

**LAMIACEAE FAMILİYASINA AİT BAZI BİTKİLERİN UÇUCU YAĞ
İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ, ANTİMİKROBİYAL VE
ANTİMUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ELİF AYŞE ERDOĞAN

DOKTORA TEZİ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**MERSİN
TEMMUZ - 2014**

**LAMIACEAE FAMILİYASINA AİT BAZI BİTKİLERİN UÇUCU YAĞ
İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ, ANTİMİKROBİYAL VE
ANTİMUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ELİF AYŞE ERDOĞAN

DOKTORA TEZİ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Ayşe EVEREST**

**MERSİN
TEMMUZ - 2014**

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

16 Haziran 2014 / 16 June 2014

Elif Ayşe ERDOĞAN

ÖZET

LAMIACEAE FAMILİYASINA AİT BAZI BİTKİLERİN UÇUCU YAĞ İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİMUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yapılan çalışmada *Stachys rupestris* Montbret Et Aucher, *Salvia heldreichiana* Boiss. Ex Bentham ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* Boiss. P.

H. Davis & Doroszenko, endemik bitkilerinin uçucu yağ bileşimlerinin aydınlatılması, antimikrobiyal ve mutajenik özelliklerinin ortaya amaçlanmıştır. Lamiaceae familyasından olan bu bitkiler, 2011-Haziran-Temmuz aylarında Mersin yaylalarından toplanmıştır. Bitkilerin uçucu yağları Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresinde (GC-MS) incelenmiştir. En yüksek yağ verimi *Salvia heldreichiana* bitkisinde, %0.75 olarak belirlenmiştir. *Stachys rupestris* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitkilerinin uçucu yağlarının ana maddelerini seskiterpen ve diterpenlerler oluştururken, *Salvia heldreichiana* bitki uçucu yağının ana maddesini monoterpenler oluşturmaktadır.

Her üç bitkinin uçucu yağlarının antimikrobiyal, mutajenik ve olası antimutajenik aktiviteleri araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite için makrobroth dilüsyon tekniği kullanılmış ve bazı patojen mikroorganizmalara karşı Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir.

Uçucu yağların mutajeniteleri kısa zamanlı prokaryotik mutajenite testi olan *Umu*-test (*Salmonella thyphimurium* TA1535/pSK1002), Ames /Salomonella/ Microsom ve kısa zamanlı ökaryotik test olan *Neurospora crassa* (N23 and N24 strains) testi ile araştırılmıştır.

Çalışmamızda, *Stachys rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağlarının test mikroorganizmalarına karşı ortalama bir antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. Uçucu yağların *Umu* ve Ames testi hem S9 (metabolik aktivasyon) kullanmadan hem de S9'suz ortamda mutajeniteye neden olmadığı belirlenmiştir. *Neurospora crassa* N23 suşu ile yapılan çalışmada her üç bitkide de herhangi bir mutajenite belirlenmemiştir. Ancak, *Salvia heldreichiana* uçucu yağının N24 suşu üzerinde zayıf mutajeniteye neden olduğu gözlenmiştir. *Stachys rupestris* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitkilerinin uçucu yağlarında N24 suşunda herhangi bir mutajenite belirlenmemiştir.

Sonuç olarak, *Stachys rupestris*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* ve *Salvia heldreichiana* uçucu yağlarının biyolojik etkinlik yönünden aktif, ancak mutajenik potansiyelinin düşük olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Stachys rupestris*, *Salvia heldreichiana*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, Mutajenite, Antimikrobiyal aktivite, Antimutajenite

Danışman: Prof. Dr. Ayşe EVEREST, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı Eş

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN, Mersin Üniversitesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

ABSTRACT

THE DETERMINATION OF ESSENTIAL OIL OF SOME OF PLANTS WHICH BELONG TO LAMIACEAE, INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES

The aim of the current study was to determine the chemical composition antimicrobial and mutagenic activities of the essential oils of *Stachys rupestris* Montbret Et Aucher, *Salvia heldreichiana* Boiss. Ex Bentham and *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* Boiss. P. H. Davis & Doroszenko which are endemic plants. These plants, which belong to Lamiaceae were collected from Mersin plateaus in April-July, 2011. The essential oils of plants were investigated by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The highest oil efficiency was determined to be 0,75% and it belonged to *Salvia heldreichiana*.

The antimicrobial, mutagenic and possible antimutagenic activities of all plant species were investigated. The antimicrobial activity was evaluated using macrobroth dilution assay. MIC (Minimal inhibitory concentration) values were determined against some pathogen microorganisms.

The mutagenicity of essential oils was assessed by *Umu*-test (*Salmonella thyphimurium* TA1535/pSK1002) and Ames/*Salomonella*/Microsom which are short-term bacterial test systems and *Neurospora crassa* (N23 and N24 strains) which is a short-term eukaryotic test system.

In our study, it was determined that essential the oils of *Salvia heldreichiana*, *Stachys rupestris* and *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* exhibited moderate antimicrobial activity against the test microorganisms.

It was showed that essential oils had no mutagenic activity with S9 (metabolic activation) and without S9 conditions by *Umu* and Ames tests. In addition, it was determined that the essential oils of *Stachys rupestris*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* and *Salvia heldreichiana* had no mutagenic activity by *Neurospora crassa* (N23 strains) test while the essential oil of *S. heldreichiana* had a mutagenic effect on N24 strain. Essential oils of *Stachys rupestris* and *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* did not show mutagenic activity on *N. crassa* N24 strains.

As a result, the biological efficiency of essential oil components of *Stachys rupestris*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* and *Salvia heldreichiana* have been seen to be active but it was found that their potentials of mutagenic were low on microorganisms.

Key Words: *Stachys rupestris*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana*, mutagenic activity, antimicrobial activity.

Advisor: Prof. Dr. Ayşe EVEREST, Department of Biology, University of Mersin.

Co-advisor: Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN, Department of pharmaceutical Microbiology, University of Mersin.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda bana her türlü desteği veren çok saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe Everest'e, tüm laboratuvar olanaklarını sağlayan, çok değerli eş danışmanım Prof. Dr. Mehmet Sami Serin'e, tez çalışmalarım boyunca yardımlarını ve fikirsel katkılarını esirgemeyen, Rektör Yardımcısı Prof. Dr. Yüksel zdemir ve Sayın Dekanımız Prof. Dr. Murat Gizir'e, Prof. Dr. Burhan Arıkan ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata zimen'e, Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümü hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma, Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma Merkezi ve Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca, maddi manevi emeği geçen herkese ve çok değerli aileme teşekkür ederim.

Uzun soluklu bu çalışmam, babaannem Ayşe ERDOğAN ve rahmetli dedem

Kamber ERDOğAN'a ithaf edilmiştir.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ETİK BEYAN	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	5
2.1. Uçucu Yağlar	5
2.1.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması	7
2.1.1.1. Monoterpenler	8
2.1.1.2. Seskiterpenler (C15)	8
2.1.1.3. Diterpenler (C20), Triterpenler (C30) ve Tetraterpenler (C40)	9
2.1.2. Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması	9
2.1.3. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre Sınıflandırılması	10
2.2. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları	10
2.3. Uçucu Yağların Mutajenik ve Antimutajenik Etkileri	13
2.4. Kısa Zamanlı Prokaryotik Mutajenite Test Sistemleri	15
2.4.1. <i>Umu</i> -Test (<i>Salmonella thyphimurium</i> TA1535/pSK1002)	17
2.4.2. Ames/ <i>Salmonella</i> / Mikrosom test yöntemi	19
2.5. Kısa Zamanlı Ökaryotik Mutajenite Test Sistemleri	20
2.5.1. <i>Neurospora crassa</i> Test Sistemi	21
2.6. Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Çalışmalar	23
2.6.1. <i>Stachys</i> Türleri ile ilgili Yapılan Çalışmalar	25
2.6.2. <i>Salvia</i> Türleri ile ilgili Yapılan Çalışmalar	27
2.6.3. <i>Ballota</i> Türleri ile ilgili Yapılan Çalışmalar	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1. Uçucu Yağ Eldesi ve GCMS Analizleri	31
3.1.1. Kullanılan Cihazlar Santrifüj Clevenger Cihazı	31
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar n-C ₆ H ₁₂ (n-Hekzan)	31
3.2. Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Tayini	32
3.2.1. Test için Gerekli Araç ve Gereçler	33
3.2.2. Antimikrobiyal Analizler için Kullanılan Besiyerleri	33
3.2.3. Deney Prosedürünün Uygulanması	34
3.3. <i>Umu</i> - MUTAJENİTE Testi	35
3.3.1. Test için Gerekli Araç ve Gereçler	35
3.3.2. <i>Umu</i> -testi için Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	35
3.3.3. Bakteri Suçunun Deney için Hazırlanması	37
3.3.4. Test Sisteminde Kullanılacak Suşun Genetik Özelliklerinin Kontrolü	37
3.3.4.1. Histidin Gereksinimi	37
3.3.4.2. R faktörünün kontrolü	37
3.3.4.3. Rfa mutasyonunun kontrolü	38
3.3.4.4. UvrB mutasyonunun kontrolü	38
3.3.4.5. SOS kromotest için <i>umuC</i> == <i>lacZ</i> bileşik geninin aktifliğinin kontrolü	38
3.3.5. Örneklerin Sitotoksitelerinin Araştırılması	38
3.3.6. Deney Prosedürünün Hazırlanması	39

3.3.7. DeneY Prosedürünün Uygulanması	39
3.3.8. Sonuçların Değerlendirilmesi	40
3.4. Ames/ Salmonella/ Mikrosom MUTAJENİTE Testi	40
3.4.1. Test için Gerekli Araç ve Gereçler	40
3.4.2. Ames-testi için Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	41
3.4.3. Bakteri Suçunun DeneY İçin Hazırlanması	43
3.4.4. Test Sisteminde Kullanılacak Suşların Genetik Özelliklerinin Kontrolü	43
3.4.4.1. Histidin gereksinimi	43
3.4.4.2. R faktörünün kontrolü	43
3.4.4.3. Rfa mutasyonunun kontrolü	44
3.4.4.4. UvrB mutasyonunun kontrolü	44
3.4.4.5. Spontan geri dönüş sıklığının kontrolü	44
3.4.5. Örneklerin Sitotoksitelerinin Araştırılması	45
3.4.6. Ames testinin yapılışı	45
3.4.7. Sonuçların Değerlendirilmesi	45
3.5. <i>Neurospora crassa</i> Test Sistemi	45
3.5.1. <i>N. crassa</i> Suçlarının DeneY için Hazırlanması ve Stoklanması	45
3.5.2. Test için Gerekli Araç ve Gereçler	46
3.5.3. <i>Neurospora crassa</i> Test Sisteminde Kullanılan Besi Ortamları ve Çözeltiler	47
3.5.4. DeneY Prosedürünün Uygulanması	48
3.5.5.1. Nokta testi	48
3.5.5.2. Süspansiyon testi	48
3.5.5. <i>Neurospora crassa</i> Test Sisteminde Mutajenik Etkinin Değerlendirilmesi	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	50
4.1. <i>Salvia heldreichiana</i> 'ya İlişkin GCMS Bulguları	50
4.2. <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> ' ya İlişkin GCMS Bulguları	53
4.3. <i>Stachys rupestris</i> 'e İlişkin GCMS Bulguları	54
4.4. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları	56
4.5. <i>Umu</i> -Test Bulguları	61
4.5.1. Test Sisteminde Kullanılacak Suşun Genetik Özellikleri İlgili Bulgular	62
4.5.1.1. Histidin gereksinimi	62
4.5.1.2. R Faktörünün Kontrolü	62
4.5.1.3. Rfa mutasyonunun kontrolü	63
4.5.1.4. UvrB mutasyonu kontrolü	64
4.5.1.5. <i>UmuC</i> = <i>lacZ</i> füzyonunun indüklenebilirliğinin kontrolü	64
4.5.2. Pozitif ve Negatif Kontrol Bulguları	65
4.5.3. Uçucu Yağların <i>Umu</i> -test Bulguları	66
4.6. Ames/Salmonella/Mikrosom TEST BULGULARI	70
4.6.1. Uçucu Yağların Ames-test Bulguları	70
4.7. <i>Neurospora crassa</i> MUTAJENİTE Test Bulguları	74
4.7.1. <i>Neurospora crassa</i> N23 Suşu Mutajenite Bulguları	79
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	107
EKLER	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Mutajenik ajanların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bazı prokaryotik kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar	16
Çizelge 2.1.1.1. Terpenlerin izopren birimi sayıları ve karbon atom sayılarına göre sınıflandırılması.	8
Çizelge 2.2. Ökaryotik kısa zamanlı mutajenite testleri	21
Şekil 3.1. Clavenger aparatı (a) ve (b) bitkiden yağ eldesi.	32
Şekil 3.2. Görülebilir Bulanıklık Tayini. Mikroorganizların üremelerine bağlı olarak oluşan bulanıklık (sağdaki) ve negatif kontrol (soldaki) tüpler kıyaslanarak yorumlanmıştır.	33
Çizelge 4.1. <i>Stachys rupestris</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> bitkilerinin uçucu yağ verimleri	50
Çizelge 4.2. <i>Salvia heldreichiana</i> bitkisinin uçucu bileşenleri.	51
Çizelge 4.3. <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> bitkisinin uçucu bileşenleri.	53
Çizelge 4.4. <i>Stachys rupestris</i> bitkisinin uçucu bileşenleri	55
Çizelge 4.5. <i>Stachys rupestris</i> , <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> uçucu yağının MİK değerleri.	56
Çizelge 4.6. Pozitif ne negatif kontrolün OD ₆₂₀ 'deki absorpsiyon değerleri	65
Çizelge 4.7. Aminoantrasen ve furilfuramid pozitif mutajenlerinin negatif kontrole bağlı absorpsiyon değerleri	66
Çizelge 4.8. <i>Salvia rupestris</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> uçucu yağların ve negatif kontrolün OD ₆₂₀ 'deki absorpsiyon değerleri.	67
Çizelge 4.9. <i>Stachys rupestris</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> bitki uçucu yağlarının negatif kontrole bağlı absorpsiyon değerleri.	68
Çizelge 4.10. TA98 suşlarının <i>Salvia rupestris</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> uçucu yağ örneklerindeki sonuçları. Her doz üç paralel plak şeklinde yapılmış olup iki deneyin ortalamaları alınıp standart hataları ile birlikte verilmiştir.	70
Çizelge 4.11. TA100 suşlarının <i>Salvia rupestris</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> uçucu yağ örneklerindeki sonuçları. Her doz üç paralel plak şeklinde yapılmış olup iki deneyin ortalamaları alınıp standart hataları ile birlikte verilmiştir.	72
Çizelge 4.12. Süspansiyon testi ile <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Stachys rupestris</i> uçucu yağlarının çalışma konsantrasyonlarında <i>N.crassa</i> N23 suşunun geri dönen koloni sayıları. Veriler bir deneyin ortalamaları alınarak hesaplandı. Her doz için 5 petri uygulandı. p≤0.01 farklılıklar anlamlıdır. Ort.koloni: (Geri dönen kolonilerin sayısı/negatif kontrol N23 koloni sayısı)	79
Çizelge 4.13. Süspansiyon testi ile <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Stachys rupestris</i> uçucu yağlarının çalışma konsantrasyonlarında <i>N.crassa</i> N24 suşunun geri dönen koloni sayıları. Veriler bir deneyin ortalamaları alınarak hesaplandı. Her doz için 5 petri uygulandı. p≤0.01 farklılıklar anlamlıdır. Ort.koloni: (Geri dönen kolonilerin sayısı/negatif kontrol N24 koloni sayısı)	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Umu</i> -test" in moleküler genetik seviyesinde prensibi	18
Şekil 2.2. <i>Neurospora crassa</i> yaşam döngüsü	22
Şekil 2.4. <i>Salvia heldreichiana</i> Boiss. ex Benth.	28
Şekil 2.5. <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> Boiss.	29
Şekil 4.1. MGA (minimal glukoz agar) plaklarındaki üreme durumu	62
Şekil 4.2. Histidin/biyotin/ampisilin içeren plaktaki üreme durumu	63
Şekil 4.3. Histidin/biyotin/ampisilin içermeyen plak (Kontrol)	63
Şekil 4.4. Rfa Mutasyonunun Kontrolü	64
Şekil 4.5. UvrB mutasyonu kontrolü	64
Şekil 4.6. <i>UmuC</i> = <i>lacZ</i> füzyonunun indüklenebilirliğinin kontrolü	65
Şekil 4.7. Aminoantrasen pozitif kontrolünün grafiksel gösterimi (S9+)	66
Şekil 4.8. Furilfuramid pozitif kontrolünün grafiksel gösterimi (S9-)	66
Şekil 4.9. <i>Stachys rupestris</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> bitki uçucu yağları konsantrasyonlarına bağlı olarak β -galaktosidaz aktivitesinin grafiksel gösterimi.	69
Şekil 4.10. Ames testi ile <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Stachys rupestris</i> uçucu yağlarının varlığında, TA98 suşunun geri dönen koloni sayılarının grafiksel gösterimi.	71
Şekil 4.11. Ames testi ile <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Stachys rupestris</i> uçucu yağlarının varlığında, TA100 suşunun geri dönen koloni sayılarının grafiksel gösterimi.	72
Şekil 4.12. <i>Neurospora crassa</i> N23 ve N24 suşları.	75
Şekil 4.13. <i>Neurospora crassa</i> konidialarının mikroskop görüntüsü.	75
Şekil 4.14. Adeninsiz ortamda <i>N. crassa</i> suşunun morfolojik görüntüsü.	77
Şekil 4.15. Adenin biyosentez yolu	78
Şekil 4.16. <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Stachys rupestris</i> uçucu yağları çalışma konsantrasyonlarında <i>N. crassa</i> N23 suşu ile verdikleri koloni sayılarının negatif kontrole bağlı frekanslarının grafiksel gösterimi.	80
Şekil 4.17. <i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> , <i>Salvia heldreichiana</i> ve <i>Stachys rupestris</i> uçucu yağları çalışma konsantrasyonlarında <i>N. crassa</i> N24 suşu ile verdikleri koloni sayılarının negatif kontrole bağlı frekanslarının grafiksel gösterimi.	82
Şekil 4.18. <i>Salvia heldreichiana</i> uçucu yağının 0.5 mg/ml konsantrasyonunda (a) ve negatif kontrolünün (b) <i>N. crassa</i> N24 suşu ile 7 günlük inkübasyon sonucundaki morfolojik görüntüleri.	83

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge/Kısaltma	Tanım
MİK	Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon
DMSO	Dimethyl sulfoxide
CFU	Koloni oluşturan birim
NB	Nutrient Broth
MGA	Minimal Glukoz Agar
HBA	Histidin Biyotin Agar
S9	Metabolik aktivasyon
N23	<i>Neurospora crassa</i> suşu
N24	<i>Neurospora crassa</i> suşu
ONPG	O-nitrophenyl- beta-D-galactoside
S.rup.	<i>Stachys rupestris</i>
B.sax.	<i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i>
S.held.	<i>Salvia heldreichiana</i>



1. GİRİŞ

Bitkiler insanlığın varoluşundan beri hayatın vazgeçilmez temel kaynaklarından biridir. İlkçağlardan beri insanlar bitkileri çeşitli amaçlarla kullanmışlar ve içeriğini tanımlamaya çalışmışlardır. Bitkilerin tıbbi amaçlı kullanımını ifade eden etnobotanik alanı hakkındaki ilk yazılı bilgiler M.Ö.3000'li yıllara kadar eski Mısır, Hitit, Grek ve Roma dönemlerine dayanır. Anadolu tıbbi bitkileri ile ilgili bilgilerimizin kökenleri ise Hititler dönemine kadar dayanmakta olup bitkilerin tıbbi alanda, Şifahanelerde kullanılması Selçuklu dönemine kadar uzanır. Bitkisel kaynaklı droglar çok eski çağlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılırken içeriğindeki etkin bileşikler ve etkileri XIX. yüzyılın ortalarında araştırılmaya başlanmıştır. Günümüzde bitkiler ve bitki ilaç hammaddeleri tedavide kullanılan ilaçların büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Son yıllarda artan hastalıklara karşı üretilen sentetik ilaçların yetersiz kalması ve yan etkilerinin bulunması doğal ürünlerin kullanılma zorunluluğunu arttırmaktadır. Bu amaçla yeni doğal ilaç hammadde arayışı gün geçtikçe artmaktadır [Dağcı ve Dığrak, 2002; Cellat vd., 2007; Ahıskaloğlu, 2007; Kılıç 2013].

Günümüzde tıbbi bitkilerin uçucu yağ içeriklerinin araştırılması hem bilimsel hem de ekonomik yönden oldukça önemlidir. Bilinen tüm antibiyotiklere karşı mikroorganizma dirençliliğinin artabilmesi, bitki kaynaklarının ve bunların hücrelerdeki etkilerinin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. İlaçlarda selüloz, pektin, şeker gibi bazı maddeler yanında çoğunluğunu uçucu yağların oluşturduğu esanslar da bulunmakta ve bu maddelerin önemli bir farmakolojik etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Bitkilerden veya bitkisel droglardan elde edilen esansiyel yağlar olarak da bilinen uçucu yağlar hücre membranından kolaylıkla geçebilir, deriden ve akciğerlerden kolaylıkla absorbe olabilir. Bunların dışında direk vücuda ilaç veya gıda katkı maddeleri olarak alınan uçucu yağların genotoksik potansiyelleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır [Kılıç, 2005]. Bu doğal bileşenler, kanserin de dahil olduğu bir çok hastalığın tedavisinde potansiyel bir kullanım alanına sahiptirler [Sotto vd., 2008]. Hastalıklara karşı sentetik yapıli ilaçların ve terapotik maddelerin yetersiz kalması, bitki kimyasalını, mikrobiyolojik ve farmakolojik yönlerden çok yönlü araştırılmayı zorunlu hale getirmiştir [Dağcı ve Dığrak, 2005; Panizzi vd., 1993].

Uçucu yağlar oda sıcaklığında sıvı, bazen donabilen uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsi karışımlardır. Metabolizmada asetat birimlerinden köken alan sekonder metabolitlerdir. Uçucu yağlar bakterilere, funguslara, hatta protistalara karşı oldukça aktiftirler. Hücreler arası iletişim, hormon gibi birçok görevi bulunan uçucu yağlar, bitkilerin çiçek, meyve, rizom, reçine ve odun gibi kısımlarında bulunur [Cowan, 1999; Çelik, 2007; Hanamanthagouda vd., 2007]. Farmakolojik etkiye sahip uçucu yağlar antiromatizmal, öksürük kesici, idrar söktürücü, iltihap azaltan, dezenfektan gibi birçok özelliklere sahiptirler ve yaygın olarak kullanılırlar. Son yıllarda

tibbin bir dalı olarak görülen aromaterapiye karşı duyulan ilgi, uçucu yağ kullanımını da arttırmıştır. Eterik yağlar (uçucu yağlar) terapilerde uygulanan masajlarda, koku ve tat endüstrilerinde, ev temizlik ürünlerinde, ilaçların koku ve tatlarını düzeltmek amacıyla da kullanılmaktadır. Tüm bunların dışında uçucu yağların analjezik (ağrı dindiren), antiseptik (mikropların üremesini engelleyen), sedatif (sakinleştirici), stimülan (uyarıcı), antioksidan gibi etkileri ilaç sanayindeki önemini daha da çok arttırmaktadır (Lee, 2011). Uçucu yağ bileşenlerince zengin familyalar, başta Labiatae (Lamiaceae) olmak üzere Asteraceae (Compositae), Rosaceae, Rutaceae, Iridaceae, (Apiaceae) Umbelliferae, Lauraceae, Zingiberaceae ve Pinaceae familyalarıdır [Pişkin, 2007].

Türkiye farklı iklim kuşaklarının kesişme noktasında yer alması nedeniyle, bitki tür ve çeşitliliği açısından oldukça zengin bir ülkedir. Dünya pazarında, çay bitkileri ve baharat ihracatında söz sahibi ülkelerden biri olup, ticareti yapılan bitki türleri arasında ilk sırayı Lamiaceae (Labiatae) familyası almaktadır. Ayrıca, ülkemiz alternatif tıpta da önemli bir yeri olan Lamiaceae bitkileri bakımından önemli bir gen merkezidir. [Kocabaş ve Karaman, 2001; Özkan, 2007]. Bu familyaya ait olan türlerin yüksek biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri yıllardır bilinmektedir. Bu bitkilerin fitoterapik özelliği çoğunlukla içeriğindeki temel yağlardan ileri gelmektedir [Bozin vd., 2006]. Lamiaceae familyası çoğunlukla ot ve çalı formunda olup tek yıllık veya çok yıllık aromatik bitkilerdir. Bu familya dünyanın her tarafında bulunur ve çoğunlukla Kuzey-Batı Asya ve Akdeniz bölgesine yayılmış, yaklaşık 220 cinsi ve 3500 türü de bünyesinde barındırır. Türkiye’de 38 cins, 400 tür yetişir ve bu türlerin 240’ı endemiktir. Endemik bitki bakımından oldukça zengin olan Lamiaceae familyasının uçucu yağ verimi oldukça yüksek olup, bilinen önemli cinsleri, Thymbra, Thymus, Origanum, Satureja, Mentha, Teucrium, Ballota, Stachys, Salvia, Ajuga, Prunella, Melissa, Lamium, Sideritis ve Marrubium’dur. Bu familya yaygın olarak Türkiye’nin Akdeniz Bölgesindeki dağlık alanlarda yayılış göstermekte olup familyanın endemizm oranı %42.2 olarak belirtilmektedir [Kocabaş ve Karaman, 2001; Özkan, 2007] Aromatik özelliğe sahip bu bitkiler ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Ancak, özellikle endemik türler ile ilgili araştırılmayı bekleyen yüzlerce bitki vardır. Türkiye florasının %30’unu oluşturan aromatik bitkilerin çok önemli bir kısmının halen kimyasal içerikleri bilinmemektedir. Dünya üzerinde yetişen 250.000 çiçekli bitkinin etken madde bakımından çok azının araştırılmış olduğu düşünülürse keşfedilmeyi bekleyen çok sayıda bitki olduğu söylenebilir [Çelik, 2007; Solmaz, 2009].

Uçucu yağların da dahil olduğu bitki ekstraktlarının halk arasında çok yaygın bir kullanımı vardır. Ancak bu bitkilerin sağlık açısından potansiyel tehdit oluşturup oluşturmadıklarıyla ilgili bilgilerimiz sınırlıdır. Yeşil bitkilerin genel olarak doğal toksik ajanlar oldukları kadar mutajenik yada kanserojenik oldukları bilinmektedir. Birçok tıbbi bitkinin mutajenik, antikarsinojenik bileşenlere sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu durum, son yıllarda

alternatif tıptaki yaygın bitki kullanımı ekstraktların güvenilirliğinin sorgulanmasına neden olmuştur [Basaran vd., 1996]. Bitki ekstraktlarının sadece antimikrobiyal değil mutajen ve antimutajen ya da antikarsinojen etkileri ile ilgili çalışmalar da giderek artmaktadır [Caillet vd., 2011; Verschaeve ve Staden, 2008]. Mutajeniteye neden olduğunu düşündüğümüz radyo, televizyon, sentetik gıdalar gibi ajanların dışında doğal mutajenleri saptamak, kanser ve mutajen kaynaklı hastalıkların tedavisi için önemlidir [Korkmaz, 2005]. Bu ajanların mutajen/antimutajen veya karsinojen olup olmadıkları ise birçok yolla değerlendirilebilmektedir. Bunlar deney hayvanlarıyla yapılan araştırmaları ve devamında uzun sürebilecek histolojik çalışmaları kapsamaktadır. Fakat bu çalışmalar oldukça yüksek maliyetli ve çok zaman alan testler olduklarından araştırmacılar güçlü mutajenleri belirlemek için daha basit, ucuz ve kısa sürede sonuç veren kısa zamanlı test sistemlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Karsinojenite taramalarına esas olabilecek, kısa zamanda sonuçlanan ve düşük maliyetli birçok mutajenite test sistemi bu amaçla geliştirilmiştir. Bunlar içinden yaygın olarak kullanılan bir mikrobiyolojik test sistemi olan Ames *Salmonella/mikrozom* yönteminde yer almaktadır [İşcan, 2002].

Escherichia coli, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* (Ames) gibi mutant suşların kullanıldığı mikrobiyolojik kısa-sürelili testler, mikroorganizmaların hızlı üremeleri, genetik yapılarının ortaya çıkarılmış olması ve genlerdeki değişimlerin takip edilebilir olması nedeniyle mutajenite tespitinde oldukça kullanışlı olabilmektedir [İşcan, 2005; Korkmaz, 2005]. Çalışmamızda kullanılan *Umu*-testi ise, son yıllarda tanınan bir prokaryotik mutajenite testi olup Ames testine göre daha hızlı sonuç verdiği belirtilmektedir. Her iki test arasındaki korelasyonun araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur [İşcan, 2006]. *Umu*-test, Ames test ile uyumlu olup, tekniğin kullanılması açısından daha hassas, hızlı ve basittir [Miyazawa ve Hisama, 2000]. Prokaryotik organizmalarla yapılan mutasyon analizlerinin yanında ökaryotik mutasyon testlerin yapılması iki hücreli ve genetik yapıyı karşılaştırma olanağı sunar [İşcan, 2005]. Bu nedenle çalışmamızda ökaryotik mutasyon testleri de kullanılmıştır. Bilimsel çalışmalarda daha çok mutant *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* ve *Neurospora crassa* gibi ökaryotik mikroorganizmaların kullanıldığı testler söz konusudur. Bu testlerde kromozom ayrılmaması, baz değişimi, çerçeve kayması, gen değişimi gibi mutasyonlar belirlenebilmektedir [İşcan, 2005].

