antimutagenic activity of Spearmint. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44: 387-393.



Zahin, M., Aqil, F., Ahmad, I. 2010. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutation Research*, 703: 99–107.

Zhang, L.X., Cooney, R.V., Bertran, J.S. 1991. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*, 12: 2109-2114.

Zhang, T., Chen, D. 2008. Anticomplementary principles of a Chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 351-361.

Zhao, X., Marszalec, W., Toth, P. T., Huang, J., Yeh, J. Z., Narahashi, T. 2006. In vitro galantamine-memantine co-application: Mechanism of beneficial action. *Neuropharmacology*, 51 (7-8): 1181-1191.

## ÖZGEÇMİŞ



### Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : HAŞİMİ, Nesrin  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 06.12.1979 Viranşehir/Şanlıurfa  
Elektronik posta adresi : [nesrinhasimi@hotmail.com](mailto:nesrinhasimi@hotmail.com)  
[nesrin.hasimi@batman.edu.tr](mailto:nesrin.hasimi@batman.edu.tr)

### Eğitim Bilgileri

Eğitim derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Harran Üniv./Fen Bilimleri Enstitüsü	2006
Lisans	Harran Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2002
Lise	Viranşehir Anadolu Lisesi	1998

### İş Deneyimi

Görev	Yer	Yıl
Araştırma Görevlisi	Batman Üniversitesi	2009-

**Yabancı Dil** : İngilizce

### Yayımlar/Bildiriler

1. KIZIL, S., **HASIMI, N.**, TOLAN, V., KILINÇ, E., KARATAS, H. 2010. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Essential Oil, Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 38 (3) : 99-103.
2. KIZIL, S., **HASIMI, N.**, TOLAN, V., KILINÇ, E., YUKSEL, U. 2010. Mineral Content, Essential oil Components And Biological Activity of Two Mentha Species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.), Turkish Journal of Field Crops, 15(2): 148-153.

3. **HASIMI N.**, MUSA D., 2009. Antioxidant Effects of Some Herb Extract on Heart and Eye of Chick Embryo Treated with Adriamycin, *34<sup>th</sup> FEBS Congress*. 276: 279. Prague.
4. **HASIMI N.**, OZDEMIR S., TOLAN V., KIZIL S., 2009. Mutagenicity of Essential Oils of *Coriandrium sativum* L. and *Cuminum cyminum* L. in Salmonella/Microsome Test, *34<sup>th</sup> FEBS Congress*. 276: 278. Prague.
5. HACIBEKIROGLU I., BOGA M., **HASIMI N.**, ERTAS A., KOLAK U., 2011. Antioxidant and Anti-Alzheimer Activities of Bloom Extracts of Bilberry (*Vaccinium myrtillus*). *New Challenge in Natural Products Chemistry Conference on Honour of Prof.Dr. Ayhan Ulubelen*. Istanbul.
6. ERTAŞ A., GÖREN A.C., **HAŞİMİ N.**, TOLAN V., KOLAK U. 2012. Phytochemical and biological investigations on *Mentha longifolia* subsp. *Noena*. 2012. *International Congress on Natural Products Research*. 78:1171. New York City.
7. KARAŞİN N., **HAŞİMİ N.**, TOLAN V. 2012. Diyarbakır ve Çevresinde Yetişen *Cynara Syriaca* Metanol Ekstresinin Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı)*. 353. İzmir.
8. **HAŞİMİ N.**, TOLAN V., KOLAK U. 2012. Investigation of Mutagenic and Antimutagenic Properties of Some Extracts of *Ajuga vestita* BOISS. By *Salmonella* / Microsome Mutagenicity Test. *8. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi*. 63. Antalya.

## Proje Bilgileri

Projenin Adı	Destekleyen Kuruluş	Tarih	Destek Miktarı
1. Diyarbakır ve Çevresinde Yetişen <i>Cynara syriaca</i> Metanol Ekstraktının Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi	DÜBAP	2010-2011	10.000 TRY
2. Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	DÜBAP	2011-2012	10.000 TRY
3. Diyarbakır Çevresinde Yetişen Endemik <i>Ajuga vestita</i> Ekstresinin Sekonder Metabolitlerinin ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi	TÜBİTAK	2011-2012	25.000 TRY
4. <i>Ajuga vestita</i> ve <i>Ajuga xylorrhiza</i> Bitkilerinin Petroleteri, Aseton ve Metanol Ekstrelerinin Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi	DÜBAP	2010-2012	15.000 TRY