Bu tez çalışmasında Lamiaceae familyasına ait birçok bitki uçucu yağ bileşenlerinin araştırılması ve antimikrobiyal çalışmaların yanında olası mutajenik/antimutajenik etkilerin de belirlenmesi amaçlanmaktadır. Literatüre bakıldığında, *Salvia*, *Ballota* ve *Stachys* türlerinin biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı görülmekle birlikte Mersin (C4) endemik türleri olan *Stachys rupestris* Montbret Et Aucher, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* Boiss. P. H. Davis & Doroszenko ve *Salvia heldreichiana* Boiss. Ex Benthama" ile ilişkin antimikrobiyolojik ve mutajenik kıyaslamalarla ilgili herhangi bir veriye rastlanamamıştır. Çalışmamızda, *Stachys rupestris*,

Ballota saxatilis subsp. *brachyodonta* ve *Salvia heldreichiana* endemik bitkilerinin makrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri, Umu-test (*Salmonella thyphimurium* TA1535/pSK1002), Ames/ *Salmonella*/ Mikrosom ve *Neurospora crassa* testleri ile mutajenik özellikleri ve olası antimutajenik etkileri araştırılmıştır. Bu bitkilerin uçucu yağlarının, mutajenik veya antimutajenik potansiyellerinin, hem prokaryotik hem de ökaryotik testlerle kıyaslanması ve mikrobiyolojik yöntemlerle mutasyon testlerinin güvenilirliği ve pratikliğinin tartışılması, bundan sonraki çalışmalar için faydalı olacağını düşünmekteyiz.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, aromatik bitkilerden veya bitkisel droglardan elde edilen, kuvvetli kokulu ve buharla sürüklenebilen, yağimsı bileşenlerinin kompleks bir karışımıdır. Buldukları ortamdan su, buhar, kuru destilasyon veya sıkma yoluyla serbest hale gelebilirler. Uçucu yağlar, bitkilerin başta çiçek ve yapraklarında olmak üzere kök, meyve, tohum, yaprak, rizom gibi diğer dokularında da görülmektedir. Bağlı oldukları familyaya bağlı olarak belli oranlarda salgı tüyleri, salgı kanalları ve salgı ceplerinde bulunurlar. Bitki hormonlarının yapısını oluşturmakla birlikte hücreler arası bilgilerin taşınması gibi bitkide temel rollere sahiptirler. Uçucu yağlar oda sıcaklığında sıvı halde bulunan, kolayca kristalleşebilen terpenoid veya terpenoid olmayan bileşenlere sahiptirler [İşcan, 2002; Cheng vd., 2007, Pışkin, 2007; Çelik, 2007]. Terpenler ve terpenoidler; monoterenler, seskiterpenler, triterpenler, alkoller, eterler, aldehitler, esterler ve ketonlardan oluşurlar [Cowan, 1999]. Ayrıca terpenoidler, fenil propanoid, yağ asitleri, bunların esterleri veya parçalanma ürünleri şeklinde de olabilirler. Tüm uçucu yağlar hidrokarbonlar ve onların oksijenli türevleridir. Oksijenli bileşiklerin bir kısmının suda çözünür özelliklerinden faydalanılarak aromatik sular hazırlanmaktadır. Bazı uçucu yağlar azot ve kükürt türevleri içerebildikleri gibi, alkol, asit, ester, epoksit, aldehit, keton amin, sülfid gibi bileşenler de ihtiva edebilirler. Hücrelerde karbonhidrat ile bağlıdır ve bu durumda glikozitik bağın hidrolizi ile serbest kalırlar [Türk, 2010].

Uçucu yağların bitkilerde neden varolduğu ile ilgili birçok fikir öne sürülmüştür. Bazı araştırmacılara göre artık ürün olarak kabul edilen uçucu yağlar, koruyucu ajanlardır ve bitkilerin yaralanması sırasında meydana gelen reçinelerin çözünmesinde görev alırlar. Uçucu yağların böcekleri kaçırma ya da çekmek için üretildiği de düşünülmektedir. Uçucu yağları taşıyan bitkilerin hayvanlar tarafından yenilmediği ve çevresindeki yabancı otların da çimlenmediği düşünüldüğünde, bitkinin korunması ve neslinin sürdürülmesinde çok önemli bir yer tuttukları anlaşılmaktadır. Ayrıca uçucu yağ bitkileri sıcak iklim bölgelerinde serin iklim bölgelerine göre daha fazla sayıda bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar bunun nedenini, sıcaklardan korunmak için uçucu yağ üretmeye bağlamaktadırlar. Uçucu yağlar, sıcak havalarda buharlaşarak bitki üzerinde bir serinlik etkisi bırakmaktadır. [Çelen, 2011].

Bilindiği gibi uçucu yağların uçuculuk, hidrofobiklik ve solunum sisteminde etki gösteren özel kokulara sahip olma gibi özellikleri bulunmaktadır. Bitkilerden ve bitkisel droglardan elde edilen esansiyel yağlar, deriden ve akciğerlerden kolaylıkla absorbe edilebilirler. Araştırmacılar vücuda direk ilaç olarak ya da besinlerden katkı maddeleri olarak alınan uçucu yağların farmasötik ve genotoksik potansiyelleri hakkında daha fazla bilgiye sahip

olmak istemektedirler. Birçok çalışma esansiyel yağların pek çok etkisinin olabileceğini göstermiştir [Kılıç, 2005]. Uçucu yağların **antibiyotik etkileri** en yaygın bilinen özellikleridir. Bakterilere, virüslere ve protozoolara karşı oldukça aktiftirler. Temel yağların % 60'ının fungus, % 30'unun ise bakteri büyümesini inhibe ettiği belirtilmektedir [Cowan, 1999]. Uçucu yağlar farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından mikroorganizmaları etki dereceleri de bitkiden bitkiye değişebilmektedir. Hatta, uçucu yağların antimikrobiyal etkisi, bitkinin ekolojik koşullarına ve türüne bağlı olarak da değişebilmektedir. Ancak, antimikrobiyal özellikten yararlanılarak üretilen ilaçlara karşı, zaman içinde mikroorganizmalar dirençlilik kazanabilmektedir. Farklı olarak, antibiyotik dirençliliğine karşın mikroorganizmaların bitkilere karşı direnç kazandığı görülmemektedir. Bu durum bitki veya bitki karışımlarından oluşan drogların önemini kaçınılmaz olarak arttırmaktadır [Toroğlu ve Çenel, 2006].

Son zamanlarda yapılan diğer çalışmalar, temel yağların ökaryotik hücrelerde mitokondri gibi organellerin iç hücre membranını etkileyerek prooksidan benzeri davrandığını göstermiştir. Ancak uçucu yağların canlı hücrelerdeki çeşidine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişen bu sitotoksik etkiler, çoğunlukla antigenotoksik özelliğe sahiptirler [Bakkali vd., 2008]. Bu yüzden, uçucu yağların sitotoksik etkileri ile ilgili bir çok araştırma yapılmakta ve etki mekanizmaları tartışılmaktadır. **Sitotoksikite**, hücre membranının zarar gördüğü, membran potansiyelini veya geçirgenliğini kaybettiği şekilde ortaya çıkan etkilerdir. Bu etki mitokondri zarında iyon kanallarının kaybı, membranda bulunan lipid, protein yapılarının bozulması ya da stoplazmanın koagüle olması şeklindedir. Bakteriyel hücrelerde uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı olarak değişen bu sitotoksik etki, aynı zamanda bakterinin üreme eğrisinde hangi dönemde ortaya çıktığı ile de yakından ilgilidir [Bakkali vd., 2005; Bakkali vd., 2008]. Uçucu yağların sitotoksik etkisinin daha çok içeriğindeki fenoller, alkoller ve aldehydlerden kaynaklandığı belirtilmektedir [Sacchetti vd., 2005].

Uçucu yağların bir diğer etkisi ise **fitotoksik** etkidir. Uçucu yağ içerisinde bulunan ve ışıkla uyarılan bazı moleküller uyarıldıklarında hücrede radikal reaksiyonların oluşmasına neden olurlar. Örneğin oksijen radikalleri gibi moleküller oluştuklarında hücrede organeller veya DNA'ya bağlı proteinler üzerinde tahribata neden olmaktadır [Nathalie vd., 2006].

Uçucu yağın içerisinde yüzlerce çeşit madde vardır ve bunların herhangi birinin ya da hepsinin birbirleriyle etkileşimi ile **mutajenik etki** oluşabilmektedir [Korkmaz 2005; Bakkali vd., 2008]. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki pozitif korelasyon mutajenik etki oluşturabilecek maddelerin kansere de neden olabileceği şeklindedir [Loh vd., 2009]. Benzer biçimde bazı maddelerin mutajen etkileri dışında **antimutajen** etkilerinin de olabileceği bir gerçektir. Mutajen maddenin aktivasyonunu durduran bazı ajanlar yoluyla yapılan kanser araştırmalarında oldukça günceldir. Örneğin, yapılan bir çalışmada uçucu yağlarda bulunan α -bisabolol bileşiğinin, aflatoksin B1 üzerinde inhibe etkisi olduğu, yani aflatoksin mutajenine

antimutajenik etki gösterdiği Ames testi ile belirlenmiştir [Gomes-Carneiro vd., 2005]. Bazı uçucu yağların mutajenik özelliği olmadığı gösterilmiş ise de antimutajenite özellikleri ele alınmamıştır [Uysal, 2006; Martino, 2009].

Antimutajenite; Mutajenik maddelerin mutajen veya kanserojen etkilerinin ortadan kaldırılması ya da bunların DNA ile etkileşimlerinin önlenmesidir.

Antimutajenler etki etme şekillerine göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olmak üzere iki şekildedir. Mutajen ajanların hücreye girişini bloke eden yani DNA'nın yapısına dahil olmadan onları inaktif hale getiren antimutajenik maddeler **desmutajenler** olarak tanımlanmaktadır. Mutajenin DNA'nın yapısına katılmasından sonra DNA replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarının işleyişini düzenleyerek mutagenезisi azaltan maddeler ise **biyoantimutajenik** maddelerdir. Biyoantimutajenler, DNA polimeraz I ve DNA polimeraz III sentezini arttırarak ve hata-eğilimli DNA tamir mekanizmasını engelleyerek etki gösterirler. Antimutajenik özelliğe sahip olduğu bilinen bazı bileşikler ise şunlardır; polifenoller, flavonoidler, α -tokoferol, askorbik asit ve karotenoidler [Özbek, 2006].

Uçucu yağlar, petrol eteri, heksan, eter, etanol gibi organik çözücülerde çözünürler. Uçucu yağların kimyasal kompozisyonları ise Gaz Kromatografisi ve Kütle spektrometresi ile belirlenebilmektedir. Bugüne kadar uçucu yağ bileşiminde 2000'den fazla madde keşfedilmiştir. Bunların en önemlileri terpenler ve fenilpropanlardır [işcan, 2002; Cerit, 2008].

Uçucu yağlar yapılarında terpenoid veya terpenoid olmayan alkoller, asitler, aldehidler ve ketonların bulunduğu karmaşık kimyasal bileşenleri içermektedirler. Kimyasal yapılarına, aromatik özelliklerine ve farmakolojik-terapik etkilerine göre olmak üzere üç farklı şekilde sınıflandırılırlar.

2.1.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Uçucu yağların bileşimleri her bir bitkinin koşullarına göre farklılık gösterebilmektedir. Bunlar; terpenik bileşenler, aromatik bileşikler, düz zincirli hidrokarbonlar, azot ve kükürt taşıyan bileşikler gibi bir çok çeşitli kimyasal formasyonlara sahiptirler. Uçucu yağların temel yapısı olan terpenler farklı yapılarda fakat belli sayıda izopren birimlerine sahip olan bir molekül grubu olarak tanımlanmaktadır. Çizelge temel moleküler iskelette izopren sayılarına dayanan terpenlerin sınıflandırılmasını göstermektedir [Durceylan, 2007].

Çizelge 2.1.1.1. Terpenlerin izopren birimi sayıları ve karbon atom sayılarına göre sınıflandırılması.

Terpenler	İzopren birimi sayısı	Karbon atom sayısı
Monoterpenler	2	10
Seskiterpenler	3	15
Diterpenler	4	20
Sesterpenler	5	25
Triterpenler	6	30
Karotenoitler	8	40
Politerpen	> 100	> 500

Uçucu yağların %90'nını oluşturan terpenler, iki veya daha fazla isopren moleküllerinin baş-kuyruk düzenlemeleri yoluyla oluşan hücrenin ikincil metabolit bileşenleridir. Temel yapısal formülü $C_{10}H_{16}$ olup, iki isopren molekülünden bir monoterpen oluşur. C_5H_8 bileşikleri hemiterpenlerdir. Uçucu yağların asıl önemli olanları oksijenli formlarıdır. Çünkü, terpenlerin oksitlenmesiyle oluşan oksijenli türevler yağın kendine özgü koku ve terapik özelliğini oluşturur [Cellat vd., 2011; Cowan, 1999].

2.1.1.1. Monoterpenler

Monoterpenler, iki isopren biriminden ($C_{10}H_{16}$) oluşur. En basit iskelet yapısı 2,6-dimetiloktan"dır. Bitki uçucu yağında en fazla monoterpenler bulunur. Üç grup altında toplanırlar. Asiklik monoterpenler grubunda, osimen, citral, nerol, linalol, citronellal, geraniol bulunur. Gül, bergamut, kışniş, melisa, limon, safran gibi bitkilerde saptanmışlardır. Monosiklik monoterpenler, nane, kimyon, okaliptus, defne gibi bitkilerin yapısında bulunan bileşenlerdir. Terpinen, mentol, menton, kuminal, limonen bu grubun üyeleridir. Bisiklik monoterpenler grubunda ise, sabinen, tujon, kamfen, kamfor, fençon sayılabilir. Bu bileşiklerin yaygın olarak bulunduğu bitkiler ise, pelin otu, kuş dili, kedi otu, solucan otu, pire otu olarak sayılabilir [Türk, 2010; Cellat vd., 2011].

2.1.1.2. Seskiterpenler (C15)

Üç izopren ünitesinden oluşan seskiterpenler, terpenlerin en geniş sınıfını oluştururlar. Lineer, dallanmış yada siklik olarak bulunurlar. Özellikle tat ve ilaç bileşeni olarak endüstride önemli bir yeri vardır. Seskiterpenler, kimyasal yapılarına göre monosiklik, bisiklik ve trisiklik seskiterpenler olarak isimlendirilirler. Monosiklik seskiterpenlere örnek olarak α -bisabolen doğada geniş olarak yayılmıştır. Bu seskiterpen bileşiği, bergamot (turunçgil), mür (reçine) ve çeşitli uçucu yağların bir bileşenidir. Bunun oksijenli türevleri, papatyada bolca bulunan α -

bisabolol ve *b*- bisabolol"dur. Bisiklik seskiterpen yapısında olan Cadinen, hint biberi tohumu yağı gibi uçucu yağların pek çok çeşitlerinde bulunan, birçok izomerik bileşiğin adıdır. Aslında, ardiçtan türetilir. Temel iskeleti kadalın (4-izopropil-1,6- dimetildekahidronaftalin) molekülünden oluşur. Önemli sterokimyasal izomerler *a*- kadinen, *g*-kadinen ve *d*-kadinen"dir. Bu grup naftalin tipli seskiterpenler olarak da bilinir. Bir diğer grup bisiklik seskiterpen bileşiği *α*-selinen, *β*-selinen, *g*-selinen ve *d*-selinendir, Kereviz yağı ve diğer birçok yağda bulunur. Birçok yağda bulunan tersiyer alkoller olan *a*-eudesmol, *β*-eudesmol ve *g*-eudesmol selinenlerin oksijenlenmiş formlarıdır. Asiklik seskiterpenler ise Şerbetçiotu yağı ve diğer pek çok yağda bulunan *β*-farnesen ve *a*-farnesen yapı izomerleridirler. Bir başka asiklik seskiterpen olan farnesol gül, akasya ve siklamen gibi çiçek yağlarında yaygın olarak bulunabilmektedir [Türk, 2010; Cellat vd., 2011].

2.1.1.3. Diterpenler (C20), Triterpenler (C30) ve Tetraterpenler (C40)

İsopren birimlerinin farklı baş-kuyruk şeklinde yeniden düzenlenmesi ile diterpen (C20), triterpen (C30), tetraterpen (C40) formasyonları oluşur (Cowan, 1999). Diterpenler genel olarak reçinelerde (örneğin pimerik asit ve abietik asit) bulunur. Bazı diterpenler örneğin fitol gibi uçucu yağların dabileşenleridir.

Terpenli bileşiklerin oksijenli türevlerinden birçoğu yağda karışık halde bulunmaktadır. Oksijensiz olanlar kolay uçucudurlar. Bazı uçucu yağlarda çöken kısımda doymuş hidrokarbonlar bulunabilir. Çöken kısmına stearoptene, bu koşullarda sıvı halde kalan kısmına da elaoptene adı verilir. Uçucu yağlara fraksiyonlu destilasyon uygulandığı zamanda ilk ele geçen fraksiyonlar eleoptenden oluşan oksijensiz bileşiklerdir [Umay, 2007; Türk 2010].

2.1.2. Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Aromatik maddeler, terpenlerden sonra uçucu yağlarda bulunan önemli bileşiklerdendir. Benzen, propilbenzen ve p-simen önemli bileşenlerindendir. Yapılarında asit, alkol, ester, aldehit, keton, fenol ve eter gibi organik fonksiyonel gruplar bulundurulur. Üç farklı gruba ayrılmaktadırlar.

- i.* Aromatika (çok kokulu ve tadı iyi olanlar)
- ii.* Aromatika-aroma (kokulu ve tadı acı olanlar)
- iii.* Aromatika-akria (kokulu ve tadı keskin olanlar) [Umay, 2007; Hacıoğlu, 2006].

2.1.3. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre Sınıflandırılması

Uçucu yağlarının içeriğinin zenginliğinden dolayı bir uçucu yağ bir çok hastalık için kullanılabilir. Uçucu yağlar farmakolojik-terapik özelliklerine göre farklı gruplarda incelenebilir. Bunlar;

Uyarıcı (stimulan), antiromatizmal

Balgam söktürücü (ekspektoran), öksürük kesici (antitusif) İdrar söktürücü (diüretik)
Gaz giderici (karminatif), safra söktürücü (kolagog) Solucan düşürücü (antihelmintik)
İltihap azaltıcı (antienflamatuar)

Dezenfektan, antiseptik ve antibiyotik olarak kullanılabilirler [Hacıoğlu, 2006].

2.2. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları

Araştırmacılara göre, doğal bileşikler hücrelerde doğrudan ya da dolaylı olarak hücrelerin biyokimyasal süreçlerini etkilemekte, fizikokimyasal bütünlüğünü bozmaktadır. Özellikle hidrofobik yapıda olan terpenler, hücre duvarı ile etkileşime geçerek hücre duvar bütünlüğünü hasara uğratmaktadır. Terpenlerin hidrofobik özelliği hücre duvarındaki lipitler ile interaksiyonu lipitlerin bir arada toplanmasına ve zarın geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Doğal olarak fizikokimyasal yapının bozulması, hücrede proton hareketi ve elektron akışının ve dolayısıyla taşınım aksaklıklarına ve hücre içeriğinin koagülasyonuna neden olacaktır. Herhangi bir doğal bileşenin hedef bölgeyi etkilemesiyle oluşabilecek zincirleme reaksiyonların da hücrenin başka bir bölgesinde benzer hücre tahribatına neden olabileceği ve ayrıca hücre duvarında bulunan proteinleri de etkiledikleri saptanmıştır [Silva ve Fernandes, 2010].

Gram pozitif ve Gram negatif hücre duvar yapıları bilindiği gibi elektron mikroskopunda oldukça farklı bir görünüme sahiptirler. Gram negatif hücre duvarı çok tabakalı ve karmaşık yapıya iken, Gram pozitif bakteri duvarı tek tip bir molekülden oluşmaktadır. Bakteri hücre duvarının temel yapısını oluşturan bu molekül peptidoglikan yapıdadır ve Gram negatif hücre duvarının %10'unu oluştururken, Gram pozitif hücre duvarında %90 oranında bulunmaktadır. Polisakkarit yapıda olan peptidoglikan, *N-asetil glukozamin* ve *N-asetilmuramikasit* ve az sayıda özgül aminoasitten oluşur. Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan yapı ile birlikte, teikoik asit ve lipoteikoik asitler bulunmaktadır. Negatif yüklü olan teikoik asitler hücre yüzeyinin negatif elektrik yükünden sorumludurlar [Sikkema vd., 1995].

Gram negatif bakteriler, Gram pozitiflerden farklı olarak peptidoglikanın dışında ikincil bir dış membrana sahiptir. Bu dış zar çift katlı lipidlerden oluşmaktadır. Fosfolipid, protein ve polisakkarit kompleksinden oluşan bu yapı lipopolisakkarit (LPS) yapıdadır. Gram negatif hücre duvarında bulunan yoğun lipit tabakaya rağmen, küçük ve hidrofilik bileşenlerin geçişine izin veren porinler bulunur. Ayrıca periplazmik boşlukta bulunan onlarca protein, madde parçalanımı, madde alımı ve taşınmasından sorumludur [Çökmüş, 2010]. LPS tabakası, bakterinin hidrofobitesini arttıran, ozmotik basınca karşı daha dayanıklı olmasını sağlayan ve bakterilerin patojenik etkisine neden olan bir tabakadır [Beveridge, 1999; Navarre, 1999]. LPS, aşırı hidrofobik (lipofilik) moleküllerin hücreye girişini belirgin biçimde yavaşlatırken, porin kanal proteinlerindeki değişiklikler hidrofilik moleküllerin girişinde bir bariyer oluşturmaktadır. Son yıllarda doğal dirençte etkili mekanizmanın stoplazmik membrana yerleşim gösteren aktif pompa proteinleri olduğu bulunmuştur ve bunlar Gram pozitiflerde yaygın olarak saptanmıştır [Hasdemir, 2007].

Bitkiler sınırsız sayıda aromatik bileşikler üretme yeteneğine sahiptirler. Bu bileşikler çoğunlukla fenolik ve onların oksijene bağlı türevlerinden oluşmaktadır. İkincil metabolitler olarak üretilen bu bileşiklerin Şimdiye kadar 12.000 tanesi izole edilebilmiştir ve bu sayı tüm aromatik bileşiklerin sadece %10'unu oluşturmaktadır. Bu bileşenlerin çoğunluğu bitki savunma sistemi için gerekli olup, koku ve pigment oluşumunda rol oynayan terpenler, kinonlar ve taninler antimikrobiyal araştırmalarda kullanılmaktadır [Cowan 1999, Silva ve Fernandes, 2010]. Yüzyıllar boyunca antienfektif olarak kullanılan sayısız bitki drogları mevcuttur. Özellikle etken maddesi ilk keşfedilenlerden bazıları *Allium sativum* L."daki allininin antibiyotik etkisi ve *Hydrastis canadensis* L."deki berberinenin antimikrobiyal etkisi gibi olmuştur [Iwu, 1999]. Benzer şekilde, *Cephaelis ipecacuanha* Rich."in toprak kısımlarından izole edilen izokinolin alkaloid emetin, *Escherichia histolytica* enfeksiyonuyla yayılan apselerin tedavisinde ve ameobesidal ilaç olarak yıllardır kullanılmaktadır [Iwu, 1999]. Çoğunlukla distilasyonla elde edilen aromatik yapıdaki bu bileşenler, terpenler gibi uçucu moleküllerden, terpenoidlerden, fenol türevli bileşiklerden ve alifatik yapıdaki maddelerden oluşan kompleks bir yapı içermektedir. Uçucu yağların içeriğindeki sayısız bileşeninden dolayı, direk olarak bir hedef bölgeye etki ettiği söylenemez. Uçucu yağların neden olduğu sitoplazma koagülasyonu ile lipit ve proteinlerin hasarı oluşmakta ve bunun sonucunda hücre duvarında ve membranda görülen bu hasar, makromoleküllerin akışına etki ederek lizise neden olmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* ile ilgili çalışmalar, uçucu yağların sitotoksitesinin uçucu yağın kimyasal bileşenine bağlı olmasının yanında, koloni oluşturma yeteneği ve mikroorganizmanın büyüme fazıyla da ilgili olduğunu göstermiştir. *S. cerevisiae* büyüme fazında *Origanum compactum* Benth. (0.45µL/ml), *Coriandrum sativum* (1.6 µL/ml), *Cinnamomum camphora* (8 µL/ml), *Artemisia herba-alba* (8 µL/ml) ve *Helichrysum italicum* (8 µL/ml) uçucu yağlarının yüzde elli orandaki

öldürücü etkisi ortaya çıkarılmıştır. Mikroorganizmaların büyüme fazında, uçucu yağlara karşı gösterdiği hassasiyetin, sitotoksik bileşenlerin hücre duvarına bu fazda daha verimli bir şekilde nüfuz etmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Genel olarak, uçucu yağların sitotoksitesi yapısındaki fenoller, aldehidler ve alkollerden kaynaklanmaktadır [Bakkali vd., 2008].

Uçucu yağların antimikrobiyal özellikleri, yağın konsantrasyonuna, bileşenlerine, bileşenlerinin yapısal özelliklerine, konfigürasyonlarına, yan gruplarına ve bu bileşenlerin birbirleriyle olan interaksiyonlarına bağlı olarak değişmektedir. Fenolik bileşikler olarak bilinen carvacrol, eugenol ve thymol bileşenlerinin antimikrobiyal özelliklerinin oldukça yüksek olduğu belirtilmektedir. Bu sınıfın üyelerinin hem bakteriyosidal hem de bakteriyostatik ajanlar olduğu belirtilmektedir. Bu bileşikler bir dereceye kadar suda çözülmüş hallerinde güçlü biçimde aktiftirler. Fenolik yapıdaki karvakrolün hidroksil yan gruplu formu ve metil ester yan gruplu yapısı aktivite bakımından karşılaştırılmıştır. Hidroksil gruplar, farklı bileşiklerde farklı antimikrobiyal aktivitesi oluşturmaktadır. Fenol yapısındaki bileşiklerin asetat yan gruplarının antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığı belirlenmiştir. Alkollerin de bakteriyostatik etkisinden ziyade bakteriyosidal etkisi olduğundan vejetatif bakteriler üzerinde protein denatürasyonuna neden olmaktadır. Formaldehit, Glutaraldehid gibi aldehitler bakterilerde elektronegatifliği arttırarak antimikrobiyal etki oluşturmaktadır. Bakteriyostatik ve fungistatik etkinin terpenlerin karbonillenmesiyle arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, stereokimyasal yapı da biyoaktivite üzerine etkilidir. α - pinene gibi α -isomer yapılar β -izomerlere göre daha inaktiftirler; cis-izomerleri trans izomerlerine göre daha inaktiftir [Dorman ve Deans, 2000].

Lauraceae familyasına ait bazı bitkilerle yapılan çalışmada antifungal ajanlar araştırılmıştır. En etkili uçucu yağın sırasıyla, *Cinnamomum zeylanicum* (tarçın), *Aniba rosaeodora* ve *Sassafras albidum* ve *Laurus nobilis* olduğu belirtilerek bu çalışmada, tarçın uçucu yağının yüksek aktivitesinin, içeriğinde bulunan yüksek trans-sinmaldehitten kaynaklandığı ve antifungal aktiviteye de içeriğindeki oksijenlenmiş bileşiklerin neden olduğu saptanmıştır [Simic vd., 2004].

Birçok ilaca karşı yüksek direnç gösteren *Staphylococcus*, *Enterococcus* ve *Pseudomonas* bakterilerine karşı *Ocimum basilicum* uçucu yağının aktif olduğu belirlenmiştir [Opalchenova ve Obreshkova, 2003].

Bazı uçucu yağların ise çok düşük konsantrasyonlarda bile bakterilere oranla funguslarda daha etkili olduğunu gösteren çalışmalara rastlanmaktadır. Örneğin, α -bisabolol, chamazulene, farnesene gibi seskiterpenik bileşenlerce zengin *Matricaria recutita* L. uçucu yağının 3 gl⁻¹ konsantrasyonunda *Aspergillus* ve *Fusarium* türlerinin büyümesini %91 oranında inhibe ederken, *Helicobacter pylori* bakterisini ancak 125 gl⁻¹ konsantrasyonda ve %90 inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır [Petronillo vd., 2012].

Capsicum cinsi bitkilerin çoğunun ana maddesini oluşturan kapsaisin, özellikle *Bacillus*

subtilis ve *Saccharomyces cerevisia* mikroorganizmalarına karşı olan yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinen örnekler arasındadır [Kurita vd., 2002].

Bazı bitki uçucu yağlarının temel bileşenlerini oluşturan timol, karvakrol, ogenol, sinnamik asit ve diasetil bileşenlerinin nisin ile etkileşimleri araştırılmıştır. Nisin, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bir bakteriosindir ve gıda endüstrisinde kullanılan antimikrobiyal bir ajandır. Nisinin Gram pozitif bakterilerde sporulasyonu engellediği, Gram negatiflerde ise herhangi bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir. Bunun nedeninin Gram pozitif bakterilerdeki dış membranın hidrofobik bileşiklere ve makromoleküllere karşı oluşturduğu özel bariyer sebebi olduğu bilinmektedir. *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* Gram negatif bakterilerine karşı nisin hiçbir etki göstermeyerek, mikroorganizmalar üzerindeki hücre membranı parçalayıcı özellikleri bilinen timol ve karvakrolün etkilerini değiştirmemiştir. Sadece, nisin ile diasetil kombinasyonu sonucu *Salmonella typhimurium* üzerinde diasetil aktivitesini etkilemiştir. Hücre duvarına nisinin etkisi nüfuz edememiş ancak antagonist etki oluşmuştur [Olasupo vd., 2003].

2.3. Uçucu Yağların Mutajenik ve Antimutajenik Etkileri

Genetik materyalde herhangi bir kimyasal ajan tarafından veya kendiliğinde oluşan kalıcı baz değişimleri mutasyonlardır ve mutasyona sebep olan ajanlar ise mutajenlerdir. Çevremizde biyolojik etkileri bilinmeyen ve oldukça fazla maruz kaldığımız sentetik ve doğal mutajenler bulunmaktadır. Mutasyonlar kansere neden olabilmektedir. Günlük yaşamda televizyon bilgisayar gibi araçlarla X ışınları, gama ışınları ve radyasyon kaynaklarının biyolojik sistemlere verdiği zararlar ve kanserojen etkisi bilinmektedir. Buna karşın birçok araştırmacı doğal yolla alınan mutajen bileşiklerin, radyasyondan çok daha zararlı olduğunu savunmaktadır. Çünkü, ilaçlarla veya gıdalarla alınan mutasyon etkili maddelerin kontrolünü yapmak zordur [Korkmaz, 2005].

Mutajenite ve karsinojenite arasındaki olası paralel ilişki yıllardan beri bilinmektedir [Loh vd., 2009]. Karsinojenlerin araştırılmasında mutajenitenin temel teşkil etmesinin nedenleri genetik kodun ve genetik sistemin tüm canlılarda evrensel oluşu ve karsinojenite ve mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur. Yine de mutajen etkisi olan maddenin karsinojen etkisi olabileceği anlamına gelmez. Benzer şekilde bazı maddelerin mutajen etkilerinin dışında antimutajen etkilerinin de olabileceği bilinmektedir. Antimutajenite özelliğe sahip ajan, mutajen maddenin aktivasyonunu inaktif hale getiren yada genler üzerindeki mutasyonu değiştirebilen maddelerdir. Bazı uçucu yağların mutajenik özelliği olmadığı gösterilmiş ancak antimutajenite özellikleri bilinmemektedir. Bakteriyel test sistemleri, insanların maruz kaldığı maddelerin mutajen ve antimutajen etkisinin belirlenmesinde, kimyasalların genler üzerindeki

değişimlerinin saptanmasında ve maruz kalınan kimyasalın DNA üzerindeki hasar oranının saptanmasında araştırmacılara ışık tutmaktadır [Uysal, 2006; Martino vd., 2009].

Yapılan bir çok çalışma uçucu yağların ve bileşenlerinin çoğunlukla mutajen etki göstermediği yönündedir [Bakkali vd., 2008; Evandri vd., 2005]. Beric ve arkadaşları *Ocimum basilicum* uçucu yağı ve yağın temel bileşeni olan linalool'un *Salmonella/microsome* ve *Escherichia coli* WP2 suşları üzerinde mutasyona neden olmadıklarını belirtmişlerdir [Beric vd., 2008]. Ames testi ile çalışmada, *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Hyssopus officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*, mutasyon analizlerinin negatif olduğu gösterilmiştir [Martino vd., 2009]. Daha az sayıda da olsa uçucu yağların mutasyon etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar vardır [Lazutka vd., 2001]. Uçucu yağın içerisinde yüzlerce çeşit madde vardır ve bunların herhangi birinin ya da hepsinin birbirleriyle etkileşimi ile mutajenik etki oluşabilmektedir [Patenkovic vd., 2009]. *Mentha spicata* (Menton) ve *Pinus sylvestris* (pine) bitki uçucu yağları birçok ülkede güvenliği kontrol edilmeden yiyecek ve içeceklerde, deterjanlarda, kozmetikte, sabunlarda koku katkı maddesi ve tarımda böceksavar olarak kullanılmaktadır. *Mentha spicata* (Menton) ve *Pinus sylvestris* (pine) uçucu yağlarının genotoksik etkileri somatik mutasyon-rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılmış ve sırasıyla *Drosophila melanogaster* ve insan lenfosit hücreleri üzerinde mutasyon etkisi olduğu saptanmıştır [Bağdat, 2006; Korkmaz, 2005]. Uçucu yağ bileşenlerinden karvakrol, timol ve sinnalaldehit maddeleri Ames mutajenite testi ile araştırılmıştır. Sonuçta, toksik olmayan dozlarda, bu maddelerin zayıf mutajen olabileceği vurgulanmıştır [Mezzoug vd., 2007].

Gıda katkı maddeleri dışında, geleneksel tedavide kullanılan *Capsicum* kökenli kapsaisin ana maddeli bitkilerin, birincil sensor nöronlarla interaksiyon oluşturduğu ve eksitasyon, desensitizasyon ve nörotoksisiteye neden olduğu belirtilmiştir. Kurita ve çalışma ekibinin, kapsaisin doğal bileşeninin *Saccharomyces cerevisia* üzerindeki etkisini belirleyen DNA-mikroarray çalışması, mekanizma hakkında detaylı bilgiler sunmaktadır. Kırmızı bibere acımsı tadı veren bu maddenin mikroorganizmalar üzerindeki inhibitör etkisi, maya üzerinde bulunan 6,000 genden 39 genin etkilendiği sonucuna ulaştırmıştır. Bu genlerin ise, çoklu ilaç direnci ile ilgili genler, membran biyosentezinden sorumlu genler, stres proteinlerini kodlayan genler ve tespit edilemeyen diğer genler olduğu belirtilmiştir [Kurita, 2002].

Bir maddenin kanserojenik potansiyeli, deney hayvanları veya insanlarla yapılan patolojik ve histolojik testlerinde akabinde yapılmasını gerektiren uzun zaman alıcı tekniklerle belirlenebilmektedir. Bu nedenle canlı hayvan yerine üremeleri çabuk gözlenebilen ve DNA yapıları aydınlatılmış bakterilen kısa zamanlı testler için seçimi mutasyon analizlerinde avantaj oluşturmaktadır. Ayrıca, mutajenlere karşı bakterilerin memeli hücrelerine göre çok daha duyarlı olması mutajenlerin belirlenmesi açısından önem kazanmaktadır. Kısa zamanlı bakteriyel testlere memelilerdekine benzer metabolik süreçler oluşturması açısından metabolik

aktivasyon yapabilen rodent hücreleri veya insan karaciğerinden elde edilen mikrozomlar eklenmektedir [Barış, 2007].

Epidemiyolojik çalışmalar, uçucu yağ bileşenlerinin kanseri önleme ve iyileştirme aşamasında önemli etkilere sahip olduklarını göstermiştir. Son zamanlarda bu bileşenlerin antikanser mekanizmaları ile ilgili bazı hipotezler öne sürülmektedir. Uçucu bileşenlerin antikanser etkilerinin daha çok hücre apoptozisinin indüklenmesi, tümör hücrelerinde farklılaşma, kanser hücrelerinin moleküler mekanizmalarının düzenlenmesi şeklinde olduğu belirtilmektedir. Monosiklik bir monoterpen olduğu bilinen D-limonene bileşeninin doza bağlı olarak prostat, pankreas, karaciğer, kolon, akciğer kanserlerini önlediği belirtilmiştir. D-limonene ve türevlerinin antikanser etkilerinin, hücre büyümesi ve hücre sel sinyal iletimini düzenleyen onkoprotein p21^{ras}'in post-translasyonel isoprenilasyonunun inhibisyonu şeklinde olduğu belirtilmiştir. Bu inhibisyon ise, gen ekspresyonunun değişmesi, apoptozisin oluşması, hücre sel farklılaşma ve tümörün gerilemesi şeklinde olabilmektedir. D-limonenin kan dolaşımındaki perillik acid, dihydroperillik acid ve D-limonene-1,2-diol metabolitlerinin farmakolojik etkilerinin D-limonene göre daha güçlü olduğu belirtilmiştir. Bir diğer antikanser mekanizma ise Perillyl alkol monoterpeni ile yapılan çalışmalar sonucunda oluşmuştur. Kolon, karaciğer, mide ve pankreas kanserlerinde görülen antitümör etkinin, Perillyl alkolün, antikanser etkisinin, proliferasyon ve hücre farklılaşmasından sorumlu bir protein olan TGF- β sinyalinin (değiştirici büyüme faktörü) aktivasyonuna neden olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. TGF- β aktivasyonu ile Bax, Bak ve Bad gibi proapoptotik proteinler ve siklin bazı kinazları indüksiyona uğramakta ve devamında hücre apoptotik sürece girmektedir. Perillyl alkolün tümör hücrelerinde aktif olduğu bir başka mekanizma ise, mitokondri solunum sisteminin önemli bir elementi olan koenzim Q sentezini inhibisyona uğratmasıdır. Plazma membranında bulunan Koenzim Q proteinin, perillyl alkol tarafından redüksiyonu, sinyal iletimini ve metabolizmayı etkilemekte, hücreyi apoptozise götürmektedir. Ayrıca, Monoterpenler dışında ursolic asit, oleanolic acid gibi teriterpenlerin antikanser aktivitelerinin ise tümör nekrozis faktörün (TNF) etkinliğini artırarak etkili oldukları belirtilmiştir [Paduch vd., 2007]. Melanoma hücreleri üzerinde yapılan çalışmada, betulinik asit triterpeninin, taxol benzeri kanser ilaçlarına göre daha etkin antikanser aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir [Patočka vd., 2003].

2.4. Kısa Zamanlı Prokaryotik Mutajenite Test Sistemleri

Doğal ve yapay mutajenler insanlarda görülen birçok kanserin asıl nedenleridir. Endüstrileşme ile birlikte doğal ve yapay kimyasalların oluşturduğu mutasyonlar hızla artmış ve sonuçta oluşan kanser ve diğer kalıtsal hastalıklar ile ilişkileri bilim adamları tarafından

değerlendirilmeye çalışılmaktadır. Bu değerlendirmenin en iyi yolu deney hayvanlarında oluşturulan tümör indüksiyonudur. Fakat bu test maliyeti oldukça yüksek ve çok zaman alan testler olduklarından araştırmacılar güçlü mutajenleri belirlemek için daha basit, ucuz ve kısa sürede sonuç veren kısa zamanlı test sistemleri geliştirmektedirler. Mevcut kısa zamanlı testler içerisinde bakterilerin kimyasalla muamele edilmesi sonucunda hızlı büyümesi ve oluşan popülasyonların sayısının çok büyük olması nedeniyle bu testler çok basit, çok hızlı ve ucuz olan testlerdir. Bakteri genetiğinin anlaşılır olması, mutajenik ajanlara daha duyarlı suşların oluşturulmasını sağlamıştır. Ayrıca, endüstriyel kimyasallar ve ilaçlardaki mutajenik iz elementleri belirlemek, oluşan mutasyonlar sonucu DNA'daki hasar tiplerinin anlaşılmasını sağlamak için oldukça uygun testlerdir [Şen, 2005].

Her bakteriyel kısa zamanlı test sisteminin, avantajları ve dezavantajları vardır. Örneğin her bir test, sadece birkaç mutajeni belirleyebilir. Bu nedenle değişik testlerin birbirini izleyen seriler halinde uygulanması, bakteriyel test sistemlerinin verimliliğini artırır [Şen, 2005]. Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanları bakteriyel testlerdir. Bakterilerin hızlı üremeleri, basit ve ucuz tekniklerle kolay sonuca ulaşılabilmesi mutasyon araştırmalarında bir avantaj oluşturmaktadır [Özbek, 2006].

Bakteriyel mutasyon testlerinden en yaygın kullanılanı, ilk kez 1975 yılında Dr.B. Ames tarafından geliştirilen Ames testidir. *Salmonella*-mikrozom test sistemi olarak da isimlendirilen Ames testi, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen/karsinojen araştırmalarında geçerliliği en fazla kabul edilmiş test sistemlerindedir. Bu sistem, S9 varlığında veya yokluğunda, oksotrofik, histidin aminoasitine ihtiyaç duyan, mutant, *Salmonella typhimurium* test bakterileri kullanılarak yapılmaktadır [Özbek, 2006].

Çizelge 2.1. Mutajenik ajanların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bazı prokaryotik kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar [Özbek, 2006].

Kısa zamanlı testler	İzlenen genetiksel/biyokimyasal yollar
<i>Salmonella typhimurium</i> (Ames)	Histidin oksotrofları
<i>Escherichia coli</i>	Arjinin-triptofan oksotrofları Profaj indüksiyonu Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu SOS cevabı
<i>Bacillus subtilis</i>	DNA onarımı hatalı suşları

Çalışmamızda ise Ames testi yanında son yıllarda geliştirilmiş olan ve diğer prokaryotik mutajenite testlerine göre daha güvenilir olduğunu tespit ettiğimiz *Umu* (*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002) testi kullanılmıştır.

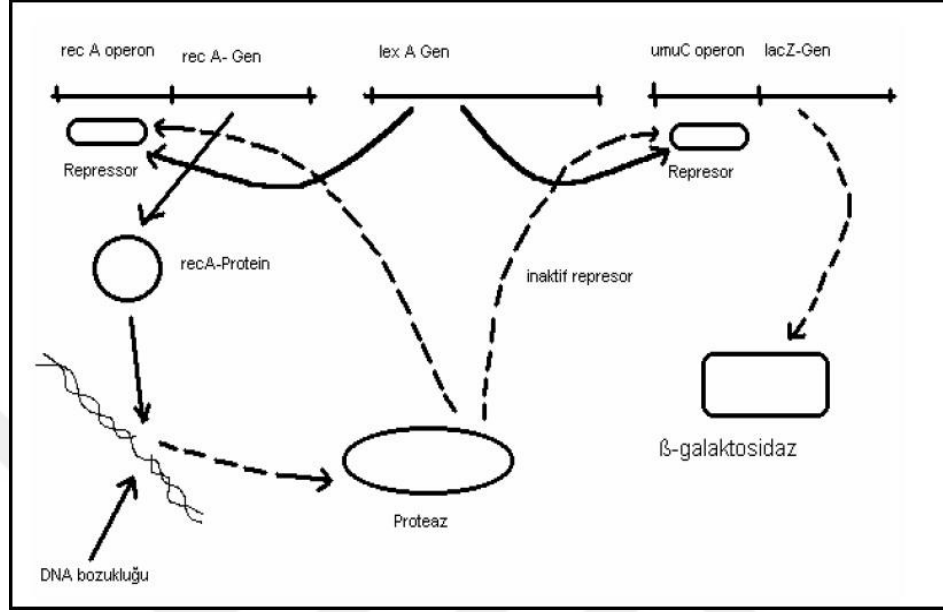
2.4.1. *Umu-Test (Salmonella thyphimurium TA1535/pSK1002)*

Umu-test, çeşitli karsinojenlerin ve mutajenlerin genotoksik etkilerinin belirlenmesi için geliştirilen kısa zamanlı bakteriyel bir testtir. Bu testin çalışma prensibi, DNA'ya hasar veren ve kanserojen potansiyeline sahip ajanları *umu* operonu tarafından tanınması esasına dayanır [Durusoy ve Kambur, 2003; Caillet vd., 2011].

Salmonella thyphimurium TA1535/pSK1002 (Gram negatif, fakültatif anaerobik *Enterobacteriaceae*) mutant suşunun kullanılması üzerine oturtulmuş kısa zamanlı bir mutajenite testidir [Wittekindt vd., 2000]. *Umu-Test*'in prensibi, DNA'ya hasar veren ve kanserojen potansiyeline sahip ajanları *Umu* operon tarafından tanınmasıdır. *E. coli* CSH26/pSK1002 susundan pSK1002 plasmidi (*UmuC-lacZ* geni taşıyor) hazırlanıp, önce *S. thyphimurium* SJ10002 suşuna modifiye edilmiş olup, sonrasında hazırlanan plazmid *S. thyphimurium* TA1535 (*hisG46*, *rfa*, *uvrB*) suşuna transforme edilerek *S. thyphimurium* TA1535/pSK1002 suşu elde edilmiştir. TA1535/pSK1002 suşu ürettiği bir bileşik gen ile β -galaktosidaz aktivitesini, *Umu* operon ekspresyonunun seviyesini ölçebilmektedir. *UmuC-lacZ* bileşik geninde; *Umu* operon, DNA-hasar ajanları tarafından etkilenerek *recA* ve *lexA* genleri tarafından genetik olarak düzeltilir [Ono vd., 2000]. *Umu-test* ölçümlerinin dayandığı mekanizma ise bakteride zor koşullarda yaşama pahasına hatalı DNA dizilimi yapmasına olanak veren SOS gen bölgesidir. SOS kromotest bakteriyel hızlı test olarak bilinen *Umu* testin mekanizması ise şöyledir;

DNA hasarı ile indüklenen SOS cevabı, potansiyel ve ölümcül stresler varlığında hücrenin kendini korumasına yardımcı olan metabolik bir alarm sistemidir. UV ışınları, timin yokluğu ve DNA-modifiye edici ajanların varlığı SOS cevabını indükler (şekil 2.1). SOS cevabının regülasyon mekanizmasının moleküler seviyede açıklanmasında, iki regülatör gen önemli rol oynamaktadır. Bunlar *recA* ve *lexA* genleridir. DNA hasarının oluşması ve SOS cevabının indüklenmesiyle birlikte *recA* proteini proteaz aktivitesi kazanarak SOS cevap genlerini baskılayan *lexA* represör proteinini parçalar. Bu genin ürünü olan *lexA* proteini, SOS cevap genlerinin represörüdür. B-galaktosidaz enziminin yapısal geni olan *lacZ* geni ile SOS cevap genlerinden biri olan *sfiA* geni arasında bir füzyon oluşturulmuştur. *UmuC-lacZ* füzyonunda, *UmuC* geninin promotorunun ortak kullanılmasıyla B-galaktosidaz enziminin sentezinden sorumlu olan *lacZ* yapısal geni ifade edilebilmektedir. *UmuC-lacZ* operon füzyonu taşıyan test suşları, normal *lac* bölgesi için bir delesyona sahiptirler. Bu nedenle test suşlarında β -galaktosidaz enziminin aktivitesi kesinlikle *sfiA* geninin ifade edilmesine bağlıdır. Herhangi bir genotoksik ajan tarafından indüklenmeyen hücrelerde *lexA* represör proteini, *UmuC-lacZ* füzyonunun ifade edilmesini baskılar. Genotoksik bir ajan tarafından uyarılan hücrelerde, DNA hasarının oluşması ve replikasyonun duraklamasıyla birlikte, *recA*

proteini proteaz aktivitesi kazanarak, SOS cevap genlerinin indüksiyonunu baskılayan *lexA* represör proteinini parçalar. Bunun sonucu olarak, diğer SOS cevap genleri ile birlikte *UmuC* geninin de indüksiyonu başlar [Oda, 1985].



Şekil 2.1. *Umu-test* in moleküler genetik seviyesinde prensibi [şenel, 2006].

Oluşturulan TA1535/pSK1002 suçu ürettiği bir bileşik gen ile β -galaktosidaz aktivitesini, *umu* operon ekspresyonunun seviyesini ölçebilmektedir. *UmuC*-,*lacZ* bileşik geninde; *umu* operon, DNA hasar ajanları tarafından etkilenecek *recA* ve *lexA* genleri tarafından genetik olarak düzeltilir. *Salmonella thyphimurium* TA1535/pSK1002 suçu üzerinde bulunan kontrol amaçlı mutasyon genler şunlardır.

i. *R faktörü:*

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. thyphimurium* TA1535/pSK1002 suçu üzerinde ampisiline direnç geni bulunmaktadır. Kimyasal ajanlara karşı cevaplar kıyaslandığında plazmid içeren suçların, plazmid içermeyenlere göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu direnç geni sayesinde bakteri sadece ampisilin içeren ortamda üreyebilmektedir.

ii. *HisG46 mutasyonu*

Salmonella test sistemlerinde kullanılan her test suşları, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar ya DNA'daki tek bir bazın değişmesiyle ortaya çıkan tek baz mutasyonları şeklinde olmakta veya bir bazın eklenmesi yada çıkarılması ile oluşan çerçeve kayması mutasyonları şeklinde olmaktadır.

Salmonella thyphimurium his⁻ (histidin gereksinim) mutant suşların DNA baz dizisi analizleri yapılarak mutasyonların yerleri ve karakterleri belirlenmiştir. *S. thyphimurium*

TA1535/pSK1002 suşunda bulunan His G46 mutasyonu histidin biyosentezindeki ilk enzimi kodlayan his G geni üzerindedir. Bu mutasyon -GAG- geninde, lösin aminoasidinin kodonu olan -CTC- yerine prolin amino asidinin -GGG kodonu olan -CCC- kodonunun gelmesine neden olur. Baz çifti değişimine neden olan bu mutasyon mutajenler tarafından geri döndürülmektedir.

iii. Rfa mutasyonu

Bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelen bu mutasyon ile normalde hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllerin hücre içerisine girişi kolaylaşmıştır.

iv. UvrB mutasyonu

UvrB geni, DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini yerine getirmektedir. Bu genin delesyona uğratılması, kimyasalların mutajenitelerinin ortaya çıkartılmasında duyarlılığın artmasına neden olmuştur. UvrB geninde delesyon oluşturulurken teknik nedenlerden dolayı bu delesyon biyotin (bio) genine kadar uzanmaktadır. Bu nedenle, bakteriler üreyebilmeleri için besi ortamlarına histidinin yanında biyotine (vitamin H) de gereksinim duymaktadır [şenel, 2006].

2.4.2. Ames/ Salmonella/ Mikrosom test yöntemi

İlk kez Prof. Dr. Ames ve çalışma ekibi tarafından 1975 yılında tasarlanan Ames testi, çevre kirlenmesine neden olan mutajenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda ise tıp ve farmakolojide toksik ve mutajenik ajanların belirlenmesinde kullanılmaktadır [Maron ve Ames, 1983; Hamasaki vd., 1992]. Ayrıca, *Umu*-test gibi spektrofotometrik ölçümlere dayalı testlerin temelini oluşturmaktadır.

Bu testin temeli, histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş *Salmonella typhimurium* suşlarının test bileşeni ile muamelesi sonucu ikincil bir mutasyonun oluşup, his - (oksotrof) suşlarının his+ (revertant) hale geçmesidir. Geri dönen revertant suşların belirlenmesi ise koloni sayma metoduna göre belirlenmektedir. Çalışma esnasında, mutlaka kendiliğinden (spontan) geri dönen kolonilerde olacaktır. Bu nedenle mutajenik etkinin belirlenmesinde, revertant kolonilerinin sayısının spontan geri dönenlerden fazla olması dikkate alınmaktadır. Ames testinin uygulanmasında kullanılan çok sayıda *Salmonella* suşları bulunmaktadır. En çok kullanılan bakteri suşları, TA97, TA98, TA100, TA102, TA1538 bunlardan bazılarıdır. Hepsinin prensibi temelde aynıdır. [Forster vd., 1992; Kuramsan vd., 1994; Uenobe vd., 1997].

Çalışmamızda kullandığımız *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının genel özellikleri ise Şöyledir;

i. R faktörü

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. thyphimurium* TA98 ve TA100

suşları üzerinde ampisiline direnç geni (R) bulunmaktadır. Bu direnç geni sayesinde bakteri sadece ampisilin içeren ortamda üreyebilmektedir [Gupta vd., 1996; Nobukawa ve Sanukida, 2002].

ii. Histidin mutasyonu

Salmonella test sistemlerinde kullanılan her test suşları, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar ya DNA'daki tek bir bazın değişmesiyle ortaya çıkan tek baz mutasyonları şeklinde olmakta veya bir bazın eklenmesi yada çıkarılması ile oluşan çerçeve kayması mutasyonları şeklinde olmaktadır.

iii. Rfa mutasyonu

Bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelen mutasyondur. Bu tabakanın kısmen yok olması ile normalde hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllerin hücre içerisine girişi kolaylaşmıştır.

iv. UvrB mutasyonu

DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini yerine getiren genin delesyona uğratılması, kimyasalların mutajenitelerinin ortaya çıkartılmasında duyarlılığın artmasına neden olmuştur. UvrB geninde oluşturulan bu delesyon ile teknik nedenlerden dolayı bu delesyon biyotin (bio) genine kadar uzanmaktadır. Bu nedenle, bakteriler üreyebilmeleri için besi ortamlarına histidinin yanında biyotine (vitamin H) de gereksinim duymaktadır [Maron and Ames, 1983].

2.5. Kısa Zamanlı Ökaryotik Mutajenite Test Sistemleri

Mutajenlerin ve karsinojenlerin belirlenmesinde prokaryotik testler dışında küfler gibi ökaryotik hücreler de kullanılmaktadır. Ökaryotik organizmaların kullanıldığı mutajenite testlerinin temel avantajı, prokaryotik organizmalarda belirlenemeyen birkaç mutajenik etki çeşidinin taranmasını sağlayan hızlı ve basit testler oluşudur. Kimyasalların mutajenik, antimutajenik ve kanserojenik potansiyellerinin belirlenmesinde *Saccharomyces cerevisiae* ve *S. pompe*, küf olarak *Neurospora crassa* ve *A. nidulans* yaygın şekilde kullanılan funguslardır (Çizelge 2.2). Özellikle bu fungusların kullanılmasının nedeni ise, genetik sistemlerinin çok iyi şekilde anlaşılmiş olmasıdır. Bu testlerde belirlenen bazı mutajenik özellikler kromozom ayrılmaması, baz değişimi, çerçeve kayması, gen değişimi şeklinde olabilmektedir.

Fungus testleri bakteriyel testlerle kıyaslandığında fungusların sporlanmaları ve koloni oluşturma süreleri daha uzundur. Bu durum bir dezavantaj oluşturabilmektedir. Ayrıca ökaryotik hücrelerin daha gelişmiş DNA onarım sistemlerine sahip olmaları, mutasyon analizlerinin bakteriyel testlerde kullanılanlardan daha fazla kimyasal ajan kullanmayı gerektirmektedir. Fungus türlerinin kullanıldığı mevcut ökaryotik testler içerisinde *Neurospora*

crassa testinin diğer testlere göre hızlı olması bir avantaj oluşturmaktadır. Bir diğer önemli avantaj, genetik sistemin daha kolay takip edildiği bakteriyel metodlar ile memelilerde bulunan prokaryotiklere kıyasla daha karmaşık olan genetik dizaynın karşılaştırılması ve birleştirilmesidir [şen, 2005].

Çizelge 2.2. Ökaryotik kısa zamanlı mutajenite testleri [şen, 2005]

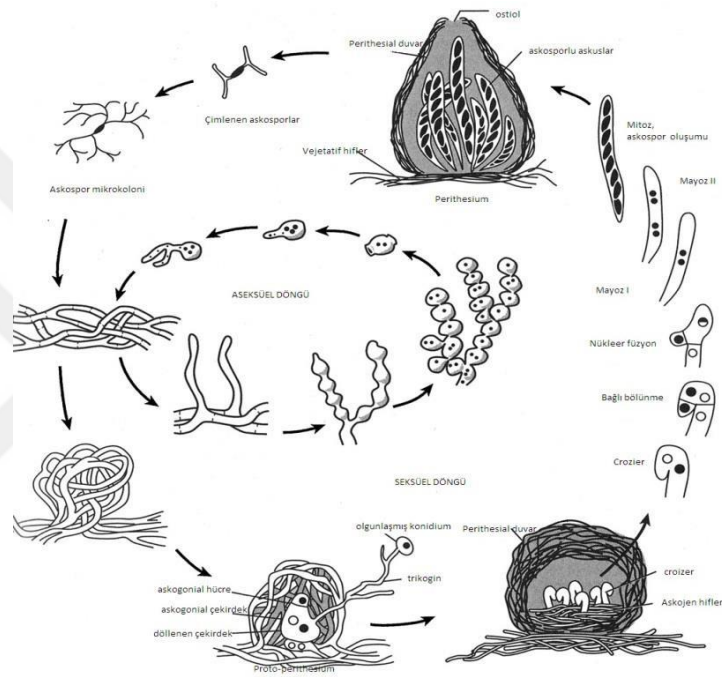
Organizma	Genetik Özellik	Koloninin fenotipik değişimi
MP-1	mutasyonlar	kırmızı koloni/ beyaz, pembe koloni
S221, 138	geri mutasyon	prototrofi
<i>Shizosaccharomyces pompe</i> P1	adenin lokusunda mutasyonlar	kırmızı koloni/ beyaz koloni
<i>Aspergillus nidulans</i> P, P1	mitotik krossing-over	FPA ^S / FPA ^R
<i>Neurospora crassa</i> ad3 suşları	adenin lokusunda mutasyonlar	beyaz koloni/ mor koloni
N23, N24	geri mutasyon	ad ⁻ koloni/ad ⁺ koloni
H59	mutasyonlar	beyaz koloni/ mor koloni
H12	mutasyonlar	beyaz koloni/ mor koloni

2.5.1. *Neurospora crassa* Test Sistemi

Kırmızı ekmek küfü olan *Neurospora crassa*, doğal ortamında, tropik ve subtropik bölgelerde yaşar. Sporları üzerindeki çizgilerin aksonlara benzemesinden dolayı "sinir sporu" anlamına gelen *Neurospora* ismini almıştır. *N. crassa*, laboratuvarında kolay büyütülebildiği ve haploit hayat döngüsü sayesinde genetik analizi kolay yapıldığı için bilimde bir model organizma olarak kullanılmaktadır. *Neurospora* genetiği üzerinde yaptıkları araştırmalarından dolayı Edwart Tatum ve George Wells Beadle Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödüllerini 1958 yılında kazanmışlardır [Durceylan, 2007]. 1800'lü yıllardan beri genetik araştırmalarda kullanılan *N. crassa* suşu, insanlar için herhangi bir alerjik ya da patojenik bir etkisi belirlenmediğinden, akademik çalışmalarda son derece güvenilir olduğu belirtilmiştir [Perkins ve Davis, 2000].

Neurospora crassa, ascomycetes sınıfından, seksüel ve aseksüel hayat döngüsü olan bir filamentöz fungusdur. Yedi kromozoma sahip olan fungusun haploid (n) genomunun %54'lük kısmı guanin+sitozin baz çifti oluşturmaktadır [Davis ve Perkins., 2002]. Fungusun aseksüel yaşam döngüsünde, vejetatif hif, beslenme yetersizliği gibi durumlarda hifin uç kısmında portakal renginde konidialar (aseksüel sporlar) üretir. Olgunlaşan konidialar uygun ortam bulduğunda yeniden gelişmektedirler. şekil 2.2."de *N.crassa*"nın seksüel yaşam döngüsünde hermafroditlik ve heterotallik özellik gösterilmektedir. Heterotallik türlerde, erkek (antheridium) ve dişi (ascogonium) gametler ayrı hiflerde bulunur. Dişi seksüel yapı olarak tanımlanan Protoperithesium, küçük bir hif kümesi ile çevrili, biri dişi olan birkaç büyük

hücreden oluşur. Bu hücreden yeni bir hif, hif kümesinin dışına çıkar (trichogyne) ve erkek gamet (antheridium) görevini üstlenen konidia'ya doğru ilerler. İki farklı gametin birleşmesiyle diploid (2n) nükleuslar oluşur. Ardı ardına gerçekleşen mayoz ve mitoz bölünme ile haploid (n) nükleuslar, 8 askosporlu (seksüel spor) askus oluşturmaktadırlar. Protoperithecium'un gelişmesiyle oluşan ve askusların da içinde bulunduğu bu yapı perithecium adını almakta ve her bir perithecium'un içinde yaklaşık 100-200 ascus bulunmaktadır. Perithecium'un ucunun açılmasıyla askosporlar etrafa yayılmakta uygun ortamda yeniden çimlenerek hif ve miselleri oluşturmaktadır [Şen, 2005].



Şekil 2.2. *Neurospora crassa* yaşam döngüsü [Davis ve Perkins, 2002]

Bu organizma mutasyon analizlerinde organizmanın, adenin-3 (ad-3) lokusunda oluşan gen mutasyonlarının indüksiyonunu ölçmek için kullanılmaktadır. Serres ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan *N. crassa* ad-3 ileri mutasyon testi, kimyasal mutajenite testlerinde ve mutasyon orjinli olduğu düşünülen bazı kanserlerin, mutajenite ile ilişkisinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *N. crassa*'daki teste göre fungusta homokaryonlarda (n) veya heterokaryonlarda (n+n) adenin biyosentetik yolunda sıralı basamakları kodlayan ad-3 lokus kompleksini (ad-3A ve ad-3B) oluşturan iki farklı genden birinde meydana gelen mutasyondur. Oluşan mutasyon fungusta adenin gereksinimi ve hif vakuollerinde beyazdan mora doğru renklenmiş pigment birikimine neden olur. Geri mutasyon çalışmalarında çeşitli kimyasal mutajenlere duyarlı yüzlerce ad-3 mutanti arasında N23 ve N24 suşları kimyasalların özel bir grubu tarafından geri döndürülebilir. N23 suşu, adenin bağımlıdan adenin bağımsız, baz çifti

değişimine neden olan ajanlar tarafından dönüşürülebilir. N24 suşu ise, çerçeve kayması mutasyonuna neden olan mutajenleri belirler. *N. crassa*'da ad-3A mutantları arasında alellik komplementasyon yoktur. Bu nedenle bu suşlar spot, plak ya da süspansiyon testinde kimyasallarla ayrı ayrı uygulanabilir ya da birleştirilerek tek bir suş olarak da kimyasallarla muamele edilebilir. N23 ve N24 suşlarının tek bir suş olarak kullanılmasının, kimyasalların izlenmesi açısından çok kullanışlı olabildiği belirtilmektedir [Şen, 2005; Ong, 1972].

Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda ökaryotik test olarak *Neurospora crassa* fungusu kullanılmıştır.

2.6. Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Çalışmalar

Lamiaceae familyası, otsu ve çalı formunda, gövdesi salgı tüylü, aromatik kokulu ve çoğunlukla dört köşeli bir yapıya sahiptir. Akdeniz havzasına yayılmış olan bu familyanın en karakteristik özelliklerinden birisi 8 hücreli pul şeklinde salgı tüyelerine sahip olmalarıdır. Epiderma üzerindeki bu tüylerde uçucu yağ bulundurulur [Aktaş, 2011]. Bu familyaya ait türlerde yapraklar karşılık çapraz dizilişli ve genellikle basittir. indirgenmiş erkek organa sahip olmalarından dolayı çiçekler genellikle hermafroditlerdir. Bu familyanın karakteristik özelliklerinden biri çiçeklerinin iki dudaklı bir yapıya sahip olmasıdır. Alt dudak ve üst dudak şeklindeki ayırım böceklerin nektar emmesini kolaylaştırmıştır. Ovaryumları üst durumda olup meyvelerinin 4 nutletli olması karakteristik yapısıdır. Ayrıca dört köşeli gövde yapısı yine Lamiaceae için karakteristiktir [Tekeli, 2006].

Lamiaceae familyasına ait bitkilerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. Oldukça çok sayıda antimikrobiyal araştırmalara, bunların yanında giderek sayıları artan mutajenite araştırmalarına da rastlamaktayız. Bozin ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada Lamiaceae familyasına ait *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* ve *Thymus vulgaris* bitki uçucu yağ bileşenlerinin 13 bakteri ve 6 fungus üzerindeki antimikrobiyal etkisine bakılmış ve en yüksek antimikrobiyal etkinin *Origanum vulgare* bitkisinden alınan uçucu yağ bileşenlerinde olduğu belirtilmiştir. Bu uçucu yağlara karşı ise *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* mikroorganizmalarının oldukça dirençli olduğu gözlenmiştir [Bozin vd., 2006]. Lamiaceae familyasına ait *Origanum minutiflorum* uçucu yağ bileşenleri incelenmiş ve antifungal etkisinin antibakteriyel aktivitesinden çok daha kuvvetli olduğu gösterilmiştir [Iarer vd., 1996]. Sarac ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise Lamiaceae familyasına ait bazı türlerin bazı bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmıştır ve *Ballota acetabulosa*, *Ballota nigra* ssp. *foetida*, *Phlomis lycia*, *Phlomis fruticosa*, *P. vulgaris*, *Salvia argentea*, *S. verbenaca*,

S. candidissima, *S. albiflora*, *S. leptoclada*, *Teucrium divaricatum* ssp. *villosum*, *T. polium*, *Marrubium vulgare*, *M. globosum* ssp. *globosum*, *Stachys annua*, *S. cretica* ssp. *smyrnaea*, *Lamium*

moschatum, *Melissa officinalis* ssp. *officinalis*, *Micromeria juliana*, *Ajuga chamaepitys* ve *Clinopodium vulgare* ssp. *vulgare* bitkilerinin etanolik ekstratlarının bazı Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermezken bazı Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu belirlenmiştir [Sarac ve Ugur, 2007].

Lamiaceae familyasına ait olan bir diğer tür *Craniotome furcata*'nın toprak üstü kısımlarının etil asetat ve n-butanol ekstratlarının antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmış ve her iki ekstraktın da bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada *Micrococcus flavus* ve *Escherichia coli* mikroorganizmalarının etil asetat ekstraktına karşı oldukça hassas olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *Klebsiella pneumoniae* mikroorganizması üzerine etil asetat ekstraktının oldukça etkili olduğu gözlenmesine rağmen, n-bütanol ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinin etil asetat ekstrakt yoluyla *Escherichia coli* ve *Staphylococcus faecalis* üzerine olan etkilerine benzer olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada her iki ekstraktın funguslara karşı daha az etkili olduğu belirtilmiştir [Joshi vd., 2010]. Dağcı ve arkadaşlarının, *Punica granatum* L. (*Punicaceae*) "Nar", *Citrus paradisi* Mc. Fad. (*Rutaceae*) "Greyfurt", *Cydonia oblonga* Miller (*Rosaceae*) "Ayva", *Musa sapientum* L. (*Musaceae*) "Muz" meyve suları ile kabuk ekstratlarının antibakterial ve antifungal aktivitelerini karşılaştırdıkları çalışmalarında elde edilen ekstratların antimikrobiyal etkisi disk difüzyon ve oyuk agar metoduna göre *Bacillus megaterium* DSM 32, *Aeromonas hydrophyla* UC 9165, *Corynebacterium xerosis* ATCC 15753, *Escherichia coli* DM, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Enterococcus faecalis* ATCC 7966 bakterileri ve *Kluyveromyces fragilis* DC 98, *Rhodotorula rubra* DC 86, *Saccharomyces cerevisiae* WET 136 mantarları üzerinde test edilmiştir. Çalışmada *P. granatum* aseton, etil alkol ve sulu ekstratlarının test edilen mikroorganizmalar üzerinde 12-34 mm inhibisyon zonu ile en etkili olduğu tespit edilmiş ve diğer bitki ekstratlarının da değişen oranlarda antimikrobiyal etkilerinin olduğu gözlenmiştir [Dağcı ve Dığrak, 2005].

Araştırmacılar Lamiaceae familyasına ait bazı bitkilerin mutajenik aktivitelerine de yönelmişlerdir. Karşılaştırmalı mutajenite çalışmaları son yıllarda hem test yöntemlerinin verimliliğinin kıyaslanmasında hemde bitki etkisinin aydınlatılmasında önem kazanmıştır. Verschaeve ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları çalışmada, Güney Afrikada geleneksel bazı tıbbi bitki ekstratlarının mutajenite ve antimutajenite özelliklerine bakılmıştır. Burada, Ames, *Umu* ve comet testleri kullanılarak bitki ekstratlarının genotoksik ve antigenotoksik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bir Lamiaceae üyesi olan *Chlerodendrum myricoides* bitkisinin yüksek antimutajenite ve Asteraceae ailesinden *Helichrysum simillimum* bitkisinin yüksek genotoksik özelliği belirlenmiştir [Verschaeve ve Staden, 2008].

Bir monoterpen olan linalool ve onun ester yapısından köken almış linalil asetat *Lavandula angustifolia*, *Stachys iberica* subsp. *stenostachya*, *Ocimum basilicum* ve daha birçok

Lamiaceae türlerinde bulunurlar. Bunun yanı sıra *Coriandrum sativum* ve *Laurus nobilis*"de de vardır. β -caryophyllene ise *Salvia* türleri, *Lamium angustifolia*, *Piper nigrum* ve daha bir çok bitkide varlığı belirlenmiş seskiterpenler grubuna giren bir terpendir. Sotto ve arkadaşlarının bu üç terpenle yapmış oldukları çalışmada linalool, linalil acetat ve β -caryophyllene terpenlerin mutajenik ve antimutajenik aktivitelerine *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA100 sunları ve *Escherichia coli* WP2uvrA suçları üzerinde bakılmıştır. Linalool ve β -caryophyllene mutajenik aktivite göstermemişler ise de linalil acetat hem S9"lu hemde S9"suz ortamda *E.coli* WP2uvrA suçunun geri dönen kolonileri üzerinde önemli derecede mutajenik etki göstermiştir. Linalol, 2-nitrofluorene (2NF), sodium azide (SA), methyl methane sulfonate (MMS) ve 2-aminoanthracene (2AA) maddelerine karşı eksik antimutajenite aktivitesi gösterirken, β -caryophyllene, 2NF maddesine karşı oldukça güçlü antimutajenik özellik göstermiş ve geri dönen koloni sayısı %83.9 oranında artmıştır [Sotto vd., 2008].

Yapılan bir diğer çalışmada, linalool, linalil acetat ve β -caryophyllene gibi Lamiaceae familyasında da bulunan terpenlerin *Salmonella typhimurium* üzerine mutajen/antimutajen etkileri Ames testi ile araştırılmıştır [Sotto vd., 2008]. Bu çalışmada linalool terpeni *Salmonella typhimurium* suşlarına hiçbir mutajenik ya da antimutajenik etki göstermezken, linalil acetat *Salmonella typhimurium* WP2uvrA suşu üzerinde mutajen, β -caryophyllen ise *Salmonella typhimurium* 2NF, 2AA, MMS suçları üzerinde antimutajen etki göstermiştir [Sotto vd., 2008]. Martino ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırma, Lamiaceae familyasının *Origanum* ve *Thymus* türlerinin uçucu yağ bileşenlerinin antifungal ve antibakteriyel aktiviteye sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır. Aynı çalışmada bu iki bitkinin *Salmonella typhimurium* üzerinde bir mutasyon etkisi gözlenmediği ve bu uçucu yağların gıda koruyucusu olarak güvenle kullanılabileceği de gösterilmiştir [Martino vd., 2009].

Lamiaceae familyasına ait *Salvia officinalis* bitkisinin uçucu yağının antimutajenik aktiviteye sahip olduğu bakteriyel mutajenite testleri ile hem *E. coli* bakterisinde hem de ökaryotik bir mikroorganizma olan *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde gösterilmiştir [Vukovic, 2006]. Stephane ve arkadaşları, içerisinde Lamiaceae familyasına ait bitki ekstraktlarının ve gıda katkı maddelerinin bulunduğu doğal ajanlarla yaptığı Umu- test çalışmaları sonucunda, bitki ekstraktlarının diğer ajanlara göre daha fazla antimutajenik özelliğe sahip olduklarını belirtmişlerdir [Caillet vd., 2011].

2.6.1. Stachys Türleri ile ilgili Yapılan Çalışmalar

Stachys, Lamiaceae familyasının en geniş cinslerinden biri olup, dünyada yaklaşık olarak 200-300 türe sahiptir. Dağ çayı ismiyle tanınan *Stachys* türlerinin antibakteriyel [Chiba vd., 2007; Award Ali vd., 2010; Saeedi vd., 2008] ve antifungal [Skaltsa vd., 2003; Duarte vd., 2005]

aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [Petrovic vd., 2006; Grujic-Jovanovic vd., 2004; Piozzi ve Bruno, 2009]. Bazı türlerinin halk arasında antibakteriyel, antidiyareik, antiplazmodik, yara iyileştirici ve ağrı kesici olarak kullanıldığı bilinmektedir [Kukic vd., 2006; Khanavi, 2012; Laggoune vd., 2011]. *Stachys* türlerinin antikanser [Amirghofran vd., 2006], antioksidan [Aydin, 2006; Matkowski ve Piotrowska, 2006], antinefritik [Hayashi vd., 1994] etkileri de bilinmektedir.

Stachys officinalis, *S. recta*, *S. sylvatica*, *S. palustris* gibi türleri iltihaplı hastalıkların tedavisinde, romatizmal tedavilerde kullanılmakla birlikte, halk arasında antibakteriyel, idrar söktürücü, spazm önleyici özelliğinden yararlanılmakta ve hatta tümör hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır [Haznagy-radnai vd., 2008].

Stachys chrysantha ve *S. candida* flavonoidlerinin yüksek antiinflammatör etkisi belirlenmiştir [Skaltsa vd., 1999]. *Stachys* uçucu yağlarının sitotoksik aktiviteleri ile ilgili bir çok çalışma mevcuttur. *Stachys cretica* ssp. *lesbiaca* ve *S. cretica* ssp. *trapezuntica* uçucu yağlarının HL-60 tümör hücre hatları üzerine [Serbetci vd., 2010], *S. recta* ve *S. palustris* ekstraktlarının HeLa hücrelerini inhibe ettikleri ve *S. rectum* ekstraktının MCF7 üzerine etkili oldukları yapılan çalışmalar arasındadır [Haznagy-radnai vd., 2008]. Ayrıca, *Stachys laxa*, *S. turcomanica*, *S. subaphylla* ve *S. trinervis* ekstraktlarının (HT-29), (Caco-2), (T47D) ve (NIH 3T3) karsinoma hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi bilinmektedir [Khanavi vd., 2012].

Bir monoterpen olan linalool ve onun ester yapısından köken almış linalyl acetate bakımından zengin *Stachys iberica* subsp. *stenostachya* bitkisinde, mutajenik ve antimutajenik aktivite açısından etkisi *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları ve *Escherichia coli* WP2uvrA suşları üzerinde incelenmiştir. Araştırmada linaloolün mutajenik olmadığı, linalyl acetate bileşeninin ise mutajenik olduğu belirlenmiştir [Sotto vd., 2008].



Şekil 2.3. *Stachys rupestris* Montbret et. Aucher

Stachys türlerinin mutajenite çalışmaları ile ilgili çalışmalar çok sınırlı sayıdadır. Ayrıca, *S. rupestris* (Şekil 2.3) endemik bitkisinin mutajenitesi hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

2.6.2. *Salvia* Türleri ile ilgili Yapılan Çalışmalar

Lamiaceae familyasının *Salvia* cinsi (sage), dünya çapında 900 türle temsil edilen ve farmakolojik önemi oldukça fazla olan bir bitkidir. Adaçayı ismiyle tanınan çoğu *Salvia* türü halk arasında, ateşlenme, romatizma, cinsel yetersizlik, enfeksiyonal hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. *S. officinalis*, *S. viridis* ve *S. multicaulis*'in antioksidan özelliği [Erdemoğlu vd., 2006], *Salvia stenophylla*,

S. repens, *S. runcinatus* türlerinin ise yüksek antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri bilinmektedir [Kamatou vd., 2005]. Halk arasında kullanılan *Salvia radula*, *S. africana-caerulea*, *S. africana-lutea*, *S. albicaulis*, *S. chamelaeagnea*, *S. disermas*, *S. dolomitica*, *S. garipensis*, *S. lanceolata*, *S. mui*, *S. namaensis*, *S. repens*, *S. runcinata*, *S. schlechteri*, *S. stenophylla*, *S. verbenaca* bitki ekstraktlarının antimalarial ve antikanser etkileri doğrulanmıştır [Kamatou, 2006].

Salvia miltiorrhiza'dan ekstrakte edilen tanshinone ve *Salvia sclarea* uçucu yağının sırasıyla P388 lenfositik ve NALM-6 hücre hatlarına sitotoksik etkileri belirlenmiştir [Mosaddik, 2003; Kuzma vd., 2009]. Akin ve arkadaşları, *Salvia heldreichiana* uçucu yağının *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa* mikroorganizmalarına karşı etkili olduklarını belirlemiştir [Akin vd., 2010].



Şekil 2.4. *Salvia heldreichiana* Boiss. ex Benth.

Farklı bir çalışmada, β -caryophyllene bakımından zengin *Salvia angustifolia* bitkisinin mutajenik ve antimutajenik aktivitelerine *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları ve *Escherichia coli* WP2uvrA suşları ile bakılmıştır. Çalışmada β -caryophyllene bileşeninin mutajenik aktivite göstermediğini belirlemişlerdir [Sotto vd., 2008]. *Salvia officinalis* bitkisinin uçucu yağının antimutajenik aktiviteye sahip olduğu ise, bakteriyel mutajenite testleri ile hem *E. coli* bakterisinde hem de ökaryotik bir mikroorganizma olan *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde gösterilmiştir [Vukovic-Gacic, 2006].

Akdeniz bölgesine özgü endemik bir tür [Ulubelen vd., 1995] olan *Salvia heldreichiana* (Şekil 2.4) mutajenitesi hakkında henüz bilgi sahibi olunmamış bir bitkidir.

2.6.3. *Ballota* Türleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Lamiaceae familyasının Akdeniz ve Avrasya bölgesine yayılmış olan *Ballota* cinsi 35 türle temsil edilen ve 14 alt türü bulunan çok yıllık otsu bir bitkidir. *Ballota acetabulosa*, *B. africana*, *B. andreuzziana*, *B. aucheri*, *B. hirsuta*, *B. hispanica*, *B. lanata*, *B. nigra*, *B. pseudodictamnus*, *B. rupestris*, *B. saxatilis*, *B. glandulosissima*, *B. inaeauidens* türlerinin biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan az sayıda çalışma mevcuttur. Ülkemizde Şalba, çalba, balotu, ballık otu, nemnem otu, ısırgan, gezgezotu, köpek otu, karayerpirasası, elkurtaran, pat pat otu, leylim kara ve somruk gibi farklı yerel isimlerle tanınan *Ballota* cinsine ait birçok tür, halk arasında (öksürük) tusif, astımda, migren tedavisinde; tıpta ise, antiülser, antispazmodik, diüretik, koleretik, antihemoroidal ve yatıştırıcı ilaçların yapımından kullanılmaktadır [Yılmaz ve Citoğlu, 2003].

Birçok *Ballota* türünün içeriği araştırılmış ve diterpen, fenilpropanoid, flavonoid ve

uçucu yağ bileşenleri tanımlanmıştır. *Ballota* türlerinin biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülen diterpenlerle ilgili de birçok çalışma vardır. Özellikle etil asetatlı ve asetonlu ekstraksiyon kullanarak bazı bileşenler belirlenmiştir. Bunlardan bazıları şöyledir; *B. nigra* subsp. *foetida*'nın yapraklarının etil asetatlı ekstresinde ballotinon ve ballotenol diterpeni, *B. nigra* subsp. *foetida*'nın toprak üstü kısımlarının asetonlu ekstresinden preleosibirin, *B. rupestris*'ten ballonigrin, ballonigrinon, rupestralik asit diterpenleri izole edilmiştir. Ayrıca, *B. hispanicave* *B. andreuziana*'nın asetonlu ekstresinden ise hispanolon, hispanonik asit ve hispaninik asit bileşikler tespit edilen diğer diterpenlerdir. Bir başka çalışmada ise *B. africana* incelenmiş ve bu bitkinin aseton ekstraksiyonunun dahispanolon ve dehidrohispanolon elde edilmiştir. Bu bitkinin yanı sıra, *B. aucheri*'dan persianon, *B. lanata*'dan elde edilen 13-hidroksi ballonigrinolit ise tespit edilen diterpenlerdir [Yılmaz ve Citoğlu, 2003].

Ballota nigra türünden izole edilen fenilpropanonoidlerin ve *B. pseudodictamnus* uçucu yağının antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir [Didry vd., 1999; Couladis vd., 2002]. Ayrıca *B. undulata* etanol ekstraktının hipolipidemik aktivitesi yapılan çalışmalar arasındadır [Qazan, 2008].



Şekil 2.5. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* Boiss. P. H. Davis & Doroszenko.

Ballota saxatilis, *B. damascena*, *B. kaiseri*, *B. pseudodictamnus* ve *B. undulata* bitkileri ile ilgili olarak detaylı anatomik ve palinolojik araştırmalar vardır [Osman, 2012]. Aralarında,

Ballota saxatilis subsp. *Brachyodonta* (Şekil 2.5) ve *Ballota saxatilis* subsp. *saxatilis* endemik türünün de bulunduğu *Ballota antalyense*, *Ballota macrodonta*, *Ballota glandulosissima*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus*, *Ballota nigra* subsp. *anatolica*, *Ballota rotundifolia* türlerinin antioksidant özelliği Citoğlu ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır [Citoğlu vd., 2004].

Ancak, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* endemik türünün bu antioksidant çalışması dışında antimikrobiyal ve mutajenite özellikleriyle ilgili herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

Araştırma konusu olarak seçilen *Stachys rupestris*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* ve *Salvia heldreichiana* Mersin'de 50-1100 m'lerde yaşayan endemik bitkiler olup, daha önce içerik araştırması ve biyolojik aktivite araştırması yapılmadığı için araştırmamıza konu edilen türlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Uçucu Yağ Eldesi ve GCMS Analizleri

Daha önceden yapılan literatür taramasında bölgemize ait olan endemik türler araştırılmış ve arazi çalışması yapılan bölgelerden üç farklı endemik tür toplanmıştır. *Stachys rupestris* Montbret Et Aucher, (Uzunkaş köyü), *Salvia heldreichiana* Boiss. Ex Benth, (Akarca köyü) ve *Ballota saxatilis* subsp. *Brachyodonta* Boiss. P. H. Davis & Doroszenko'dir. ilk iki türün teşhisleri Prof. Dr. Ayşe Everest tarafından yapılmış ve son tür ise, Bilim uzmanı Ersin Öztürk ve Yüksek lisans öğrencisi Hikmet Çelik tarafından yapıldıktan sonra Prof. Dr. Ayşe Everest tarafından doğrulanmıştır [Davis vd., 1988].

Toplanan bitkilerin toprak üstü kısımları soğuk oda koşullarında -4°C ve güneş almayan herbaryumda kurutulmuştur. Ön çalışmalarımızda öğütülen bitkilerde uçucu yağ verimi daha yüksek olduğu gözlenmekle birlikte bitkilerin uçucu yağ verimlilikleri yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.1.1. Kullanılan Cihazlar Santrifüj Clevenger Cihazı

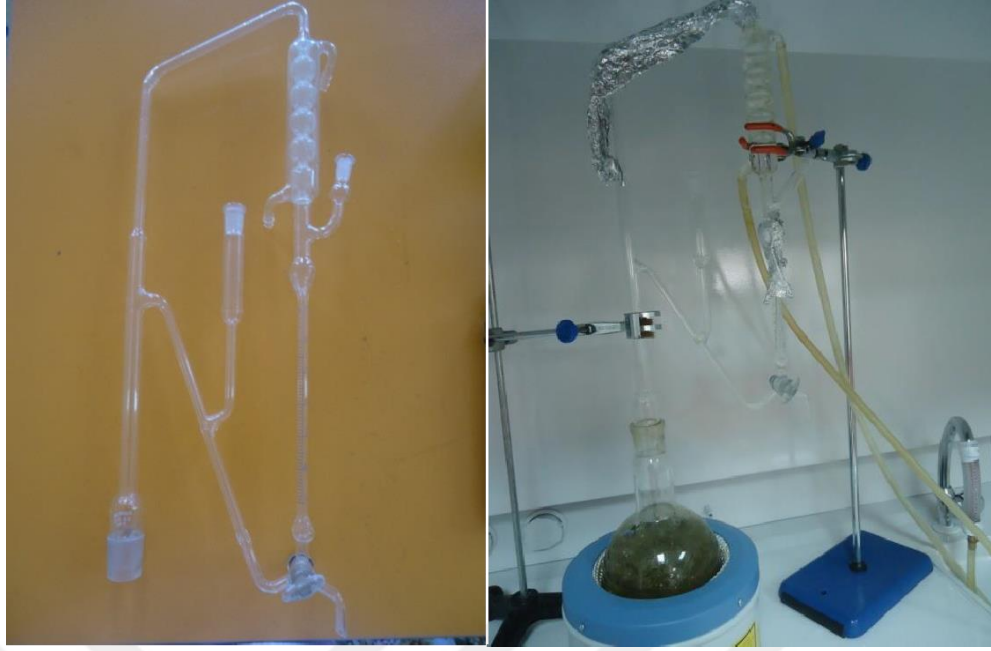
GCMS (Agilent marka7890A GC 5975C MSD cihazı)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar n-C₆H₁₂ (n-Hekzan)

MgSO₄ Magnezyum sülfat

Her bir bitki örneğinin uçucu yağ bileşenleri hidrodestilasyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Çalışmada kullanılan hidrodestilasyon (clevenger) cihazı (Şekil 3.1) uçucu yağ eldesinde kullanılan klasik bir yöntemdir.

Bitkilerden uçucu yağ eldesi için, 1000 ml'lik cam balon içerisinde her bir bitkiden 50'şer gram, kuru bitki ağırlığının 2 katı kadar da saf su koyularak clevenger sistemine yerleştirilmiştir. Uçucu yağların elde edilmesi, 1000 ml'lik cam balon içerisinde 3,5 saatlik kaynatma işlemi ile yapılmıştır. Her bitki için bu işlem 3 paralel olarak tekrarlanmıştır. Kapiller borudan geçen uçucu yağ tüplerde toplanmıştır. Bu tüpler MgSO₄ ile 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek suyun çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra pipetle üst fazdan alınan yağlar, darası alınan viallere aktarılmıştır. Uçucu yağların kütle/ml olarak yüzde verimleri hesaplanmıştır. Daha sonra elde edilen ekstraktlar uygun çözücüler ile GC-MS'de analiz edilmiştir.



Şekil 3.1. Clavenger aparatı (a) ve (b) bitkiden yağ eldesi.

GC-MS analizleri, Agilent marka 7890A GC 5975C MSD cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ayırma HP-5MS kolonu ($30m \times 250\mu m \times 0,25\mu m$) ile gerçekleştirilmiştir. İyonizasyon tekniği olarak EI (Elektron iyonizasyonu) kullanılmıştır. Analizlerde taşıyıcı gaz olarak 1mL/dakika akış hızındaki helyum kullanılmıştır. Fırın sıcaklık programı çerçevesinde 40°C den başlayıp, 5 dk bu sıcaklıkta bekletilen ve 2°C/dakika artışlarla 270°C'ye çıkarılan ve bu sıcaklıkta da 20 dk bekletilen her bir örneğe ilişkin 2mL, enjeksiyon hacmi 1µL ve iyonlaşma voltajı ise 70eV'dır. Ayrılmış bileşenler NIST 05a (National Institute of Standards and Technology) ve Wiley kütüphanesindeki veriler ile kıyaslanarak yapılmıştır [Adam, 2007].

3.2. Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Tayini

Antimikrobiyal aktivite, *in vitro* makrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (National Committee for Clinical Laboratory, 1993). Numuneler ve standartlar DMSO (dimetil sülfoksit) kullanılarak çözdürülmüştür ve stok çözeltiler hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite tespit için seçilen mikroorganizmalar *Escherichia coli* (ATCC 25293), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Candida albicans* (klinik suş), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)'dir. Mikroorganizmalar, Refik Saydam Hıfzı Sıhha Merkezi ve Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Laboratuvarları Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Ampisilin ve flukanazol antibiyotikleri pozitif referans standartları olarak kullanılmıştır.

Bu standartlar %99,9 DMSO'da çözündürüldükten sonra serinin ilk tüpünde 1000 µg/ml olacak şekilde tüplere ilave edilmiştir. Sulandırma dilüsyonu yaparak 0.48 µg/ml konsantrasyona kadar örnek hazırlanmıştır.

Bitkilerin uçucu yağlarının %25 DMSO içerisinde en iyi çözünme sağladığı gözlenmiş ve çalışmalara uçucu yağlar 2 µg/ml konsantrasyonda %25 DMSO'da çözülerek dilüsyon basamakları hazırlanmıştır. Sonuçlar görülebilir bulanıklığa göre tayin edilmiştir (şekil 3.2). Sonrasında uçucu yağların MİK (Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon) değerleri bulanıklığın çok az olduğu ve üremenin olmadığı ilk tüpteki konsantrasyon µg/ml cinsinden belirlenmiştir [Yüksek, 2010].



Şekil 3.2. Görülebilir Bulanıklık Tayini. Mikroorganizmaların üremelerine bağlı olarak oluşan bulanıklık (sağdaki) ve negatif kontrol (soldaki) tüpler kıyaslanarak yorumlanmıştır.

3.2.1. Test için Gerekli Araç ve Gereçler

- Etüv (Memmert)
- Pastör Fırını(Memmert)
- Otoklav (Nüve- OT 020)
- Hassas Terazisi (Scaltec)
- Distile su cihazı (Nüve NS 108)
- Öze
- Petri kapları
- Pipet ucu
- Balon joje
- Ependorf tüpler
- Deney tüpleri

3.2.2. Antimikrobiyal Analizler için Kullanılan Besiyerleri

Mueller Hinton Broth (pH 7,4 +/- 0.2 37 °C) Katı sığır infüzyonu 2,0 g/L
Nişasta 1,5 g/L Kazein hidrolizati 17,5 g/L

In vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde klinik olarak önemli patojenlerin, antibiyotik ve MİK değerlerini belirlemek için kullanılan sıvı besiyeridir.

Dehidre besiyeri 23,0 g/L olacak şekilde amaca uygun kaplara (balon, erlen vb.) eklenip, 1 litre damıtık su içinde çözündürülmüştür. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak, sarımsı renktedir ve 37°C'de pH'sı 7,4±0,2'dir. Soğuduktan sonra buzdolabında + 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Tryptic Soy Broth

Kazein peptonu 17,0 g/L; Soya peptonu 3,0 g/L; D(+) Glukoz 2,5 g/L; NaCl 5,0 g/L;
K₂HPO₄ 2,5 g/L.

In vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde genel sıvı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Dehidre besiyeri, 30,0 g/L olacak şekilde amaca uygun kaplara (balon, erlen vb.) eklenip, 1 litre damıtık su içinde çözündürülmüştür. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı renkte olup, 25°C'de pH'sı 7,3±0,2'dir. Soğuduktan sonra buzdolabında + 4°C'de muhafaza edilmiştir [Yüksek, 2010].

3.2.3. Deney Prosedürünün Uygulanması

Bakteri inokülumu için Triptik Soy Broth, funguslar için ise Sabouraud Dextrose Broth besiyerleri kullanılmıştır. Bu aşamada, bir günlük inkübasyondan sonra kültürler nutrient agar plaklarına ekilmiş ve 12 saatlik inkübasyondan sonra bu kültürlerden 0,5 McFarland (1,5x10⁸ CFU/ml) bulanıklık standardına göre mikroorganizma süspansiyonları hazırlanmıştır [McFarland, 1987].

MİK değerinin saptanmasında, bakteriler için Müller Hinton Broth, mayalar için Tryptic Soy Broth besiyerleri kullanılmıştır. Bitkilerin uçucu yağlarının %25 DMSO (dimethyl sulfoxide) içerisinde en iyi çözünme sağladığı gözlenmiş 0,098 µg/ml ile 50 µg/ml arasında konsantrasyonlar hazırlanmıştır. 500 µl Mueller-Hinton Broth besiyerinin bulunduğu tüplere en yüksek konsantrasyondan başlayarak 500 µl uçucu yağ konsantrasyonları ilave edilmiştir. Çift katlı dilüsyon yapılarak, seyreltme işlemi yapılmıştır. Her tüpe 10 µl mikroorganizma inokulumundan sonra, tüpler 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar görünebilir bulanıklığa göre tayin edilmiştir. Antimikrobiyal testler en az üç kez tekrar edilmiştir [Yüksek, 2010].

3.3. Umu- MUTAJENİTE Testi

3.3.1. Test için Gerekli Araç ve Gereçler

- Derin dondurucu (ESCO UUS-668A-1)
- Spektrofotometre (MULTISKANGO 1510)
- Hassas Terazî (TP-214 DENVER)
- İnkübatör (BINDER BD115)
- Distile su cihazı (MILLIPORE QGARDOORI)
- Çeker ocak (NURGAZ)
- Karıştırma ısıtıcı (IKARCT basic-RCT-B)
- Vorteks (VELP F20220176)
- Otomatik pipet (EPPENDORF)
- Mikroskop (OLYMPUS BX53)
- Ph Metre (METTLER TOLEDO- AG8603)
- Pastör Fırını (ELEKTROMAG-3025)
- Pipetler
- Öze
- Bunzen beki
- Pipet uçları

3.3.2. Umu-testi için Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Vogel-Bonner-E ortamı (50x VB tuzları) Magnezyum sülfat 10 g Sitrik asit Monohidrat

100 g Potasyum fosfat 500 g Sodyum

Amonyum fosfat 175 g Distile su 670 ml

Minimal Agar için hazırlanmıştır.

0,5 mM histidin/biyotin çözeltisi

D-Biyotin (M.A : 247,3) 30,9 mg L-Histidin-HCL (M.A: 191,7) 24 mg Distile su 250 ml

Histidin/biyotin gerektiren besiyerleri için hazırlanmıştır.

Ampisilin çözeltisi (8 mg/ml)

Ampisilin trihidrat 0,8 g Sodyum Hidroksit (0,02 N) 100 ml

Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolü için kullanılmıştır.

Kristal viyole çözeltisi (%0,1lik)

Kristal viyole	0,1 g
Distile su	100 ml

Rfa mutasyonunun kontrolünde kullanılmıştır.

Minimal Glukoz Agarlı ortam (MGA)

Agar	15 g
50x VB tuz çözeltisi	20 ml
Glukoz (%20 'lik)	100 ml
Distile su	880 ml

Histidin / Biyotin / ampisilin katı ortam

Agar	15 g
50x VB tuzları	20 ml
%20' lik glukoz	100 ml
Histidin HCL H ₂ O (%0,5)	10 ml
0,5 mM biyotin	6 ml
Ampisilin çözeltisi	3,15 ml
Distile su	860 ml

R faktörü taşıyan suşların dirençliliklerinin kontrolünde kullanılmıştır.

Nutrient broth

Oxoid nutrient broth No: 2	25 g	Distile su	1000 ml
----------------------------	------	------------	---------

Bakterileri üretmek amacıyla kullanılmıştır.

Nutrient Agarlı Ortam

Oxoid broth No:2	25 g		
Difco Bacto agar	15 g	Distile su	1000 ml

Test suşlarının kristal viyole ve UV'ye duyarlılık özelliklerinin test edilmesi ve sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

TGA Kültür Ortamı

Bacto tryptone	%1
NaCl	% 0.5
Glukoz	% 0.2

Test suşlarının ekimi öncesi ve liyofilizden çözmek için hazırlanmıştır.

3.3.3. Bakteri Suçunun Deney için Hazırlanması

Salmonella thyphimurium TA1535/pSK1002 suşu, *Umu*-test kiti içinde yatık agara ekilmiş halde DSMZ'den (Leibniz-Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) satın alınmıştır. Bakteri suçu, çalışmaya başlamadan saklama şartı olan - 20°C' den 6 saat önce çıkartılmıştır. Önceden hazırlanan 2 ml TGA besi ortamına bir miktar ekilmiş ve kültür 3 saat 37°C' de bekletilmiştir. Daha sonra bakteri kültüründen 100 µl alınmış ve 10 ml Nutrient Broth'a ekim yapılmıştır. Ardından 18 saat 37°C' de bırakılmış ve bekletme sonrasında bakterinin absorbansı 0,06'ya (OD₆₀₀) ayarlanmıştır. Stok bakteri hazırlamak için ise 2 ml TGA kültür ortamı içerisine 100 µl ekilerek 37°C' de 3 saat bekletilen ve DMSO (10%) eklenen örnek - 20°C'lik derin dondurucuya bırakılmıştır.

Absorbansı 0,06'ya (OD₆₀₀) ayarlanan *Salmonella thyphimurium* TA1535/pSK1002 suşunun 1 gecelik kültüründen alınan örnekler kullanılarak üzerinde bulunan genetik özelliklerinin doğruluğu kontrol edilmiştir [Yamamoto vd., 2002].

3.3.4. Test Sisteminde Kullanılacak Suşun Genetik Özelliklerinin Kontrolü

3.3.4.1. Histidin Gereksinimi

Umu-test suşu sahip olduğu *uvrB* delesyonu nedeniyle histidin his(-) sentezleyememektedir. His(-) sentezleyememe özelliği, suşların MGA (minimal glukoz agar) plaklarına ekimiyle kontrol edilmiştir. Aynı zamanda bu delesyon biyotin sentez genlerinde de bir tahribata neden olduğundan besiyerine dışarıdan ilave biyotin eklenmektedir. Suşlar, histidin/biyotin içeren ve sadece biyotin içeren histidinsiz MGA plaklara ekilmiştir. Suşların histidin varlığında üreyip, histidin yokluğunda üreyememeleri, his- karakterini doğrulamaktadır (Maron ve Ames, 1983). MGA plaklarına ekimi yapılan bakteriler *uvrB* delesyonu nedeniyle histidin/biyotin içeren plaklarda üredi. Sadece biyotin içeren fakat histidin içermeyen plaklarda ürememiştir.

3.3.4.2. R faktörünün kontrolü

Umu-test suşunun his(-) karakteri doğrulandıktan sonra, ampisilin direnç geni (R) taşıyıp taşımadığı kontrol edilmiştir. Bu işlem için histidin / biyotin / ampisilin içeren glukoz agarlı plaklar hazırlanmıştır. R faktörü test edilecek suçların ekimi yapılmıştır [Mc Cann vd., 1975]. Histidin/biyotin/ampisilin içeren plaklara ekimi yapılan bakterinin ürediği gözlenmiştir.

3.3.4.3. Rfa mutasyonunun kontrolü

Umu-test suçunda oluşturulan rfa mutasyonu, hücre duvarındaki lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur. Test suçlarının gecelik kültürlerinden alınan 0,1 ml'lik örneklerin, Nutrient agarlı plaklara ekimi yapılmıştır. Filtre kağıdından hazırlanmış disklerle 10 µl kristal viole çözeltisi (1 mg/ml) emdirilmiş ve plakların ortasına yerleştirilmiştir. Plaklar 12 saat 37°C'de bırakıldıktan sonra diskin etrafında oluşan şeffaf bölge büyük bir molekül olan kristal violenin bakteri içerisine girmesine izin veren rfa mutasyonu varlığını ispat etmiştir [Ames,1973].

3.3.4.4. UvrB mutasyonunun kontrolü

Umu-test suçunda bulunan *uvrB* mutasyonunun varlığı ultraviyole ışınlarla duyarlılık testi ile kontrol edilmiştir. Gecelik kültürden alınan örnekler Nutrient agarlı besiyerine ekilmiştir. 37°C'de 12 saat bekledikten sonra üreyen tek koloniler, yeniden Nutrient agarlı besiyerine çizgi ekim yapılarak ekilmiştir. Bir tane de kontrol grubu hazırlanmıştır. Deney yaptığımız plak 15 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 saniye ışınlanmıştır. 12 saat 37°C'de beklemeye bırakılmıştır. *UvrB* delesyonu taşıyan suçların kontrol plakda üremesi, UV ile ışınlanmış plaklarda ürememesi, *uvrB* mutasyonunun varlığını ispat etmiştir [Ames, 1973].

3.3.4.5. SOS kromotest için *umuC*==*lacZ* bileşik geninin aktifliğinin kontrolü

Bir gecelik bakteri kültüründen 0,1 ml alınarak, içerisinde MGA bulunan petriye homojen şekilde yayılmıştır. Petrinin ortasına 10 µl ONPG (10 mg/ml) nokta şeklinde damlatılmıştır. 37°C' de bir günlük inkübasyon sonunda şeffaf bölge çevresinde mavi bir halka gözlemlenmiştir. Bu halkanın varlığı *umuC*==*lacZ* bileşik geninin aktifliğini göstermiştir [Oda vd., 1985].

3.3.5. Örneklerin Sitotoksitelerinin Araştırılması

Genotoksiteleri araştırılacak olan örneklerin farklı konsantrasyonlarından 10 µl alınarak kuyucuklara aktarılmıştır. Absorbansı 0,06' ya (OD_{600}) ayarlanan bakteri kültüründen 100 µl eklenmiştir. 2 saat 37°C' de bekletilmiştir. Bekleme sonrası 100 µl ONPG ilave edilmiş ve tekrar 37°C' de 1 saat beklemeye bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için 100 µl DMSO eklenerek 620 nm' de absorbans ölçülmüş ve negatif kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır [Yamamoto vd., 2002]. Sitotoksik olmayan en yüksek konsantrasyon olarak her bitki için ayrı ayrı belirlenmiştir.

3.3.6. Deneysel Prosedürünün Hazırlanması

Salmonella thyphimurium TA1535/pSK1002 susunun gecelik kültüründen alınan 2 ml'lik örneğin absorbansına bakılmıştır. Absorbans 0,06'ya (OD_{600}) ayarlanmıştır [Yamamoto vd., 2002]. Bitki ekstraktlarının metabolik aktivite sonrası S9 (+) mutajeniteye sahip olup olmadıklarını belirlemek için pozitif kontrol olarak 2-Aminoantrasen kullanılmıştır. Çalışma yapmadan önce 3 ml bakteri kültürü ile 0,3 ml sulandırılmış S9 karıştırılmıştır. Bitki ekstraktlarının metabolik aktivite olmadan yapılan S9 (-) çalışmasında pozitif kontrol olarak furilfuramid kullanılmıştır [Yamamoto vd., 2002].

Pozitif kontroller için 2-Aminoantrasen (2AA) ve Furilfuramid (AF-2) kullanılmıştır. Bu maddeler kit içerisinde 1'er ml'lik hacimde; 2-Aminoantrasen 300 µg/ml, Furilfuramid ise 9 µg/ml miktarlarda bulunmaktadır. Pozitif kontroller dilüsyon yöntemi ile DMSO kullanılarak seyreltilmiştir. 2-aminoantrasenin 10, 1, 0.1 µg/ml çözeltileri hazırlanmıştır. Furilfuramidin ise 100, 10, 1 ng/ml çözeltileri hazırlanmıştır. 2-Aminoantrasen, metabolik aktivitenin belirlenmesinde pozitif kontrol olarak Furilfuramid ise metabolik olmayan aktivitede pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol için ise, distile su içerisine %10'luk DMSO ilave edilerek kullanılmıştır [Yamamoto vd., 2002].

Bitki uçucu yağları 1mg/ml oranında %10'luk DMSO'da çözülmüştür. Daha sonra çift katlı seri dilüsyonları yapılmıştır. Böylece farklı konsantrasyonlarda 6 örnek hazırlanmıştır.

S-9 rat karaciğer enzimleri fraksiyonu hazır olarak temin edilmiştir (Sigma, 1254, Aroclor, US.).

3.3.7. Deneysel Prosedürünün Uygulanması

Daha önceden genetik özellikleri kontrol edilen bakteri kültüründen alınan örnek, 1 gecelik üremeye bırakılmıştır. Bakteri süşunun absorbansı 0,06 (OD_{600}) ayarlanmıştır. 3 ml hacimde iki farklı tüp içerisinde S-9 fraksiyonlu ve sade şekilde bakteri alınmıştır. Bu bakteriler *Umu*-testte kullanılan bakterilerdir. *Umu*-test için 96 kuyulu, steril tek kullanımlık kuyucuk tabağı alınmıştır. Kuyuların A1-A3 arası S-9 fraksiyonu için metabolik aktivitede bir bitki ekstraktının mutajenitesini, A4-A6 arası metabolik aktivite olmayan ortamda mutajeniteyi belirlemek için belirlenmiştir. Diğer kuyucuklara ise pozitif ve negatif kontroller için yer belirlemesi yapılmıştır. Belirlenen kuyucuklara önce 10 µl bitki ekstraktından, pozitif ve negatif kontrollerden aktarılmıştır. Her kuyucuğa absorbansı 0,06 (OD_{600}) ayarlanan bakteriden 100 µl eklenmiştir. Bakteri eklenen bitki ekstraktları 37°C'de 2 saat bekletilmiş ve bekleme sonrası çıkartılan bakteri-test karışımı üzerine, 100 µl O- Nitrophenil-D-galactopyranoside substratı ilave edilmiştir. 37°C'de 1 saat işlem tekrar edilmiştir. İkinci beklemeden sonra ise her bir

kuyucuğa 100 µl DMSO ilave edilerek enzimatik reaksiyonun durdurulması sağlanmış ve absorbans ölçümü ise 620 nm' de yapılmıştır. [Yamamoto vd., 2002; şenel, 2006].

3.3.8. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçların değerlendirilmesi için test maddelerinin uygulandığı kuyucuklardaki galaktosidase aktivitesi spektrofotometrede 620 nm'de ölçülmüştür. Diğer taraftan negatif kontrol kuyucuklarındaki galaktosidaz aktivitesi de 620 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri arasında karşılaştırma yapılmıştır. Test maddelerinden elde edilen absorbans değerlerin ortalamaları ve standart hataları h SPSS istatistikî analiz programıyla hesaplanmıştır. Aynı işlem pozitif ve negatif kontroller için de gerçekleştirilmiştir.

Sonuçların sağlıklı olması açısından, bir kimyasal ajana belli bir konsantrasyonda mutajendir diyebilmemiz, o maddenin negatif kontrolündeki absorbansının en az iki katı büyüklükte olması ve pozitif kontrollerin absorbans değerlerine göre de anlam ifade etmesi gerekliliğinden kaynaklanmaktadır [Yamamoto vd., 2002].

3.4. Ames/ Salmonella/ Mikrosom MUTAJENİTE Testi

3.4.1. Test için Gerekli Araç ve Gereçler

- Derin dondurucu (ESCO UUS-668A-1)
- Spektrofotometre (MULTISKANGO 1510)
- Hassas terazi (TP-214 DENVER)
- İnkübatör (BINDER BD115)
- Distile su cihazı (MILLIPORE QGARDOORI)
- Çeker ocak (NURGAZ)
- Karıştırılmalı ısıtıcı (IKARCT basic-RCT-B)
- Vorteks (VELP F20220176)
- Otomatik pipet (EPPENDORF)
- Mikroskop (OLYMPUS BX53)
- Ph Metre (METTLER TOLEDO- AG8603)
- Pastör Fırını (ELEKTROMAG-3025)
- Pipetler
- Öze
- Bunzen beki

- Pipet uçları

3.4.2. Ames-testi için Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Vogel-Bonner-medium (50x VB tuzları) Magnezyum sülfat 10 g Sitrik asit Monohidrat 100 g Potasyum fosfat 500 g Sodyum Amonyum fosfat 175 g Distile su 670 ml

Minimal Agar için hazırlanmıştır.

(0,5 Mm) Histidin/biyotin çözeltisi

D-Biyotin (M.A : 247,3) 30,9 mg L-Histidin-HCL (M.A: 191,7) 24 mg Distile su 250 ml

Histidin/biyotin gerektiren besiyerleri için hazırlanmıştır.

Ampisilin solüsyonu (%0.8/ 0,02 NaOH)

Ampisilin trihidrat 0,8 g

Sodyum Hidroksit (0,02 N) 100 ml

Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolü için kullanılmıştır.

Kristal viyole çözeltisi (%0,1lik)

Kristal viyole 0,1 g

Distile su 100 ml

Rfa mutasyonunun kontrolünde kullanılmıştır.

(%0.13) Biyotin çözeltisi:

D-Biyotin 0.65 mg

Distile su 50 ml

Genotip kontrolü ve HBA plaklarında kullanılmaktadır.

(%0.5) Histidin çözeltisi

L-Histidin HCl 2 gr Distile su 400 ml

(%40) Glikoz Çözeltisi

Glikoz 80 g

Distile su 200 ml

MGA, HB ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Glikoz distile su içinde çözülür. Otaklav edilip 0-4°C de saklanır.

Sodyum azid (AZS)

Pozitif kontroldür. 20 µg / plak başına olmak üzere Dimetilsülfoksit (DMSO) de çözülerek 0,22 mµ çaplı filtreden geçirilir.

4-Nitro – O - Fenilendiamin (NPD)

Pozitif kontroldür. 20 µg / plak başına olmak üzere Dimetilsülfoksit (DMSO) de

çözülerek 0,22 µm çaplı filtreden geçirilir. Oda ısısında saklanır.

(2µg / µl) 2-Aminofluorene (2AF)

Pozitif kontroldür. 1.0 mg/petri başına olmak üzere (DMSO)'de çözülerek kullanılır. S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. 0,22 µm çaplı filtreden geçirilerek 0-4 °C de saklanır.

Top agar

Agar	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

Mutasyon deneyinde kullanılır.

Agar, tuz ve su manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözülünceye kadar karıştırılır ve otoklav edilir. Revertant kolonilerin tespiti çalışmasında kullanılmıştır.

Minimal Glukoz Agarlı ortam (MGA)

Agar	15 g
50x VB tuz çözeltisi	20 ml
Glukoz (%20 'lik)	100 ml
Distile su	880 ml

Histidin / Biyotin / Ampisilin katı ortam

Agar	15 g
50x VB tuzları	20 ml
%40 ' lik glukoz	50 ml

Steril histidin HCL (%0,5) 10 ml

Steril 0,5 mM biyotin 6 ml Steril ampisilin çözeltisi 3,15 ml Distile su 860 ml

R faktörü taşıyan suçların dirençliliklerinin kontrolünde kullanılmıştır. Agar ve su karıştırıp otoklav edilir. 45°C'de, %40 glukoz, 50xVB tuzu ve histidin çözeltisi eklenip karıştırılır ve biraz daha soğuyunca biyotin, arkasından ampisilin eklenip karıştırılarak petrilere 25-30 ml olacak şekilde aktarılır. Bu plaklarda bakteriler +4°C de 2 ay boyunca saklanabilir.

Histidin / Biyotin plakları (HB Agar) plakları

Agar	15 g
Distile su	914 ml
50XVB tuzu	20 ml
Glikoz	50 ml
Histidin HCl H ₂ O	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml

Agar ve distile su karıştırılır ve 121°C de 20 dakika otoklav edilir. 45°C ye soğutulup %40 lık glukoz, 50XVB tuzu ve histidin çözeltisi eklenir. Solüsyon biraz daha soğutulduktan sonra biyotin eklenip karıştırılır. Petri kutularına yaklaşık 25-30 ml olarak dağıtılır.

Nutrient broth

Oxoid nutrient broth No: 2 25 g Distile su 1000 ml

Bakterileri üretmek amacıyla kullanılmıştır.

Nutrient Agarlı Ortam

Oxoid broth No:2 25 g Difco Bacto agar 15 g Distile su 1000 ml

Test suçlarının kristal viyole ve UV'ye duyarlılık özelliklerinin test edilmesi ve sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.4.3. Bakteri Suçunun Deney İçin Hazırlanması

Salmonella thyphimurium TA98 ve 100 suçları, yatık agara ekilmiş halde Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanmış ve

+4°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce, stok kültürler hazırlanmıştır. Bunun için, bakteri suçların saklama Şartı olan - 20°C' den 6 saat önce çıkartılmıştır. 2mL Nutrient Broth içerisinde tüplerde süspanse edilmiş, 37°C' de 12-16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra endorf tüp içerisine 1 ml bakteri kültürü ve 0,09 ml DMSO ilave edilmiş ve 20°C'de donduktan sonra - 80°C'de muhafaza edilmiştir.

Çalışma esnasında stok kültürden alınan bakteriler, HB agar plaklarına ekilmiş ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra HBA agar plaklarında 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edilen suçlar, master plaklar olarak saklanmıştır. Master plaklar +4°C'de iki ay boyunca saklanabilmekte ve çalışma esnasında direk olarak kullanılabilir.

3.4.4. Test Sisteminde Kullanılacak Suçların Genetik Özelliklerinin Kontrolü

3.4.4.1. Histidin gereksinimi

TA98 ve TA100 suçları sahip oldukları uvrB delesyonu nedeniyle histidin his (-) sentezleyememektedir. Aynı zamanda bu delesyon biyotin sentez genlerinde de bir tahribata neden olduğundan besiyerine dışarıdan ilave biyotin eklenmektedir. Suçlar, histidin/biyotin içeren ve sadece biyotin içeren histidinsiz agar plaklarına ekilmiştir. Suçların histidin varlığında üreyip, histidin yokluğunda üreyememeleri, his- karakterini doğrulamaktadır [Maron ve Ames, 1983].

3.3.4.2. R faktörünün kontrolü

TA98 ve TA100 suçları his (-) karakteri doğrulandıktan sonra, ampisilin direnç geni (R:

pKM101) taşıyıp taşımadıkları kontrol edilmiştir. Bu işlem için NB'da büyütülen bakteriler, histidin / biyotin / (%0.8) ampisilin içeren glukoz agarlı plaklara ekilerek 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda dirençli suçların varlığı gözlenmiştir.

3.4.4.3. Rfa mutasyonunun kontrolü

Ames test suçlarında oluşturulan rfa mutasyonu, hücre duvarındaki lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur. Test suçlarının NB'da bir gecelik kültürlerinden alınan 0,1 ml'lik sıvı kültür, 45°C'ye ısıtılmış 2 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra nutrient agarlı plaklara sekiz işaretli Şeklinde ekimi yapılmıştır. Filtre kağıdından hazırlanmış disklerle (%0,1) 10 µl kristal viole çözeltisi emdirilmiş ve plakların ortasına yerleştirilmiştir. Plaklar 24 saat 37°C'de bırakıldıktan sonra diskin etrafında oluşan Şeffaf bölge büyük bir molekül olan kristal violenin bakteri içerisine girmesine izin veren rfa mutasyonu varlığını ispat etmiştir [Ames,1973].

3.4.4.4. UvrB mutasyonunun kontrolü

Ames-test suçlarında bulunan uvrB mutasyonunun varlığı ultraviyole ışınlar duyarlılık testi ile kontrol edilmiştir. Gecelik kültürden alınan örnekler Nutrient agarlı besiyerine ekilmiştir. 37°C' de 12 saat bekledikten sonra üreyen tek koloniler, yeniden Nutrient agarlı besiyerine çizgi ekim yapılarak ekilmiştir. Bir tane de kontrol grubu hazırlanmıştır. Deney yapacağımız plak 15 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm yüksekten 8 saniye süre ile ışınlanmıştır. 24 saat 37°C'de beklemeye bırakılmıştır. UvrB delesyonu taşıyan suçların kontrol plakda üremesi, UV ile ışınlanmış plaklarda ürememesi, uvrB mutasyonunun varlığını ispat etmiştir [Ames 1973].

3.4.4.5. Spontan geri dönüş sıklığının kontrolü

Spontan geri dönüş sıklığı, mutant haldeki his- suçların his+ durumuna dönüşmesidir. Bunu ölçmek için Şu deney yapılmıştır; bir gecelik bakteri kültüründen 0,1 ml alınan suç süspansiyonları, 45°C'de su banyosunda tutulan top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra 0.2 ml 0.5M histidin/biyotin solüsyonu da ekleyip test tüpü karıştırılmıştır. Örnekler MGA plaklarına yayılmış, 37°C' de 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Deney sonunda üreyen koloniler sayılmıştır. Spontan geri dönüş sıklığı TA98 için 30-50 revertant, TA100 suşu için ise 120-200 olarak kabul edilir [Ames, 1973].

3.4.5. Örneklerin Sitotoksitelerinin Araştırılması

%10'luk DMSO'da çözülmüş uçucu yağların *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki sitotoksik dozları belirlemek için Nutrient ve top agar plakları kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 0,1 ml'lik uçucu yağlar 2 ml'lik top agarlara konulmuş ve her bir konsantrasyon için 0,1 ml bakteri kültürü ilave edilmiştir. 37°C' de 24 saatlik inkübasyon sonunda kontrol plaklarıyla karşılaştırılmış ve koloni sayımı yapılarak sitotoksik konsantrasyonlar belirlenmiştir. Deneyler 3 tekrarlı yapılmıştır.

3.4.6. Ames testinin yapılışı

Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 histidin oksotrofik suşlarının kullandığımız uçucu yağlar ile tekrar histidin sentezleme yeteneğinin geri kazanıp prototrofik hale gelmediği kontrol edilmiştir. Deneyler, her uçucu yağ için ayrı ayrı yapılmış olup, S9'lu ve S9'suz plaklar halinde 3 tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar student-t-testi ile değerlendirilmiştir.

S9'suz deney yapılırken; içlerinde 2 ml top agar bulunan deney tüpleri su banyosunda 45°C'de bekletilmiş ve içlerine 0,2 ml histidin/biyotin çözeltisi, 0,1 ml test maddesi, 0,1 ml (1 günlük) bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Daha sonra tüpler MGA ile hazırlanmış plaklara sekiz ışıretli şekilde dökülmüştür. Plakların donması beklendikten sonra ters çevrilerek 37°C'de 48-72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol için, yağı içinde çözdüğümüz DMSO ve pozitif kontrol olarak ise 4-nitro-o-fenilendiamin kullanılmıştır. S9'lu deneyde ise, aynı işlem yapılmış sadece 0,5 ml S9 solüsyonu ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Inkübasyon sonunda plaklardaki koloniler sayılmış ve t-student testinde standart hataları ile birlikte ortalamaları kaydedilmiştir. S9'lu deneyde kullanılan pozitif kontrol ise Aminofluoren'dir.

3.4.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

Test maddelerinden elde edilen koloni sayılarının ortalamaları ve standart hataları student-t istatistikî analiz programıyla hesaplanmıştır. Aynı işlem pozitif ve negatif kontroller için de gerçekleştirilmiştir.

3.5. *Neurospora crassa* Test Sistemi

3.5.1. *N. crassa* Suşlarının Deney için Hazırlanması ve Stoklanması

Çalışmamızda kullanılan N23 ve N24 mutant *Neurospora crassa* suşları, Anadolu

Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Kültür koleksiyonundan sağlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Liyofilize olarak temin edilen N23 ve N24 kültürlerden, içerisinde %10'luk miktarda gliserol bulunan 5 ml'lik distile su içeren deney tüplerine ekim yapılmıştır. Karışımdan 0,05 ml, 0,2 ml, 0,8 ml ve 3,95 ml'lik örnekler, Fries minimal besi ortamı bulunan tüplere eklenmiştir. İyiçe karıştırıldıktan sonra petrilere dökülmüştür. 35°C'de 2 günlük inkübasyondan sonra üreyen tek koloniler, 8 ml Fries besi ortamı içeren yatık agarlı besi yerlerine ilave edilerek 35°C'de 7-10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Vejetatif olarak üretilen bu kültürlerden, serum fizyolojik ile ıslatılmış eküvyonla alınan sporlar, 20 ml'lik serum fizyolojik içinde toplanmıştır. Misellerin parçalanması ve sporların açığa çıkması amacıyla 5-10 dakika vortekslenip süzöldükten sonra, yaklaşık 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek iki kez serum fizyolojik ile yıkanmıştır. Geride kalan içinde spor bulunduran çökelti kısmı, serum fizyolojik ile sulandırılarak ml'sinde 2×10^7 spor olacak şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen bu spor çözeltisinin 0,1 ml'si, Neubauer lamına alınıp, spor sayımı yapılmıştır [şen, 2005].

Daha önceden hazırlanmış olan %7,5'luk süt tozu çözeltisinin 3 ml'si, yatık agarda üretilmiş olan vejetatif kültüre dökülmüştür. Konidiaların, süt tozu çözeltisiyle tam olarak karışabilmesi için uzun süre vortekslenmiştir. Bu tüplerden alınan konidia-süt karışımının 1 ml'si, içinde silika-jel bulunan tüplere damlatılarak ilave edilmiştir. Silika-jel tüpleri, deney tüplerinin dörtte üçü dolacak şekilde 6-12 meshlik silika-jel kristalleri ile doldurularak ve yarım saat pastör fırınında 160°C'de steril edilerek hazırlanmıştır. İçerisinde konidia süt karışımı bulunan silika-jel tüpleri, kapakları yarı açık şekilde, oda sıcaklığında 1-2 gün bekletilerek, silika-jelin kuruması sağlanmıştır. Stok kültürler +4°C'de buzdolabında uzun süre saklanmıştır (şen, 2005).

3.5.2. Test için Gerekli Araç ve Gereçler

- Spektrofotometre (MULTISKANGO 1510)
- Hassas terazi (TP-214 DENVER)
- İnkübatör (BINDER BD115)
- Distile su cihazı (MILLIPORE QGARD00RI)
- Çeker ocak (NURGAZ)
- Karıştırılmalı ısıtıcı (IKARCT basic-RCT-B)
- Vorteks (VELP F20220176)
- Otomatik pipet (EPPENDORF)
- Mikroskop (OLYMPUS BX53)
- Ph Metre (METTLER TOLEDO- AG8603)
- Pastör Fırını (ELEKTROMAG-3025)

- Öze
- Bunzen beki
- Pipet uçları

3.5.3. *Neurospora crassa* Test Sisteminde Kullanılan Besi Ortamları ve Çözeltiler

<i>Fries besi ortamı</i> (1000 ml için) Fruktoz	7,5 g
Glukoz	7,5 g
Ca-penthotanate	10 mg
Adenin sülfat	100 mg
Bakto agar	15 g Fries Minimal Tuzu (4x) 250 ml Distile Su 750 ml
<i>Fries No.3 minimal tuzu</i> (1000 ml için (4x))	NH ₄ Tartrate 20 g
NH ₄ Nitrat	4 g
KH ₂ PO ₄ (Monobazik)	4 g MgSO ₄ .7H ₂ O 2 g
NaCl	0,4 g
İz element çözeltisi	4 ml
Biyotin çözeltisi	4 ml
<i>İz element çözeltisi</i> (500 ml için) Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	44,2 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	134 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	485 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	36 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	19,4 mg
ZnCl ₂	2,08 g
<i>Biyotin çözeltisi</i> (500 ml için) Biyotin	5 mg
% 95 etanol	250 ml
Distile su	250 ml
<i>Westergaard tuz çözeltisi</i> (1000 ml için, 20x) KNO ₃	20 g
KH ₂ PO ₄	20 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	20 g
NaCl	2 g
<i>Westergaard (R) besi ortamı</i> (1000 ml için) Sorboz	10 g
Fruktoz	0,5 g
Glukoz	0,5 g
Ca-Penth.	5 mg
Biyotin çözeltisi 10 ml Bactocasomino asit 200 mg Adenin sülfat	0,1 mg

Bacto agar	15 g Wes. Tuz çöz. (20x)	50 ml
Distile su	940 ml	

Westergaard (S) besi ortamı

Geri dönen koloni sayılarını belirlemek için kullanılan besi ortamı ile içeriği aynıdır. Sadece ortama 0,1 mg yerine 25 mg adenin sülfat eklenmiştir.

0,06 M Sodyum-Fosfat Tamponu (pH=7)

A çözeltisi 9,1 g/l KH_2PO_4

B çözeltisi 18 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

A ve B çözeltileri yaklaşık 600 ml/900 ml oranında karıştırılarak sodyum- fosfat (pH=7) tamponu elde edilmiştir ve 15 dakika steril edilmiştir.

3.5.4. Deney Prosedürünün Uygulanması

N. crassa test sistemi Ong'un 1978'de yayınlanan makalesine göre uygulanmıştır. Çalışma da nokta testi tekniği ile sitotoksik konsantrasyonlar belirlenmiş, süspansiyon testi ile ise geri dönen kolonilerin sayımı yapılmıştır.

3.5.5.1. Nokta testi

Steril cam tüplere 2 ml Westergaard (R) besi ortamı hazırlanmıştır. Sıcaklık yaklaşık 45°C olduğunda 1 ml spor çözeltisi eklenmiştir ve bir kaç dakika vortekslenmiştir. Hazırlanan spor çözeltili Westergaard (R) besi ortamı yüzeyi kaplayacak şekilde petrilere dökülmüştür. Donan besi ortamının tam ortasına, test edilecek kimyasal emdirilmiş (20 µl) disk yerleştirilmiştir. Kontrol plaklarına ise sadece çözücü emdirilmiş disk yerleştirilmiştir. Petriler 30°C'de 5 gün inkübe edilmiştir.

3.5.5.2. Süspansiyon testi

Süspansiyon testi, hayatta kalma (survival) ve geri dönüşüm (revertant) testi olmak üzere iki test sistemini içermektedir. Bu test sisteminde, etkisi araştırılan kimyasal maddenin hem *N. crassa* mutant suşlarının hayatta kalmalarına etkisi, hem de geriye dönen (ade- ade+) koloni sayılarına etkisi saptanabilmektedir. Her iki testin de uygulama aşamasından önce ön hazırlık işlemi yapılmıştır. Bunun için, 3 ml'lik sodyum fosfat tamponu (pH:7) bulunan tüpe, test

edilecek kimyasal maddeden 0.1ml, *N.crassa*'nın N23 ya da N24 suşunun sporlarından 1'er ml eklenmiştir ve 35°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından sporlar iki kez 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Son yıkama işleminden sonra sporların bulunduğu örnek, serum fizyolojik ile 5 ml'ye tamamlanmış ve bu örnek hayatta kalma ve geri dönüşüm deneyleri için kullanılmıştır. Bu test sisteminde hayatta kalanlardan elde edilen bilgiler kullanışlı değildir. Bu nedenle, süspansiyon testinde, sitotoksik etki daha önceden nokta testi ile belirlendiğinden, mutajenitenin belirlenmesinde geri dönen kolonilerin sayısı dikkate alınmıştır.

Süspansiyon testinde geri dönenlerin sayısını belirlemek için, 5 ml'lik spor çözeltilisinden 4.9 ml'lik kısım, 100 ml Westergaard (R) besi ortamına eklenerek iyice karıştırılmıştır. Beş petri plağına eşit olarak dökülüp, 35°C'de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda adenin okzotrof halden adenin prototrof hale dönen kolonilerin sayımı yapılmıştır [şen, 2005].

3.5.5. *Neurospora crassa* Test Sisteminde Mutajenik Etkinin Değerlendirilmesi

N. crassa test sisteminde elde edilen sonuçlar, geri dönen koloni sayısı olarak ifade edilmiştir. *N. crassa*'nın N23 ve N24 suşlarının kullanıldığı test sistemlerinde genel olarak bir kimyasal, kendiliğinden geri dönüşüm frekansının iki katı koloni oluşumuna neden olduğunda mutajenik olarak sınıflandırılmıştır (10^7 hücrede N23 için 1.5 ve N24 için 0.5). Bu test sisteminde hayatta kalanlardan elde edilen bilgiler kullanışlı değildir. Geri dönüşüm frekansı ise her plakta geri dönen koloni sayısı olarak ifade edilmiştir. Test bileşeninin oluşturduğu revertant kolonilerin sayısında doza bağlı bir artış meydana geliyorsa ve bu dozların oluşturduğu revertant koloni sayıları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en az bir doz için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenebiliyorsa test maddesi mutajen olarak kabul edilmiştir [Ong, 1978]. Çalışmamızda kontrole göre farklı kimyasal dozlar için elde edilen geri dönüşüm frekanslarının anlamlılığını kontrol etmek amacıyla, SPSS istatistik programı 'student t testi' ile $p \leq 0.01$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Mayıs-Temmuz 2011'in farklı tarihlerinde yapılan arazi çalışmaları ile toplanan üç farklı endemik türün uçucu yağlarının biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda henüz yağ içerikleri araştırılmamış ve mikrobiyolojik analizleri yapılmamış her bir bitki türünün uçucu yağ bileşenleri hidrodestilasyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir [European Pharmacopoeia, 2004].

Yapılan ön çalışmalarımızda öğütülen bitkilerde uçucu yağ verimi daha yüksek olduğu bulunduğu için her bir bitki öğütme işlemine tabi tutulmuştur. Clavenger ile destilasyon işleminden geçirildikten sonra ise bitkilerin uçucu yağ verimlilikleri yüzde olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Stachys rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitkilerinin uçucu yağ verimleri

Bitkiler	Uçucu yağ verimleri %(g/ml)
<i>Stachys rupestris</i>	0,5
<i>Salvia heldreichiana</i>	0,75
<i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i>	0,05

Bitkilerin uçucu yağ verimlerini kıyasladığımızda en yüksek yağ veriminin *Salvia heldreichiana* bitkisinde olduğu görülmüştür. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitkisinin uçucu yağ veriminin ise diğer bitkilere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Uçucu yağ verimi bakımından Labiatae türleri arasında *Salvia* cinsinin en yüksek verimliliğe sahip olduğu bilinmekte, *Stachys* ve *Ballota* türlerinin ise veriminin daha düşük olduğu olduğu belirtilmiş olsa da (Kocabaş 2001), çalışmamızda *Stachys* ve *Ballota* türlerinin *Salvia* türüne göre daha düşük bir yağ verimliliği gösterdiği ve *Stachys rupestris* bitkisinin ise yüksek yağ içeriği dikkat çekici oranda yüksek bulunmuştur.

4.1. *Salvia heldreichiana*'ya İlişkin GCMS Bulguları

Salvia heldreichiana bitkisinin Clavenger metodu ile elde edilen uçucu yağının GCMS sonuçları çizelge 4.2.'de gösterilmektedir. Buna göre, β -pinene (%33.73), camphor (%7.90), α -pinene (%6.26), spathulenol (% 5.23), borneol (%

4.11), cis- β -terpineol (%3.23), cyclopentene, 3-isopropenyl-5,5-dimethyl (%2.89), camphene (%2.18), eucalyptol (%2.50), o-cymene (%1.48) ve terpinen-4-ol (%2.70) gibi uçucu yağ bileşenleri belirlenmiştir. Bu uçucu bileşenlerinin büyük bir kısmını monoterpenler ve seskiterpenler oluşturmakta, bir kısmını ise aromatik hidrokarbonlar oluşturmaktadır.

Ulubelen ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada *Salvia heldreichiana* köklerinde bol miktarda salvigenine ve di(4,4'-hexyloxycarbonylphenyl) ether belirlenmiştir (Ulubelen, 1995). Bizim çalışmamızda ise *Salvia heldreichiana* toprak üstü kısımları çalışılmış olup salvigenine ve di(4,4'-hexyloxycarbonylphenyl) ether bileşenleri gözlenmemiştir. Akın ve arkadaşlarının yapmış oldukları *S. Heldreichiana* uçucu yağ analizinde tespit ettikleri linalool, α -pinene, 1,8-cineole, borneol, terpinen-4-ol, α -terpineol temel bileşenleri ise [Akın vd., 2010] çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Çizelge 4.2. *Salvia heldreichiana* bitkisinin uçucu bileşenleri.

No:	RT	%	Bileşik
1	4.734	0.09	toluene
2	6.586	0.12	p-xylene
3	12.497	0.45	bicyclo[3.1.0]hexane,4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv
4	12.853	6.26	α pinene
5	13.732	2.18	camphene
6	15.833	33.73	β -pinene
7	16.420	0.11	1-octen-3-ol
8	17.109	0.63	β -myrcene
9	17.762	0.23	Decane
10	19.311	1.48	o-Cymene
11	19.578	2.89	cyclopentene, 3-isopropenyl-5,5-dimethyl
12	19.697	2.50	eucalyptol (1,8-cineole)
13	21.899	0.98	γ -terpinene
14	22.516	3.23	cis- β -terpineol
15	24.083	0.20	p-mentha-1.4(8)-diene
16	25.234	0.28	β -Linalool
17	26.552	0.19	3-carene
18	27.721	0.68	L-trans-pinocarveol
19	28.101	7.90	camphor
20	28.303	0.19	verbenol
21	29.496	0.31	bicyclo (2.2.1)heptan-3-one,6.6-dimethyl-2-methylene
22	29.810	4.11	borneol
23	30.695	2.70	terpinen-4-ol
24	31.745	0.71	α -terpineol
25	32.001	0.32	myrtenal
26	32.137	0.70	myrtenol
27	43.088	0.39	camphene
28	45.230	0.45	β -bourbonene
29	47.498	2.94	caryophyllene
30	49.700	0.48	α -caryophyllene
31	51.320	0.15	γ -Muurolene
32	51.522	0.92	β -cubebene
33	51.813	0.43	eudesma-4(14),11-diene
34	52.436	0.15	alloaromadendrene
35	53.653	0.14	germacrene
36	54.305	0.22	δ -cadinene
37	56.852	0.16	palustrol
38	57.582	5.23	spathulenol
39	58.336	0.43	valencene
40	58.822	0.49	α -elemene
41	59.006	0.21	aromadendrene
42	61.000	0.10	adamantane

Salvia heldreichiana bitkisinde belirlediğimiz uçucu yağ bileşenlerinin birçoğu diğer *Salvia* türleri ile benzerlik göstermektedir. *Salvia cryptantha* ve *S. pomifera* uçucu yağlarının ortak bileşenleri olan α pinen, bornel, terpinen, camphene, caryophyllene, terpinen-4-ol, cymene bileşenleri bizim bitkimizde de tespit edilmiştir [Kızılkeçili, 2007]. Ayrıca, *Salvia heldreichiana* bitkisinde yüksek oranda tespit ettiğimiz caryophyllene, spathulenol ve germacrene bileşenleri anavatani İran olan *Salvia virgata* ve *Salvia syriaca* bitkilerinin temel bileşenlerini oluşturmaktadır [Sedifkon ve Mirza, 1999].

Ülkemizde endemik türler olarak tespit edilen altı farklı *Salvia* türünün toprak üstü kısımlarının uçucu yağ analizleri yapılmıştır. Çalışmada, α -pinene (*Salvia blepharochlaena*), 1,8-cineole (*S. caespitosa*), β -pinene (*S. divaricata*), thymol (*S. hypargeia*), caryophyllene oxide (*S. longipedicellata*) ve α -thujone (*S. pilifera*) temel bileşenleri belirlenmiştir [Demirci vd., 2003]. Bu bileşenler çalışmış olduğumuz *S. heldreichiana* bitkisinin uçucu yağı ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca, İran'a özgü *Salvia virgara* ve *Salvia syriaca* uçucu yağlarında tespit edilen caryophyllene (%46.6) ve spathulenol (%6.4) bitkilerin temel bileşenleri arasındadır [Sedifkon, 1998]. Özellikle spathulenol bulunma oranı (%6.4) olarak bizim bitkimizdeki bulunma oranına benzerdir.

Yumrutaş ve arkadaşlarının *Salvia euphratica* var. *euphratica* ve *S. euphratica* var. *leiocalycina* ile yaptıkları çalışmada α -pinene, myrcene, linalool, camphor, borneol, terpinene-ol, eucalyptol gibi bizim bitkimiz ile ortak olan uçucu yağ bileşenleri tespit etmişlerdir. Ayrıca bitkilerin antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Özellikle, *Salvia euphratica* var. *euphratica* bitkisinde tespit edilen yüksek antioksidan aktivitenin, içeriğinde yüksek oranda bulunan eucalyptol (% 18.3) bileşeninden kaynaklandığını belirtmişlerdir (Yumrutaş, 2011). Bizim çalıştığımız *S. heldreichiana* türünde ise eucalyptol (%2.5) oranında bulunmuş olup, bitkimizin ana bileşeni %33.73 bulunma oranıyla β -pinene, bitkimizin ana bileşenini oluşturmaktadır.

Uçucu yağ içeriği bakımında *Salvia heldreichiana* bitkisi ile yüksek oranda benzerlik gösteren *Artemisia argyi* bitki uçucu yağının ökaryotik hücrelerde antimelanogenez aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Antimelanogenez etkili kimyasallar kozmetik sanayide oldukça önemlidir. Derinin beyazlaşmasında ve ciltte oluşan lekelerin giderilmesinde güvenli ve etkili antimelanogenez özelliğe sahip kimyasal ajanlar araştırılmaktadır. *Artemisia argyi* bitki uçucu yağı antimelanogenez etkili olduğu bilinen önemli kimyasallardandır. *Artemisia argyi* uçucu yağı 3-carene (%4.64), camphene (%0.48), β -pinene (%5.62), myrcene (%0.19), o-cymene (%5.01), eucalyptol (%23.66), α -pinene (%0.36), linalool (%3.11), camphor (%1.53), borneol (%6.55), terpinen-4-ol (%1.40), caryophyllene (%10.19), δ -cadinene (%0.59), β -cubebene (%1.29) bileşenlerinin varlığı ve bulunma oranları bakımından [Huang, 2012]; *S.heldreichiana* uçucu yağı ile büyük bir benzerliğe sahiptir. Bu durum *S. heldreichiana* uçucu yağının antimelanogenez araştırmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Nörolojik bir hastalık olduğu bilinen alzheimer hastalığının bir nedeni, sinir hücreleri arasından salınan asetilkolin miktarının azalmasıdır. Asetilkolini hidroliz yoluyla parçalayan bir enzim olan antikolinesteraz enziminin aktivitesini inhibe edilerek asetilkolin miktarının artırılması şeklinde bir yaklaşım, alzheimer hastalığının tedavisi için bir yöntem olmuştur. Geleneksel tıpta Alzheimer tedavisi için kullanılan *Salvia lavadulaefolia* bitki yağının içerikleri ve antikolinesteraz aktivitesini araştırılmıştır. Çalışmada ayrıca, *S. lavadulaefolia* uçucu yağının temel bileşenlerini oluşturan monoterpenlerin birbiriyle olabilecek sinerjik ve antagonistik etkileri belirlenmiştir. *S. lavadulaefolia* temel bileşenlerinden 1,8-cineole (%26.8), camphor (%24.7), α -pinene (%6.6), β -pinene (%5.4), borneol (%3.2), caryophyllene oxide (%1.2), linalool (%0.8) ve bornyl acetate (%0.7)'in antikolinesteraz inhibisyonları araştırılmıştır. Saf haldeki 1,8-cineole bileşeni, tüm *Salvia lavadulaefolia* uçucu yağ bileşenine benzer bir inhibisyon aktivitesi sergilemiştir. Aynı çalışmada, camphor ve 1,8 cineole arasında antagonistik etki, 1,8-cineole bileşeni ile α -pinene ve caryophyllene oxide arasında sinerjistik etkilerin olduğu, buna bağlı olarak da antikolinesteraz inhibisyon aktivitelerinde değişimler olduğu belirlenmiştir [Savelev vd., 2003]. *Salvia heldreichinana* bitkisinde tespit edilen uçucu yağ bileşenleri *Salvia lavadulaefolia* içeriğine yüksek oranda benzemektedir. *Salvia* türü bitkilerinin temel bileşenleri olan 1,8-cineole, camphor, α -pinene, β -pinene, borneol, caryophyllene oxide, linalool bileşenleri alzheimer tedavisinde potansiyel bir uygulama alanı bulabilirler.

4.2. *Ballota saxatilis* subsp.*brachyodonta*' ya İlişkin GCMS Bulguları

Ballota saxatilis subsp. *brachyodonta* bitkisinin uçucu bileşenlerinin analizinde, NIST kütüphane taraması'na göre, bol miktarda aromatik hidrokarbon gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3.). Uçucu yağın sırasıyla 17.738, 47.474 ve 57.766 alıkonma zamanlarında görülen decane (%13.12, Cyclohexene,4-(1,5-dimethyl-1,4-hexadien-1-yl)-1-methyl- (%11.12), Caryophyllene oxide (%27.62) uçucu yağın ana bileşenlerini oluşturmaktadır. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitkisinin uçucu bileşenlerinin belirlendiği çalışmada Cyclohexene,4-(1,5-dimethyl-1,4-hexadien-1-yl)-1-methyl- ve Caryophyllene oxide seskiterpen, decane ise hidrokarbonlu monoterpen olarak bilinmektedir.

Çizelge 4.3. *Ballota saxatilis* subsp.*brachyodonta* bitkisinin uçucu bileşenleri.

No:	RT	%	Bileşik
1	4.734	10.70	Toluene
2	9.025	14.98	p-xylene
3	17.738	13.12	decane
4	25.234	8.43	Undecane
5	47.474	11.12	Cyclohexene,4-(1,5-dimethyl-1,4-hexadien-1-yl)-1-methyl-
6	57.766	27.62	Caryophyllene oxide

Çalışmamızda diğer bitkilere göre daha az çeşitte uçucu yağ taşıdığı belirlenen *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* alt türü ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışma yoktur. Ancak tür düzeyinde *Ballota saxatilis*'in eser miktarda uçucu yağ taşıdığı bilinmektedir. Bir başka *Ballota* türü olan *Ballota nigra* uçucu yağ bileşeni ise Başer ve ekibi tarafından araştırılmış olup temel bileşenin germakren D olduğu bulunmuştur [Yılmaz, 2003].

Çalışmamızda *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitki uçucu yağında %27.62 oranında caryophyllene oxide seskiterpeni belirlenmiştir. Ticari olarak bulunan caryophyllene oxide bileşenin fare mitokondrial hücreleri üzerinde yapılan toksisite çalışmasında, bileşenin mitokondri üzerinde elektron akış zincirine müdahale ettiği belirlenmiştir. Caryophyllene oxide seskiterpeni, reaktif elektrofilik bir aramaddede gibi davranıp protein ve DNA'ya kolaylıkla bağlanan stabil bir kimyasaldır. Caryophyllene oxide'in ökaryotik hücrelerde etkili bir toksik ajan olduğu belirtilmiştir [Monzote vd., 2009]. *Annoana aquamosa* ağacından ekstrakte edilen caryophyllene oxide bileşenin anti-inflammatuar özelliği bilinmektedir [Chavan vd., 2010]. Ayrıca, dermatolojik bir hastalık olan onimikozis tedavisinde antifungal etkisinden yararlanılmaktadır [Yang vd., 1999].

Ballota saxatilis subsp. *brachyodonta* uçucu yağının neredeyse yarısını (%47.23) aromatik hidrokarbonlar oluşturmaktadır. Bunlardan toluene ve p-xylene bileşenleri petrokimya endüstrisinde kullanılan önemli hammaddelerdendir [Chen, 2008]. Genotoksik özelliklerinin düşük olduğu bilinmektedir. Daha çok bu bileşenlerin yıkım ürünleri idrarla dışarı atılmaktadır. Portekiz'de yapılan bir çalışmada, bu maddelere maruz kalan petrokimya işçilerinden alınan idrar ve kan örneklerinde bu bileşenlerin varlığı ve etkileri araştırılmıştır. Alınan idrar örneklerinde, toluene ve p-xylene yıkım ürünleri tespit edilmiştir. Kan örnekleri ile yapılan genotoksite testlerinde, MN (micronükleus), kromozom aberasyon (CB) sayısında ve comet testi ile de DNA kuyruk uzunluğunda belirgin artışlar tespit edilmiştir. Bu çalışmada, toluene ve p-xylene bileşenlerine uzun vadede, belirli konsantrasyonlarda maruz kalındığında patolojik etkilere neden olabileceği vurgulanmıştır [Roma-Torres, 2006]. Toluene hidrokarbonunun Ames test ile yapılan mutajenite testinde, bakteriler üzerinde mutajeniteye neden olmadığı belirtilmiştir [Pelclova, 2013]. Decane molekülü bitkimizde yüksek oranda belirlediğimiz bir diğer hidrokarbon molekülüdür. Bu molekülün halobakterilerde ATPaz aktivitesi için proton motiv güç olarak çalışan bakteriorodopsinin konformasyonunu değiştirerek hücre zarı hidrofobisitesini arttırdığı tespit edilmiştir [Hendler vd., 2003].

4.3. *Stachys rupestris*'e İlişkin GCMS Bulguları

Stachys rupestris bitkisinin bazı uçucu bileşenleri çizelge 4.4.' de gösterilmiştir. Uçucu yağın temel bileşenlerini seskiterpenler başta olmak üzere, monoterpenler ve diterpenler

oluşturmaktadır. Bitki ekstraktında Manool (%23.13), Abietatriene (%15.22), Isoledene(%10.27), α -pinene (%8.20), gamma-elemene (%6.19), Spathulenol (%6.16), Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl- (%3.66), caryophyllene (%3.20), β -phallandrene (%2.26), α -cadinol (%1.91) α -cedrene (%1.50) gibi temel uçucu yağ bileşenleri belirlenebilmiştir.

Çizelge 4.4. *Stachys rupestris* bitkisinin uçucu bileşenleri

No:	RT	%	Bileşik
1	12.901	8.20	α -Pinene
2	15.667	1.11	β -Pinene
3	19.560	2.26	β -phallandrene
4	28.291	0.60	1,3,8-p-Mentatriene
5	47.527	3.20	caryophyllene
6	51.647	1.50	α -cedrene
7	51.914	3.66	benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-
8	52.602	6.19	gamma-elemene
9	53.700	0.87	di-epi- α -cedrene
10	54.329	1.21	naphthalene
11	55.831	0.66	6z-2,5,5,10-Tetramethyl-undeca-2,6,9-trien-8-one
12	57.635	6.16	spathulenol
13	61.428	0.84	t-muurolol
14	61.814	0.71	β -eudesmol
15	62.176	1.91	α -cadinol
16	64.312	10.27	isoledene
18	79.424	0.79	trachylobane
20	82.059	1.30	kaur-16-ene
21	84.142	23.13	manool
22	84.424	15.22	abietatriene

Stachys rupestris bitkisinin SubKritik Su ekstraksiyonu ile uçucu yağının elde edildiği ve analizinin yapıldığı benzer bir çalışmada, pinene (%22.68), eucalyptol (%4.40), terpinen-4-ol (%4.36) bileşenlerinin, bitkinin ana bileşenleri olduğu belirtilmiştir [Cellat, 2011]. Bizim çalışmamızda ise yüksek oranda bulunan pinene yanında SubKritik Su ekstraksiyonu ile uçucu yağının elde edildiği yöntemdeki diğer bileşenlere paralellik göstermektedir.

Benzer bir çalışmada *Stachys inflata* uçucu yağı ile yapılan GCMS analizinde linalool (28.55%), a-terpineol(9.45%), spathulenol (8.37%) ve (2E)- hexenal (4.62%) temel bileşenler olarak belirlenmiştir [Ebrahimabadi, 2010].

Stachys yemenensis süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile elde edilen uçucu yağının temel bileşenleri ise phellandrene (13.9%), α -phellandrene(11.7%), elemol (12.0%), spathulenol (6.7%), β -eudesmol (5.0%), α -eudesmol (4.75%) ve squalene (4.8%) olarak belirlenmiştir [Awadh Ali vd., 2010].

Skaltsa ve çalışma ekibi, *Stachys alopecuros*, *S. scardica*, *S.cretica*, *S. germanica*, *S. recta*, *S.*

spinulosa, *S. euboica*, *S. menthifolia* uçucu bileşenlerini GCMS ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada *Stachys* türlerinin temel bileşenleri *S.alopeucros* için (+)-caryophylleneoxide, (E)-caryophyllene, α -calacorene; *S. scardica* için germacrene, α -pinene, δ -cadinene, γ -muurolene; *S.cretica* için germacrene, pimaradiene; *S. germanica* için germacrene, (+)-caryophyllene oxide; *S. recta* için linalool, *S. spinulosa* için spathulenol, α -copaene, (+)-caryophyllene oxide,

S. euboica, için -(E)-caryophyllene, δ -cadinene *S. menthifolia*, için kaurene, abietatriene ve 13-epi-manoyl oxide gibi bileşenler yüksek oranda bulunmuşlardır [Skaltsa vd., 2003]. Çalışmasını yaptığımız *Stachys rupestris* GCMS analizinde ise, spathulenol, kaurene, caryophyllene, ve α -pinene bileşenlerinin varlığı benzerlik göstermektedir.

Ayrıca, Balkan yarımadası endemiği olan *Stachys plumosa* türünün uçucu yağının ana bileşenini %45,5 oranında abietatriene diterpeni oluşturmaktadır (Radulovic, 2007). Çalıştığımız bitkide de *S.plumosa*'da olduğu gibi yüksek oranda abietatriene (%15.22) bulunmuştur.

4.4. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Stachys rupestris, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* toprak üstü kısımlarının hidrodestilasyon ile elde edilen uçucu yağlarının antimikrobiyal test sonuçları Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. *Stachys rupestris*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* uçucu yağının MİK değerleri.

50 μ g/mL	<i>Stachys rupestris</i> (Uçucu yağ) MİK	<i>Ballota saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> (Uçucu yağ) MİK	<i>Salvia heldreichiana</i> (Uçucu yağ) MİK	Amfisillin bakteriler için MİK	Flukanazol funguslar için MİK
<i>Escherichia coli</i> g(-)	50	50	> 50	<0.48	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> g(-)	50	50	50	<0.48	-
<i>Salmonella thyphimurium</i> g(-)	50	50	50	<0.48	-
<i>Enterococcus faecalis</i> g(+)	25	50	> 50	<0.48	-
<i>Staphylococcus aureus</i> g(+)	50	50	> 50	<0.48	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> g(+)	25	25	> 50	<0.48	-
<i>Bacillus subtilis</i> g(+)	25	> 50	> 50	<0.48	-
<i>Candida albicans</i>	>50	25	50	-	<0.48
<i>Candida parapsilosis</i>	50	25	50	-	<0.48

Lamiaceae familyasına ait üç endemik bitkinin uçucu yağlarını kıyasladığımız endemik bitkilerin antimikrobiyal etkisi birbirine benzemekle birlikte, *Salvia heldreichiana* bitkisinin diğer bitkilere göre antimikrobiyal etkisi diğerlerinden daha düşüktür. Ayrıca, bitkilerin bakterilere ve mayalara spesifik etki gösterdikleri söylenebilir.

Gram negatif bakterilere karşı her üç bitki de 50 µg/ml MİK değerinde etki gösterirken, yalnızca *E. coli* bakterisi *Salvia heldreichiana* bitkisine karşı direnç göstermiştir. *Stachys rupestris* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* Gram pozitif bakterilere karşı 25 ve 12,5 µg/ml konsantrasyonlarda etki gösterirken, *Bacillus subtilis*'in ise *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağına karşı dirençli olduğu görülmüştür. *Salvia heldreichiana* uçucu yağ gram pozitiflere karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Mayalara karşı en yüksek antimikrobiyal etki ise 25 µg/ml MİK değerindeki *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağına aittir. Mayalardan *Candida albicans*, *Stachys rupestris*'in uçucu yağına dirençli iken, *Candida parapsilosis* (25 µg/ml) *S. rupestris* uçucu yağ konsantrasyonuna karşı hassastır. *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağ mayalar üzerine etkilidirler ve MİK değerleri 25 µg/ml ve 50 µg/ml arasında değişmektedir. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağında yüksek oranda tespit ettiğimiz caryophyllene oxide seskiterpeninin güçlü bir antifungal ajan olduğu bilinmektedir [Yang vd., 1999]. Bu nedenle *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* anticandida etkisinde caryophyllene oxidin önemi büyüktür.

Ballota saxatilis subsp. *brachyodonta* uçucu yağının mikroorganizmalar üzerindeki MİK değerleri 25 µg/ml ve 50 µg/ml arasında değişmektedir. Bu uçucu yağ ekstraktı, bakterilere ve mayalara karşı etkili olup, yalnızca *Bacillus subtilis*, uçucu yağın antimikrobiyal etkisine direnç gösterebilmiştir. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağının *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis*'e karşı MİK değerleri 25 µg/ml'dir. Uçucu yağın *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* Gram pozitif bakterilere karşı MİK değerleri sırasıyla 50, 50, 25 µg/ml'dir. Ayrıca, uçucu yağ ekstraktının Gram negatif bakteriler olan *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı MİK değerleri ise 50 µg/ml'dir. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* ile daha önce antimikrobiyal çalışma yapılmamıştır. Ancak aynı cinsten olan *Ballota nigra*'da izole edilen fenilpropanoidlerin metisilin dirençli suşların da bulunduğu *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı oldukça etkili olduğu bilinmektedir [Didry vd., 1999].

Couladis ve ekibinin, GCMS analiziyle yapmış olduğu bir başka çalışmada, *Ballota pseudodictamnus* uçucu yağının antimikrobiyal etkisi gözlemlenmiştir. Uçucu yağ analizinde temel bileşenin caryophyllene oxide, ptytol ve γ-murolene olduğu belirlenen çalışmada, yüksek antibakteriyel etki gözlenirken, antifungal etkinin düşük olduğu belirlenmiştir. *S. aureus* ve *S. epidermidis* Gram pozitif bakterilere karşı MİK değerleri 0.45 ve 3.54 mg/ml olan *Ballota*

pseudodictamnus uçucu yağı antimikrobiyal etkisinin, yapısında bulunan caryophyllene oxide bileşeninden kaynaklandığı belirtilmektedir [Cauladis vd., 2002].

Çalışmamızda *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* GCMS analizinde caryophyllene bileşenleri gözlenmiştir. Antimikrobiyal etkinin, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*'da yüksek oranda bulunan (%27.62) caryophyllen oxide bileşeninden veya caryophyllene oxide ile birlikte bulunan diğer hidrokarbonların etkileşiminden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Farklı tür bitkilerde de benzer bileşenler belirlenebilmektedir. Cimanga ve çalışma ekibinin on farklı *Eucalyptus* türünün ve *Aframomum*, *Cymbopogon*, *Monodora*, *Ocimum* türlerinin uçucu bileşenlerini belirlemişlerdir. Hepsinde %0.1'in üzerinde 1,8-cineole, β -pinene, *p*-cymene, myrcene, γ -terpinene, α -terpineol ve limonene ortak bileşenler tespit edilmiştir. Bitkilerin antibakteriyel aktiviteleri birbirlerinden farklı olup, ortak bileşenlerin bitkideki miktarları ile antimikrobiyal etkileri arasında bir korelasyon tespit edilememiştir [Cimanga vd., 2002]. Bu durum ise 1,8-cineole, β -pinene, *p*-cymene, myrcene, γ -terpinene, α -terpineol ve limonene bileşenlerinin antimikrobiyal etkide baskın rol oynamadığını göstermektedir. Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri bileşenlerin birbirleriyle olabilecek sinerjistik ya da antagonist etkiden kaynaklanmaktadır. Oysa birçok bileşenin antimikrobiyal aktivitede temel rol oynadığı bilinmektedir. Eucalpyptol, 4-undecanone, 4- undeconol, pinene, Linalool, thymol, eugenol, elemene, caryophyllene, β -myrene, carvacrol, spathulenol, aromadendrene, camphor, 1.4 cineole, phenyl butanone, α - humulene, syringaresinol, scoparone, menthol bileşenleri bunlardan bazılarıdır [Murganathan vd., 2012]. Çalışmasını yaptığımız bitkilerde ise bu bileşenlerin çoğu saptanmıştır. Eucalpyptol, Linalool, β -caryophyllene, β -myrene, spathulenol, aromadendrene, *Salvia heldreichiana*'da; pinene, spathulenol, elemene, caryophyllene ise *Stachys rupestris* de belirlenmiştir.

Salvia heldrichiana endemik bitkisinin uçucu yağının antimikrobiyal etkinlik gösterdiği MİK değeri 50 μ g/ml'dir. Gram pozitif bakteriler *Salvia heldrichiana* uçucu yağına oldukça dirençli olup, Gram negatifler ve mayalar için daha hassastırlar. *Salvia heldrichiana* uçucu yağı 50 μ g/ml ve alt konsantrasyonda *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Bacillus subtilis* üremesini inhibe edememişlerdir. *Salvia heldrichiana* uçucu yağının etki gösterdiği mikroorganizmalar üzerindeki MİK değerleri ise 50 μ g/ml'dir. Uçucu yağın *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella thyphimurium* Gram negatiflerine karşı MİK değerleri 50 μ g/ml iken *Escherichia coli* üzerine etkin olmadığı bulunmuştur. Oysaki Akın ve arkadaşları, *Salvia heldreichiana* uçucu yağının *Escherichia coli* üzerine disk difüzyon metoduyla etkinliğini tespit etmişlerdir [Akın vd., 2010]. *S.heldreichiana* uçucu yağının *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis*'e karşı MİK değerleri 50 μ g/ml'dir. *Salvia heldreichiana* uçucu yağında tespit ettiğimiz pinene izomerlerinin fungal hücrelere karşı oldukça toksik olduğu bilinmektedir. Da Silva ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada alpha-pinene ve özellikle beta- pinene

molekülünün *Candida albicans* biofilm oluşumunu önledikleri belirtilmiştir. Biyofilm oluşumunda görevli fosfolipaz ve esteraz enzimlerini etkileyerek hücre toksisitesinde rol aldıkları belirtilmiştir [Silva vd., 2012]. Çalışmamızda *Salvia heldreichiana*'da tespit ettiğimiz beta-pinene (%33.73) ve alpha-pinene (%6.26) antifungal toksisitesinden sorumlu olan asil bileşenler olabilirler. Birçok çalışma *Salvia* türlerinin antimikrobiyal etkilerini ispatlamıştır. *Salvia cryptantha* uçucu yağının *Klebsilla pnemonia*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*'a karşı MİK değerleri 3.12 µl/ml; *Salvia pomifera* uçucu yağının *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*'akarşı MİK değerleri, 6.12 µl/ml ve *Klebsilla pnemonia*'ya karşı ise 12,5 µl/ml'dir [Kızılkeçili, 2007].

Cardile ve arkadaşları *Salvia bracteate* ve *Salvia rubifolia* uçucu yağ analizlerinde yüksek oranda seskiterpen bileşenleri belirlemişlerdir. Her iki bitkide *Salvia* bitkilerinin temel bileşeni olarak bilinen borneol ve eucalyptol bileşenleri diğer *Salvia* türlerine göre eser miktarda bulunmaktadır. Özellikle, *Salvia rubifolia* uçucu yağının temel bileşenlerini γ -muurolene, p-cymene, α -pinene, 1-epi-cubenol, trans-pinocarvyl acetate ve thujone oluşturmaktadır. *S.rubifolia* uçucu yağının 50 µg/mL'de Gram pozitiflere olan güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve M14 melanoma hücrelerinde ise apoptozu indüklediği belirlenmiştir [Cardile vd., 2009]. Bizim çalışmamızda *Salvia heldreichiana* uçucu yağının 50 µg/mL'de Gram pozitiflerden ziyade Gram negatiflere daha etkin olduğunu bulunmuştur. Her iki bitkinin, biyolojik aktivitesindeki bu farklılık içeriklerinde bulunan monoterpen ve seskiterpen bileşenlerinin bulunma oranlarından kaynaklandığını söyleyebiliriz. Bu nedenle Gram negatiflere olan antimikrobiyal etkinin esas sorumlu bileşenleri bitkimizde tespit edilen β -pinene (%33.73), camphor (%7.90), α -pinene (%6.26),

spathulenol (% 5.23), cis- β -terpineol (%3.23), eucalyptol (%2.50), o-cymene (%1.48), terpinen-4-ol gibi monoterpenlerdir.

Bir diğer endemik bitkimiz olan *Stachys rupestris* uçucu yağının ise tüm bakterilere ve mayalardan *Candida parapsilosis*'e karşı etkili olduğu, MİK değerlerinin ise 25-50 µg/ml arasında değiştiği gözlenmiştir. *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Bacillus subtilis* Gram pozitiflerine karşı MİK değerleri sırasıyla 25, 50, 25, 25 µg/ml iken; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphimurium* Gram negatiflerine karşı MİK değerleri 50µg/ml'dir. *S.rupestris* uçucu yağının *Candida parapsilosis*'e karşı MİK değeri 50µg/ml iken, *Candida albicans* fungusuna etkin olmadığı bulunmuştur.

Çalıştığımız teknikte ve konsantrasyonlarda *Stachys rupestris* uçucu yağının belirli mikroorganizmalara spesifik antimikrobiyal etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Uçucu yağ elde etme tekniğine bağlı olarak bu etki arttırılabilir. Farklı *Stachys* türleri ile ilgili çalışmalar bunu doğrulamaktadır. Duarte ve arkadaşları *Stachys byzantina* uçucu yağının *Candida albicans*'a karşı MİK değerini 2 mg/ml konsantrasyonunun üstünde olabileceğini belirlemişlerdir. Bu

konsantrasyonun altında herhangi bir MİK değeri belirlenememiştir [Duarte vd., 2005].

Stachys rupestris uçucu yağı da *Candida albicans*'a karşı etkin olmadığı tespit edilmiştir. *Stachys schtschegleevii* tıbbi bitkisinin uçucu yağı, sulu ekstraksiyonu ve metanol ekstraktı ile yapılan antimikrobiyal analizlerde, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* mikroorganizmaları üzerine etkileri araştırılmıştır. Bitkinin uçucu yağının ve sulu ekstraktının 25 mg/ml altında mikroorganizmalar üzerine etkin olmadığı belirlenirken, metanol ekstraktının ise sadece Gram pozitiflere karşı 12,5 mg/ml konsantrasyonunun altında aktif olduğu belirlenmiştir [Mohsen vd., 2007]. *Stachys inflata* uçucu yağı ile yapılan GCMS, antimikrobiyal ve antioksidan analizlerinde ise bitkinin zayıf bir oksidan olduğu, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* mikroorganizmalarına karşı ise antimikrobiyal etkili olmadığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, *Stachys inflata* uçucu yağının ana maddesini oluşturan linalool (28.55%) ve α -terpineol (9.45%) maddelerinin yalnız başlarına 500-12,5 μ g/ml konsantrasyon aralığında antimikrobiyal aktivite oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bu durum ise, yağın temel bileşenleri ile eser miktarda bulunan diğer bileşenleri arasındaki antagonistik bir etkinin sonucu olduğu şeklinde açıklanmıştır. Bu yüzden her bileşiğin ayrı ayrı çalışılması gerektiği önerilmiştir [Ebrahimabadi vd., 2010].

Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu temel bileşenleri phellandrene, α - phellandrene, elemol, spathulenol, β -eudesmol, α -eudesmol ve squalene olarak belirlen *Stachys yemenensis* uçucu yağının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. glabrata* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal araştırmaları yapılmıştır. Bu uçucu yağın, *E. coli* için MİK değeri %0.3 v/v olarak belirlenirken, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ve *C. glabrata* için sırasıyla %0.6, >%2.5 ve %2.5 v/v olduğu belirlenmiştir [Awadh Ali, 2010].

Stachys pseudopinardii endemik bitkisinin etanol ekstraksiyonu ile yapılan antimikrobiyal araştırmasında, *Bacillus cereus* bakterisine karşı (MİK 16 μ g/ml) güçlü antimikrobiyal etki belirlenmiştir [Dulger ve Aki, 2009].

Skaltsa ve çalışma ekibi, sekiz farklı *Stachys* türünün uçucu bileşenini hidrodestilasyon tekniği ile elde etmişler ve antimikrobiyal analizlerini yapmışlardır. Bu çalışmada, *S. alopecuros*, *S. scardica*, *S. cretica*, *S. germanica*, *S. recta*, *S. spinulosa*, *S. euboica*, *S. menthifolia* uçucu bileşenlerinin bakterilere karşı olan antimikrobiyal aktivitelerinin funguslara kıyasla daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada caryophyllene oxide, caryophyllene ve α -pinene bileşenlerinin antimikrobiyal analizleri yapılmış ve *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı 0.05 ve 0.1 mg/ml arasında etkin antimikrobiyal özelliğe sahip oldukları belirlenmiştir. Bu bitkilerde seskiterpenlerce zengin bileşenlerin ortaya çıkarılması bunların güçlü antimikrobiyal etkinin sebebi olduğu görüşünü doğrulmuştur [Skaltsa vd., 2003]. Çalışmamızda Spathuleol, t-muurool, elemene, cadinol, α -eudesmol, isloedene, caryophyllene gibi

seskiterpenler *Stachys rupestris* bitkisinde yüksek oranda belirlenmiştir.

Goren ve çalışma ekibi, Türkiye’de bulunan yirmiiki *Stachys* türünün uçucu yağ analizlerini ve *E.coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans*’a karşı antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Çalışmış olduğumuz *Stachys rupestris* bitkisinde de tespit edilen spathulenol ve caryophyllene diğer tüm yirmiiki *Stachys* türünün uçucu yağı ile ortak bileşenlerdir. Şöyle ki, *Stachys cretica* subsp. *cassia*, *S.cretica* subsp.*garana*, *S. creticasubsp. lesbiaca*, *S. creticasubsp. kutahyensis*, *S. viticina*, *S. sericantha*, *S.pinetorum*, *S. bayburtensis*, *S. huber-morathii*, *S. huetii*, *S. tmolea*, *S. germanicasubsp. bithynica*, *S. creticasubsp. bulgarica*, *S. spectabilis*, *S. thirkei*, *S. balansaesubsp. carduchorum*ve *S. longispicata* bitki uçucu yağlarının ve α -pinene, β -caryophyllene oxide, linalool oxide içeriklerinin tüm mikroorganizmalar üzerinde ortalama bir antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir [Goren vd., 2011].

Çalışmamızda tespit etmiş olduğumuz, *Stachys rupestris*, *Salvia heldreichiana*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağ bileşenleri ve antimikrobiyal aktiviteleri literatüre önemli bilgiler sunmaktadır. Son yıllarda ise, kozmetik, gıda, ve ilaç sanayisinde, önemli bir yeri olan bu bileşenlerin antimikrobiyal aktivite araştırmaları yetersiz kalmakta, diğer biyolojik aktiviteleri de araştırılmaktadır. Dünya sağlık örgütü, özellikle ilaç yapımında kullanılan bu bileşenlerin mutajenik potansiyellerinin araştırılmasının zorunlu olduğunu bildirmişlerdir. Bu bilgilerin ışığında, biyolojik aktivite araştırmasına, prokaryotik ve ökaryotik kısa-zamanlı mutasyon analizleri ile devam edilmiştir.

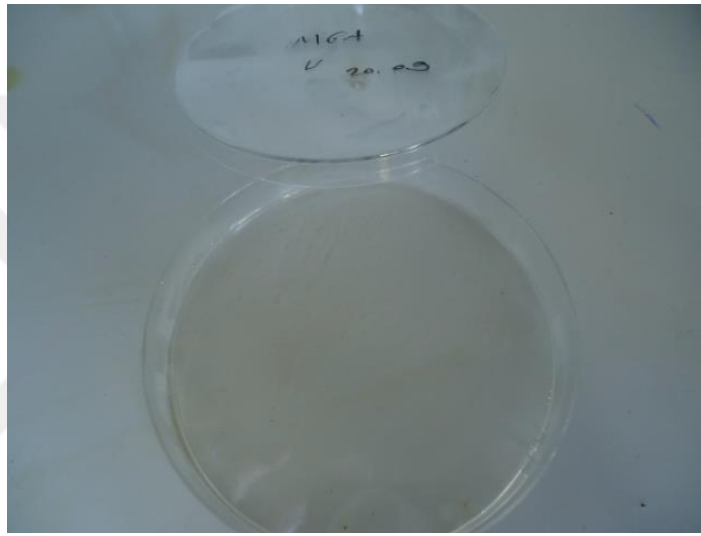
4.5. *Umu-Test Bulguları*

Umu-testi, daha önce de bahsedildiği gibi, bir çok kimyasalın mutajenitesinin değerlendirilmesinde kısa sonuç veren in-vitro bir metottur. Uzun yıllardır, karsinojenlerin araştırılmasında kullanılan Ames testi yerine kullanılabilir olacak oldukça pratik ve ucuz bir tekniktir. Çalışmamızda, uçucu yağ bileşenleri *Umu*-test tekniği ilk kez denenmiş, uygulanabilirliği tartışılmıştır. Ames testinde olduğu gibi *Salmonella thyphimurium* TA1535/pSK1002 suşu üzerinde özel mutasyonlar oluşturulmuştur. Bu mutasyonlar, suşların güvenilirliğinin tespitinde kullanılmakta olup, her deney öncesi pratik deneylerle suşun çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir. Suşda oluşturulmuş, histidin gereksinimi mutasyonu, R Faktörü mutasyonu, rfa Mutasyonu, uvrB Mutasyonu, umuC==lacZ Füzyonunun İndüklenebilirliğinin Kontrolü deneylerinin bulguları aşağıda anlatılmıştır.

4.5.1. Test Sisteminde Kullanılacak Suşun Genetik Özellikleri İlgili Bulgular

4.5.1.1. Histidin gereksinimi

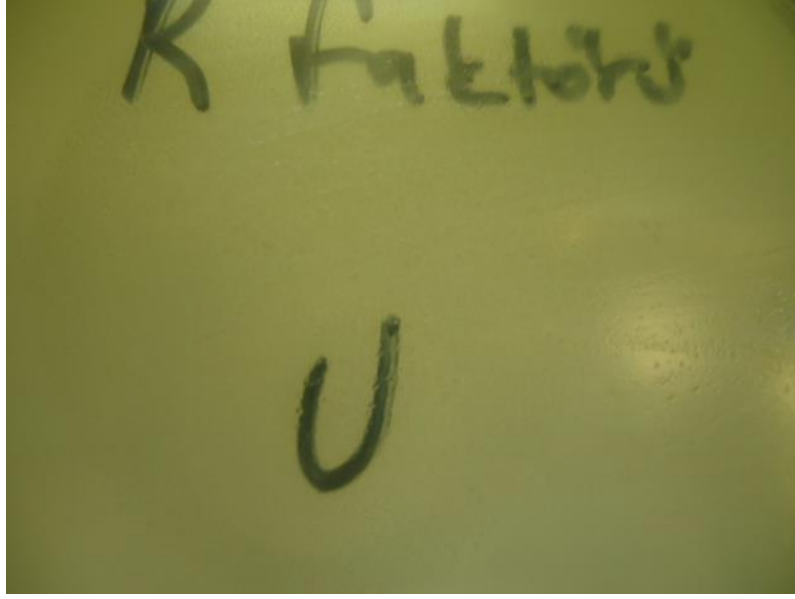
Umu test suşu sahip olduğu *uvrB* delesyonu nedeniyle histidin sentezleyememektedir. His(-) sentezleyememe özelliği, suşların MGA (minimal glukoz agar) plaklarına ekimiyle kontrol edilmiştir. *UvrB* delesyonu nedeniyle MGA plaklarına ekimi yapılan bakteriler histidinsiz ortamda üremezken (Şekil 4.1), histidin biyotin bulunan besiyerlerinde ürediği gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. MGA (minimal glukoz agar) plaklarındaki üreme durumu

4.5.1.2. R Faktörünün Kontrolü

Umu-test suşunun his(-) karakteri doğrulandıktan sonra, ampisilin direnç geni(R) taşıyıp taşımadığı kontrol edildi. Bu işlem için histidin / biyotin / ampisilin içeren glukoz agarlı plaklar hazırlandı. Histidin/biyotin/ampisilin içeren plaklara ekimi yapılan bakterinin ürediği gözlenmiştir (Şekil 4.2). Histidin/biyotin/ampisilin içermeyen plak ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Histidin/biyotin/ampisilin içeren plaktaki üreme durumu



Şekil 4.3. Histidin/biyotin/ampisilin içermeyen plak (Kontrol)

4.5.1.3. Rfa mutasyonunun kontrolü

Umu test suşunda oluşturulan rfa mutasyonu, hücre duvarındaki lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur. Test suşlarının gecelik kültürlerinden alınan 0,1 ml'lik örneklerin, Nutrient agarlı plaklara ekimi yapılmıştır. Filtre kağıdından hazırlanmış disklere 10 µl kristal viole çözeltisi (1 mg/ml) emdirilmiş ve plakların ortasına yerleştirilmiştir. Plaklar 12 saat 37°C 'de bırakıldıktan sonra diskin etrafında şeffaf bölge oluşması gözlemlendi (Şekil 4.4). Diskin çevresinde oluşan şeffaf bölge; büyük bir molekül olan kristal violenin bakteri içerisine girmesine izin veren rfa mutasyonu varlığını ispat etmiştir [Ames, 1973].



Şekil 4.4. Rfa Mutasyonunun Kontrolü

4.5.1.4. UvrB mutasyonu kontrolü

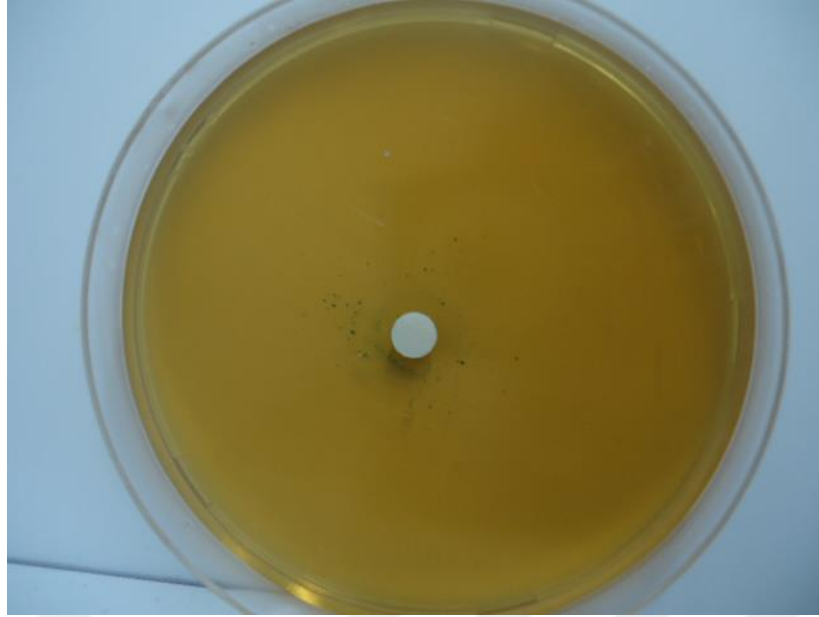
Nutrient Agarlı plaklara ekilen bakterilere, 33 cm uzaktan 8 saniye UV lambası altında bekletilen türlerde üreme görülmüş. Kontrol grubunda ise üreme görülmemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. UvrB mutasyonu kontrolü

4.5.1.5. *UmuC*==*lacZ* füzyonunun indüklenebilirliğinin kontrolü

Üzerine ONPG damlatılan bakteriler bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçta dis etrafında mavi renkte inhibisyon zonu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).

Şekil 4.6. *UmuC==lacZ* füzyonunun indüklenabilirliğinin kontrolü

4.5.2. Pozitif ve Negatif Kontrol Bulguları

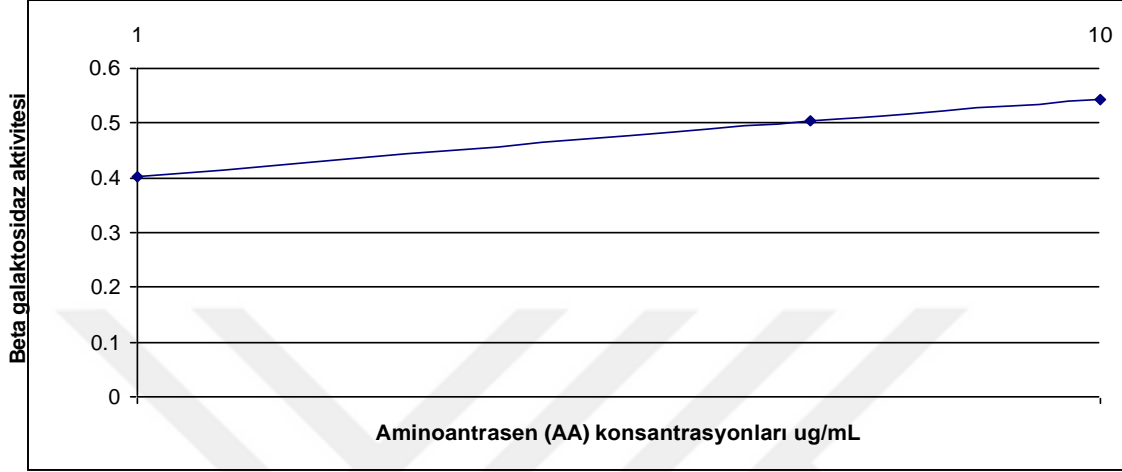
Pozitif kontroller, bakterideki β -galaktosidaz aktivitesine bağlı olarak mutajenlerin belirlenebileceğini göstermiştir. DMSO kullanılarak konsantrasyonları hazırlanan pozitif mutajenlerin β -galaktosidaz aktiviteleri belirlenmiştir. 2- Aminoantrasen, metabolik aktivitenin belirlenmesinde (S9+), pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Furilfuramid ise metabolik olmayan aktivitede (S9-), pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 2-aminoantrasenin (10, 1, 0.1 $\mu\text{g/ml}$) ve Furilfuramid (100, 10, 1 ng/ml) çözeltilerinin OD_{620} 'deki absorpsiyon sonuçları (Çizelge 4.6), negatif kontrole bağlı absorpsiyon değerleri (Çizelge 4.7) gösterilmiştir. Ayrıca konsantrasyona bağlı enzim aktivitesi Şekil 4.7 ve 4.8'de grafiksel olarak gösterilmiştir. Her iki pozitif mutajenin belirli konsantrasyonlarda negatif kontrole göre mutajeniteye neden olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.6. Pozitif ne negatif kontrolün OD_{620} 'deki absorpsiyon değerleri

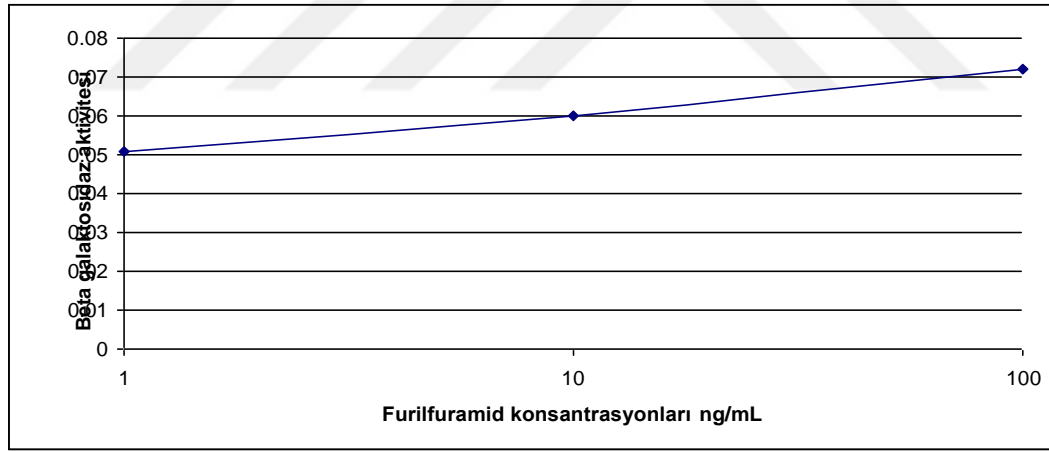
$\mu\text{g/ml}$	Aminoantrasen S9+	ng/ml	Furilfuramid S9-
	Ort abs. SD		Ort abs. SD
10	0.745 \pm 0.024	100	0.080 \pm 0.005
1	0.609 \pm 0.022	10	0.071 \pm 0.002
0.1	0.518 \pm 0.010	1	0.071 \pm 0.001
Negatif kontrol	0.681 \pm 0.069	Negatif kontrol	0.071 \pm 0.001

Çizelge 4.7. Aminoantrasen ve furilfuramid pozitif mutajenlerinin negatif kontrole bağlı absorpsiyon değerleri

µg/mL	Aminoantrasen	ng/mL	Furilfuramid
10	0.676	100	0.079
1	0.540	10	0.071
0.1	0.449	1	0.070



Şekil 4.7. Aminoantrasen pozitif kontrolünün grafiksel gösterimi (S9+)



Şekil 4.8. Furilfuramid pozitif kontrolünün grafiksel gösterimi (S9-)

4.5.3. Uçucu Yağların Umu-test Bulguları

Umu-test çevresel mutajenlerin, karsinojenlerin ve antimutajenlerin taranması için geliştirilmiş hızlı ve güvenilir bir testtir. Günlük besinlerle aldığımız veya geleneksel tıpta kullandığımız bitki kaynaklı tüm ajanların mutajen veya antimutajen potansiyelleri vardır [Caillet vd., 2011]. Çalışmamızda endemik olduğunu tespit ettiğimiz *Stachys rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitkilerinin uçucu yağlarının mutajenik ve antimutajenik potansiyellerini araştırdık. Daha önce uçucu yağların mutajeniteleri farklı

genotoksik tekniklerle çalışılmış olsa da, *Stachys rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitki uçucu yağlarının genotoksik etkileri *Umu*-test ile ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca, test bileşenlerinin etkinliklerinin memelilerin metabolik aktivasyonları sonucu değişip değişmediğini belirlemek için S9 fraksiyonu varlığında deneyler tekrarlanmıştır.

Bitki uçucu yağlarının konsantrasyona bağlı metabolik (S9+) ve metabolik olmayan (S9-) *Umu*-test bulgularının absorpsiyon değerleri (OD₆₂₀) Çizelge 4.8.'de standart hatalarıyla birlikte verilmiştir. Bu absorpsiyon değerleri daha sonra, negatif kontrol (%10 DMSO ve bakteri) absorpsiyon değeri çıkarılarak normalize edilmiş ve S9'lu ve S9'suz sonuçlar birbirine karşılaştırılarak yorumlanmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8. *Salvia rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağların ve negatif kontrolün OD₆₂₀'deki absorpsiyon değerleri.

Uçucu yağlar	Kons. mg/ml	Ort. Abs. S9+	SD	Ort. Abs. S9-	SD
<i>S.rupestris</i>	1	0.519	± 0.045	0.069	± 0.002
	0.5	0.583	± 0.162	0.068	± 0.002
	0.25	0.583	± 0.162	0.069	± 0.005
	0.12	0.543	± 0.123	0.070	± 0.002
	0.06	0.651	± 0.283	0.072	± 0.004
	0.03	0.782	± 0.194	0.069	± 0.003
<i>S.heldreichiana</i>	1	0.450	± 0.093	0.067	± 0.003
	0.5	0.623	± 0.142	0.066	± 0.003
	0.25	0.605	± 0.188	0.069	± 0.002
	0.12	0.672	± 0.104	0.070	± 0.003
	0.06	0.585	± 0.135	0.073	± 0.001
	0.03	0.590	± 0.205	0.069	± 0.001
<i>B. saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i>	1	0.519	± 0.091	0.068	± 0.002
	0.5	0.681	± 0.083	0.067	± 0.002
	0.25	0.608	± 0.115	0.071	± 0.008
	0.12	0.711	± 0.153	0.067	± 0.001
	0.06	0.725	± 0.195	0.068	± 0.001
	0.03	0.671	± 0.236	0.071	± 0.003
	Negatif Kontrol	0.681	± 0.069	0.071	± 0.001

Çizelge 4.9. *Stachys rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitki uçucu yağlarının negatif kontrole bağlı absorpsiyon değerleri.

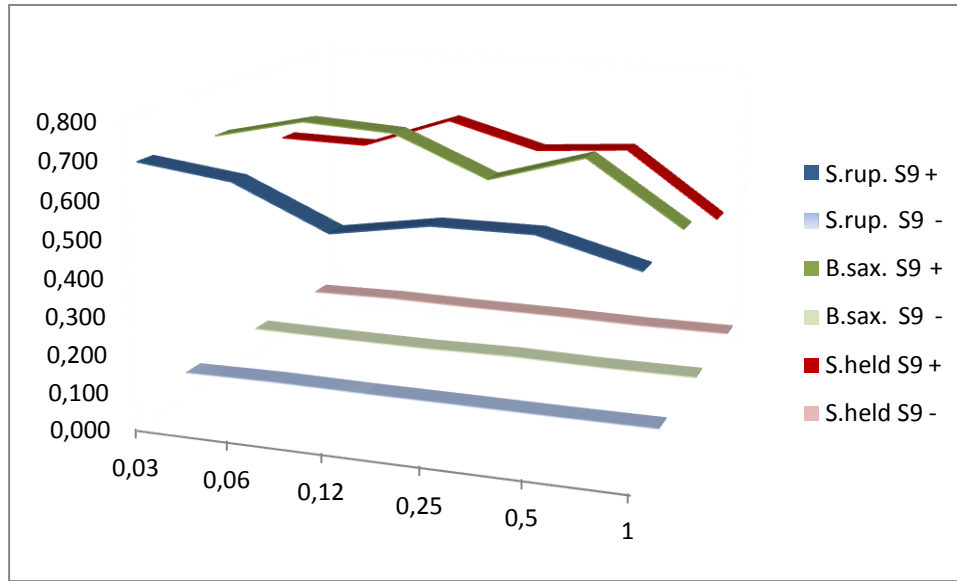
mg/ml	<i>S. rupestris</i>		<i>S. heldreichiana</i>		<i>B. saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i>	
	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)
1	-0.161	-0.001	-0.231	-0.003	-0.161	-0.002
0.5	-0.097	-0.002	-0.057	-0.004	0.000	-0.003
0.25	-0.098	-0.001	-0.076	-0.001	-0.072	0.000
0.12	-0.137	-0.001	-0.008	-0.000	0.030	-0.003
0.06	-0.029	0.001	-0.095	0.002	0.044	-0.002
0.03	0.101	-0.001	-0.090	-0.001	-0.009	0.000

Hidrodestilasyon yoluyla elde edilen uçucu yağların negatif kontrole göre oluşturduğumuz Çizelge 4.8'da bitkilerin hiçbir konsantrasyonunda negatif kontrole göre çift katlı bir artış olmadığı gözlenmiştir. Bu durum uçucu yağların çalıştığımız konsantrasyonda mutasyon etkisi olmadığını göstermektedir.

Uçucu yağların absorpsiyon değerinden negatif kontrolün absorpsiyon değerleri çıkarılarak bulunan β -galaktosidaz aktiviteleri Çizelge 4.9.'da gösterilmiştir. Buna göre çizilen grafiklerde *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Stachys rupestris* ve *Salvia heldreichiana* uçucu yağlarının bakterilere karşı S9 varlığında ve yokluğunda herhangi bir mutajeniteye neden olmamakta ancak konsantrasyon değişimlerine bağlı olarak sitotoksik etki oluşmaktadır. Mutasyon analizlerinde S9 kullanarak, uçucu yağların karaciğer enzimleri ile etkileşimi sonucu oluşan metabolitlerin etkisine bakılmaktadır [Mumcu, 2005]. Ancak, grafiklerde S9 varlığında kontrole göre, kültürdeki β -galaktosidaz aktivitesindeki değişim, hatta negatif kontrole göre negatif absorpsiyon değeri, uçucu yağların karaciğer enzimleriyle kimyasal reaksiyonlara girerek olası antimutajenik etki gösterdiğini kanıtlamıştır.

Uçucu yağların 0.03'ten 1'e doğru artan konsantrasyonlarında Beta- galaktosidaz enzim aktivitesindeki artış, SOS genlerinin aktif olduğunu, düşüş ise yağların bazı konsantrasyonlarda bakteriler üzerinde sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir.

Stachys rupestris bitki uçucu yağının hem S9'suz hem de S9'lu ortamda *S. thphimurium* suşu üzerinde mutajenik aktivitesi yoktur. Hatta S9'lu koşullarda β - galaktosidaz enzim aktivitesi, normal koşullara göre daha düşük bir seyir izlemektedir. Çalıştığımız konsantrasyonlarda S9 ve uçucu yağ bileşenlerinin biyokimyasal reaksiyonları β -galaktosidaz enzim aktivitesinde değişimlere neden olsa da bir mutajeniteden söz edemeyiz (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *Stachys rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitki uçucu yağları konsantrasyonlarına bağlı olarak β -galaktosidaz aktivitesinin grafiksel gösterimi.

Uçucu yağlar ve bileşenleri karaciğer, mide, kolon, göğüs kanseri, glioma tümörleri hücre hatlarında baskılayıcı etki gösterdiği belirtilmiştir. Glioma tedavisinde bir seskiterpen hidrokarbon olan elemene uçucu yağ bileşeninin tedavi sürecini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir [Edris, 2007]. Elemene bileşeni *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* bitkisinde bulunmaktadır.

Salvia heldreichiana bitki uçucu yağının S9 metabolik aktivasyon kullanmadan mutajenik aktivitesi daha stabil iken, S9'lu koşullarda enzim aktivitesine ve konsantrasyona bağlı olarak daha değişken bir grafik oluşturduğunu görmekteyiz. Bu durum uçucu yağ bileşenlerinin vücudumuza alındıktan sonra farklı biyokimyasal süreçlerden geçerek etkilerinin değişebileceğini göstermiştir. Ancak çalıştığımız konsantrasyonlarda herhangi bir mutajeniteden söz edemeyiz. Hatta, hiçbir zaman β -galaktosidaz aktivitesi sıfır olamayacağından, normal koşullardaki stres durumunu azalttığını söyleyebiliriz.

Ballota saxatilis subsp. *brachyodonta* uçucu yağının diğer bitkilerde olduğu gibi mutajenik etkisi belirlenmemiştir. S9'suz ortamda normal koşullarla hemem hemen aynı β -galaktosidaz aktivitesine sahipken, S9'lu ortamda *S. thphimurium* suşu üzerinde enzim aktivitesini normal koşulların altına çeken bir etki söz konusudur. Bu durum diğer bitkiler ile aynıdır; her üç bitki de olası antimutajeniteye sahip olabilir.

Ballota nigra bitkisinden izole edilen phenylpropanoid glycoside bileşenlerinin antimutajenik etkisi belirlenmiştir. Son derece kanserojenik olarak bilinen, heterosiklik aminler grubuna giren PhIP-indüklenmiş kanser hücreleri üzerinde antigenotoksik etkiye sahip olduklarını belirtmişlerdir (Nishikawa, 2007).

4.6. Ames/Salmonella/Mikrosom TEST BULGULARI

Çalışmamızda, uçucu yağ bileşenleri Ames-test tekniği ile mutajenik potansiyelleri araştırılmıştır. TA98 ve TA100 suşlarının sahip olduğu genetik özellikler kontrol edilmiştir. Suşlarda oluşturulmuş, histidin gereksinimi, R Faktörü, rfa ve uvrB Mutasyonlarının varlığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda his- fenotipinden his+ fenotipine spontan dönüşen suşların koloni sayıları TA98 için 30-50 revertant/plak ve TA100 için 120-200 revertant/plak oldukları belirlenmiş ve orijinal mutasyonlara sahip oldukları gözlenmiştir.

Pozitif kontrol olarak kullandığımız 4-Nitro-o-Fenilendiamin T98 ile yapılan, sodyum azid T100 ile yapılan ve S9 gerektirmeyen deneylerde, Aminofluorene ise hem T98 hem de T100 ile yapılan ve S9 gerektiren deneylerde kullanılmıştır. Pozitif kontrollerin hazırlanmasında %10 DMSO çözücü olarak kullanılmıştır.

4.6.1. Uçucu Yağların Ames-test Bulguları

Ames-test çevresel mutajenlerin, karsinojenlerin ve antimutajenlerin taranması için geliştirilmiş koloni sayma tekniğine göre geliştirilmiş bir testtir.

Çalışmamızda endemik olduğunu tespit ettiğimiz *Stachys rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp.*brachyodonta* bitkilerinin uçucu yağlarının mutajenik potansiyellerini bu teknikle araştırdık. Test bileşenlerinin etkinliklerinin memelilerin metabolik aktivasyonları sonucu değişip değişmediğini belirlemek için S9 fraksiyonu varlığında da deneyler yapılmıştır.

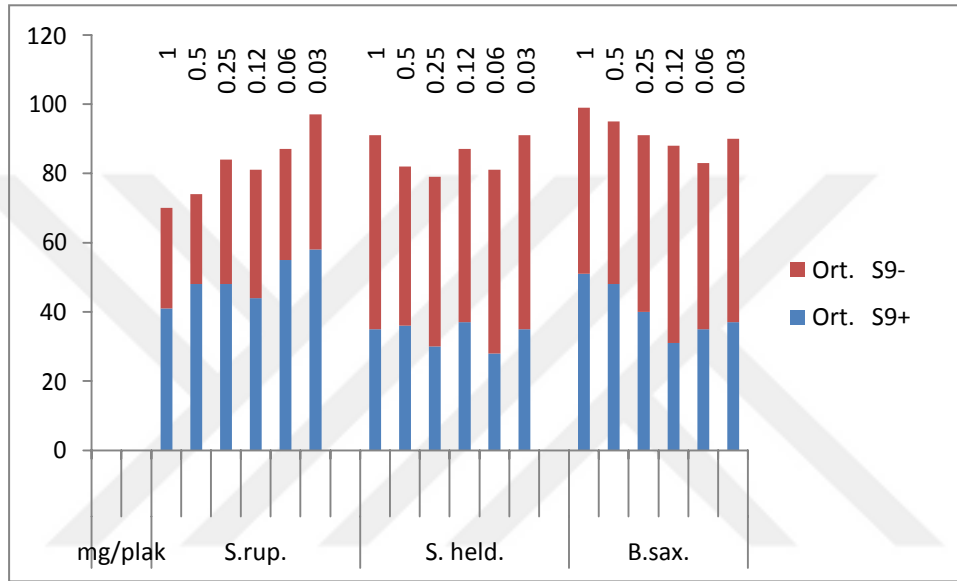
Bitki uçucu yağlarının konsantrasyona bağlı metabolik (S9+) ve metabolik olmayan (S9-) Ames-test bulguları Çizelge 4.10 ve 4.11'de standart hatalarıyla birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.10. TA98 suşlarının *Salvia rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağ örneklerindeki sonuçları. Her doz üç paralel plak şeklinde yapılmış olup iki deneyin ortalamaları alınmış standart hataları ile birlikte verilmiştir.

Uçucu yağlar mg/plak	Kons. mg/ml	Ort. S9+ SD	Ort. S9- SD
<i>S.rupestris</i>	1	41 ± 1.125	29 ± 1.012
	0.5	48 ± 1.112	26 ± 2.022
	0.25	48 ± 3.132	36 ± 3.015
	0.12	44 ± 2.123	37 ± 3.112
	0.06	55 ± 2.123	32 ± 2.124
	0.03	58 ± 1.294	39 ± 4.133
<i>S.heldreichiana</i>	1	35 ± 0.193	56 ± 1.113
	0.5	36 ± 0.142	46 ± 4.233
	0.25	30 ± 0.128	49 ± 1.122
	0.12	37 ± 0.104	50 ± 1.233
	0.06	28 ± 1.103	53 ± 5.121
	0.03	35 ± 0.205	56 ± 1.001

Çizelge 4.10. (devami)

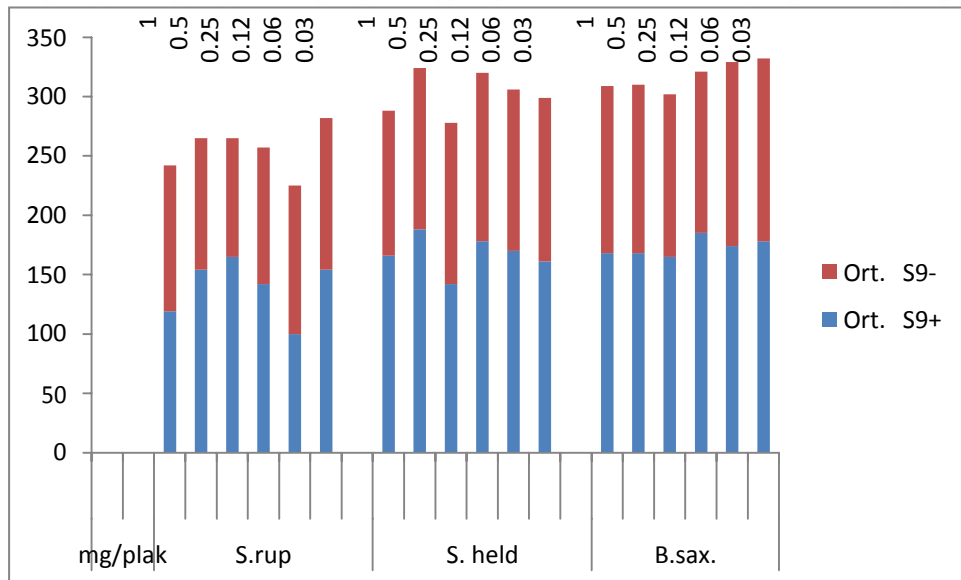
<i>B. saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i>	1	51 ± 3.281	48 ± 2.482
	0.5	48 ± 1.253	47 ± 1.982
	0.25	40 ± 2.215	51 ± 4.328
	0.12	31 ± 1.853	57 ± 2.333
	0.06	35 ± 1.185	48 ± 3.625
	0.03	37 ± 3.256	53 ± 1.954
Negatif Kontrol DMSO	48 ± 1.065	57 ± 2.041	
Pozitif kontrol	Aminofluorene 850 ± 1.444	4-Nitro-o- Fenilendiamin 203 ± 2.004	



Şekil 4.10. Ames testi ile *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* uçucu yağlarının varlığında, TA98 suşunun geri dönen koloni sayılarının grafiksel gösterimi. Veriler bir deneyin ortalamaları alınarak hesaplandı. Her doz için 5 petri uygulandı. Spontan geri dönen kolonilerin ortalaması S9 fraksiyonlu 48, S9 fraksiyonsuz 57'dir.

Çizelge 4.11. TA100 suşlarının *Salvia rupestris*, *Salvia heldreichiana* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağ örneklerindeki sonuçları. Her doz üç paralel plak şeklinde yapılmış olup iki deneyin ortalamaları alınıp standart hataları ile birlikte verilmiştir.

Uçucu yağlar mg/plak	Kons. mg/ml	Ort. S9+ SD	Ort. S9- SD
<i>S.rupestris</i>	1	119 ± 4.123	123 ± 1.741
	0.5	154 ± 1.261	111 ± 2.951
	0.25	165 ± 2.852	100 ± 1.654
	0.12	142 ± 2.965	115 ± 1.752
	0.06	100 ± 1.283	125 ± 2.654
	0.03	154 ± 1.456	128 ± 1.234
<i>S.heldreichiana</i>	1	166 ± 0.258	122 ± 0.961
	0.5	188 ± 2.152	136 ± 1.458
	0.25	142 ± 1.456	136 ± 2.365
	0.12	178 ± 2.165	142 ± 2.658
	0.06	170 ± 1.165	136 ± 1.958
	0.03	161 ± 0.423	138 ± 2.065
<i>B. saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i>	1	168 ± 1.258	141 ± 2.562
	0.5	168 ± 1.083	142 ± 1.265
	0.25	165 ± 1.456	137 ± 2.054
	0.12	185 ± 1.152	136 ± 2.361
	0.06	174 ± 2.100	155 ± 0.851
	0.03	178 ± 1.300	154 ± 1.963
	Negatif Kontrol DMSO	133 ± 2.125	165 ± 1.565
	Pozitif kontrol	Aminofluorene 655 ± 1.231	Sodyum azid 240 ± 2.201



Şekil 4.11. Ames testi ile *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* uçucu yağlarının varlığında, TA100 suşunun geri dönen koloni sayılarının grafiksel gösterimi. Veriler bir deneyin ortalamaları alınarak hesaplandı. Her doz için 5 petri uygulandı.

Spontan geri dönen kolonilerin ortalaması S9 fraksiyonlu 133, S9 fraksiyonsuz 165'dir.

TA98 ve TA100 suşları ile yapılan çalışmada, S9'lu ve S9'suz ortamlarda tüm çalışma konsantrasyonlarında geri dönen koloni sayıları, spontan geri dönen koloni sayılarından daha fazla bulunmamıştır ($p>0.05$). *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Stachys rupestris* ve *Salvia heldreichiana* uçucu yağlarının bakterilere karşı S9 varlığında ve yokluğunda herhangi bir mutajeniteye neden olmamaktadır (Şekil 4.10 ve 4.11).

Salvia cinsine ait bitkilerin uçucu yağ bileşenlerinden olan linalool, myrcene ve eucalyptol monotерpenlerinin mutajenik ve ROS-indüklenmiş mutanlara karşı antimutajenik etkileri araştırılmıştır. Yöntemde *Escherichia coli* WP2 IC185 bakteriyel mutasyon testi, insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) ve lenfoid (NC- NC) hücreleri ile comet test yapılmıştır. Sonuçta, Linalool ve myrcene bileşenleri, ROS-indüklenmiş mutant hücreler üzerine, eucalyptol bileşenine göre daha fazla antimutajenik etki göstermiştir [Mitic-Culafic vd., 2009]. Çalışmamızda *Salvia heldreichiana* bitkisinde linalool, myrcene ve eucalyptol başta olmak üzere çok sayıda monotерpen bileşik tayin edilmiştir (Çizelge 4.2). Belkide monotерpen bileşiklerin çok sayıda olması uçucu yağın mutajenik aktivitesini baskılamaktadır. Çünkü, monotерpenlerin mutajenik etkiden ziyade antimutajenik aktivitelerinin yüksek olduğu belirtilmektedir [Mitic-Culafic vd., 2009]. *E.coli* WP2, *E.coli* K12 ve *Salmonella*/microsome bakteriyel mutasyon testlerinin kullanıldığı bir çalışmada, *Salvia officinalis*'in ana maddesini oluşturan monotерpen bileşenlerinin (1,8 cineole, camphor, thujone, limonene) mutasyon ve antimutasyon etkileri araştırılmıştır. Uçucu yağın ve monotерpenlerin hiçbirinde bakteriyel hücrelere karşı S9'lu ve S9'suz ortamda mutajenik etki saptanmamıştır. Fakat *Salvia officinalis* uçucu yağı ve monotерpen bileşenler, UV-indüklenmiş mutant hücrelerin sayısını azaltmışlardır. Yani antigenotoksik etki gösterdikleri saptanmıştır [Vukovic-Gacic vd., 2006]. İçeriğinde yüksek oranda 1,8 cineole (%43,10) ve camphor (%18,34) bulunan *Salvia fruticosa* uçucu yağının antifungal etkiye sahip olduğu, Ames test sonucunda ise *Salmonella typhimurium* suşunda mutasyona sebep olmadığı belirlenmiştir [Adam vd., 1998]. *Escherichia coli* K12, *Salmonella*/microsome ve *Sacharomyces cerevisiae* bakteriyel mutasyon testleri ile *Salvia officinalis* uçucu yağının monotерpenlerinin antigenotoksik özellikleri doğrulanmıştır. Bu çalışmada, monotерpenlerin antimutajenik mekanizması, DNA onarım sistemi ile interaksiyonuna bağlanmaktadır. 1,8-cineole, camphor, thujone uçucu bileşenleri, bir DNA onarım sistemi modülatörü gibi davranmaktadır [Knezevic-Vukcevic vd., 2005]. Bu çalışmalar, uçucu yağ fraksiyonlarının hücre içerisinde yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir. Hücre membranında gerçekleşen fiziksel yıkım dışında, bu bileşenlerin hücrenin biyokimyasal süreçlerinde etkin rol oynamaktadırlar. Monotерpenler dışında diterpen yapıdaki moleküller de antimutajenik aktiviteye sahiptir. Örneğin; *Salvia cinnabarina* bitkisinden izole edilen secoisopimarane diterpenoidin Ames ve *E.coli* WP2uvrA mutasyon testi ile mutajeniteleri ve antimutajeniteleri araştırılmıştır. Metabolik aktivasyon sisteminin

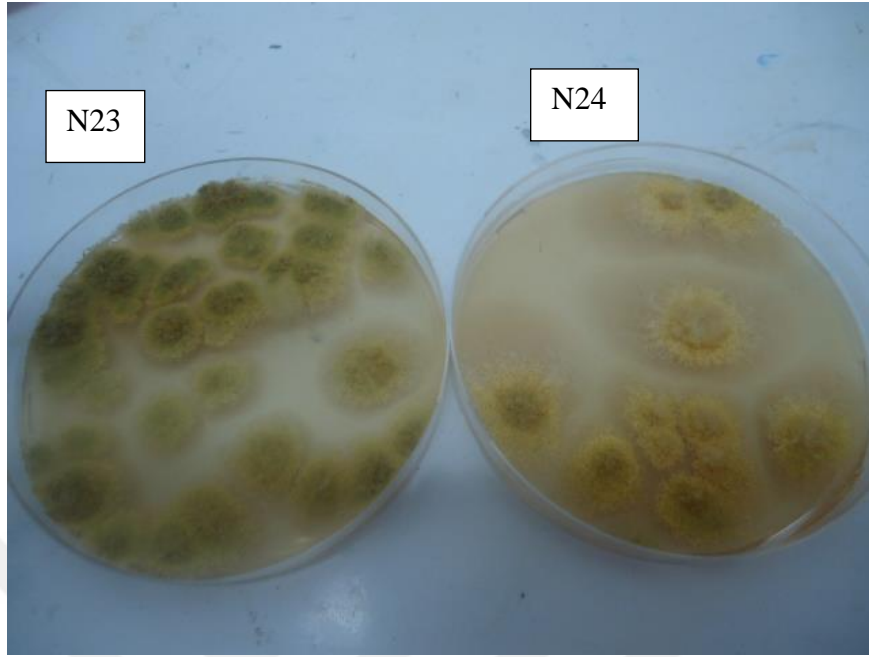
kullanıldığı ve kullanılmadığı her iki durumda da mutajenik özellik tespit edilememiştir. Ancak, secoisopimarane diterpenoidde 2-aminoanthracene, 2- nitrofluorene, sodium azide ve methyl methane sulfonate mutajenlerine karşı antimutajenik özellik belirlenmiştir. Bu çalışmada secoisopimarane diterpenoidin antimutajenik aktivitesi ile ilgili iki hipotez öne sürülmüştür. Bunlardan birisi antimutajenik etkiyi, mutajenlerin bakteri hücre membranına absorpsiyonunu bloke ederek hücre geçirgenliğini azalttığı yönündeki hipotezidir. Diğer hipotez ise, mutajenlerin kimyasal ya da enzimatik yollarla inhibisyonudur [Sotto vd., 2008].

Diterpenler ile ilgili başka bir çalışmada, *Tripterygium wilfordii* bitkisinden izole edilen triptolide oksijenli diterpenin Ames test sonucunda genotoksik etkisi olmadığı, ancak, çok düşük konsantrasyonlarda memeli hücre hatlarında sitotoksik ve göğüs kanseri hücrelerinde antitümoral etki gösterdiği belirlenmiştir [Shamon vd., 1996]. Ayrıca, *Copaifera langdorffii* uçucu yağında bol miktarda bulunan kaurenoic acid diterpeninin hemstür akciğer fibroblast hücrelerinde 30 ve 60 µg/ml konsantrasyonunda genotoksik potansiyeli belirlenmiştir. Kaurenoic acid bileşeninin antigenotoksik veya DNA onarım potansiyeli belirlenmemiştir. DNA hasarına neden olması, diterpenlerin olası genotoksik potansiyellerini ortaya koymaktadır [Cavalcanti, 2006]. Ayrıca, Pubmed Compound internet sitesi bazı bileşenlerin biyolojik testlerinin toplandığı bir link oluşturmuştur. Manool, ve Abiatetriene bileşenlerinin biyolojik test sonuçlarına göre, melanoma, akciğer gibi hücre hatlarında inaktif oldukları ile ilgili çalışmalar yayınlamışlardır [Pubmed compound, 2013]. Trachyolabone diterpeninin ise insan promiyelositik lösemi hücrelerinde kaspaz 3 aktivitesine bağlı olarak apoptozu indükledikleri belirlenmiştir [Block vd., 2005]. Çalışmamızda belirlenen trachylobane, kaur-16-ene, manool ve abiatetriene diterpen moleküllerin, *Stachys rupestris* bitki uçucu yağında önemli bir sinerjistik veya antagonistik etki oluşturabileceğini söyleyebiliriz. Çünkü, özellikle manool (%23,13) ve abiatetriene (%15,22) *Stachys rupestris* bitkisinde yüksek oranda bulunmuştur. Bitki uçucu yağının genotoksik ya da antigenotoksik potansiyeli, tek tek bileşenlerinin değil, içeriğindeki yüzlerce farklı bileşenin etkileşiminin sonucu olduğunu görmekteyiz. *Stachys rupestris* bitkisinin olası antimutajenitesi ise, bu bileşenlerin aralarında olan interaksiyonlar nedeniyle oluşmaktadır.

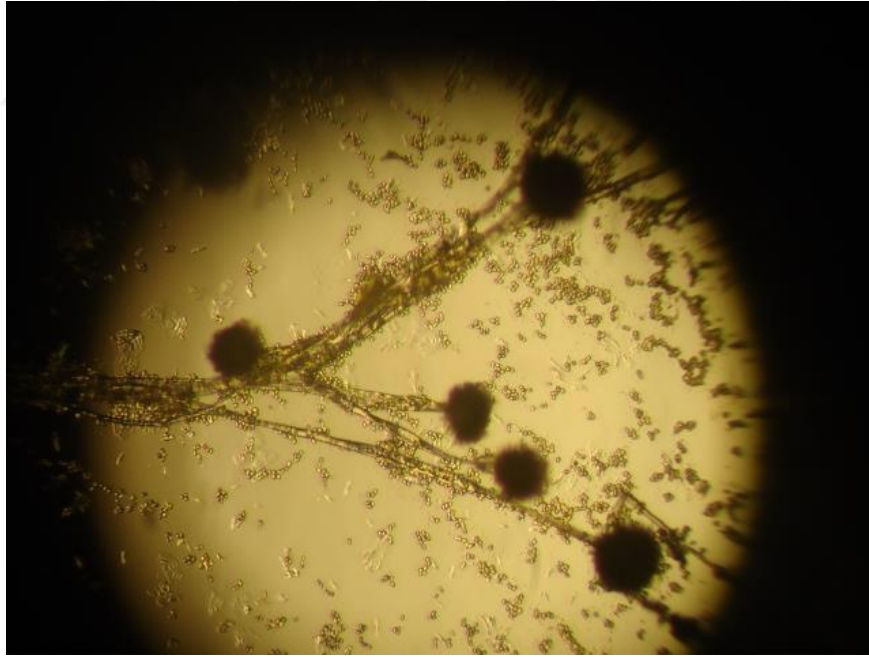
4.7. *Neurospora crassa* MUTAJENİTE Test Bulguları

N. crassa test sisteminde kullandığımız N23 ve N24 suşları Şekil 4.12'de gösterilmektedir. Fries besi ortamında gelişen suşlardan eküvyon çubuğuyla alınan konidialar, materyal-metod kısmında anlatıldığı yöntemle sporların (konidiaların) hiflerden ayrıldığı bir takım işlemlerden geçirilerek Neubauer lamında spor sayımları yapılmıştır. N23 ve N24 suşları ile hazırlanan spor çözeltisi (Şekil 4.13), mililitresinde 2×10^7 spor olacak şekilde hazırlanmıştır.

Bu işlem her deney öncesi tekrarlanmıştır.



Şekil 4.12. *Neurospora crassa* N23 ve N24 suşları.



Şekil 4.13. *Neurospora crassa* konidialarının mikroskop görüntüsü.

N. crassa ileri mutasyon testinde konidialarıyla hiflerin ayrılması işlemi oldukça önemlidir. Çünkü, yapılan çalışmalar, küf konidiaları ile vejetatif formlarının farklı sonuçlar verebileceğini ortaya koymaktadır. Küfün vejetatif formunda farklı enzimleri aktif olacağından, bileşenleri mutajenik metabolitlerine dönüştürebileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, konidialar ile

çalışılırken ortama S9 metabolik enzimleri konarak da çalışmalar yapılabilir [Matzinger ve Ong, 1976]. Sodyum azide bileşeninin *Neurospora crassa* ad-3 ve Ames test mutasyon analizinde pH 3-8 değişimine bağlı olarak geri dönen koloniler karşılaştırılmıştır. Ph değeri azaldıkça sodyum azid bileşeninin konidialardaki ad-3 etkileşimi azalmakta, buna bağlı olarak geri dönenlerin sayısı azalmaktadır. Ph 3'te konidiaların stoplazmik faaliyeti durmakta, ad-3 geri dönüşümü gerçekleşmemektedir. Oysaki, Prokaryotik hücrede pH değişimi Ames testi ile geri dönen *Salmonella typhimurium* sayısını etkilememiştir. Tüm pH seviyelerinde mutasyonlar belirlenebilmiştir [Tomlinson vd., 1980]. *N. crassa* geri mutasyon testi ile, bazı antischistosomal ilaçların mutajenitesi araştırılmıştır. *N. crassa* suşunda spesifik ad-3 lokusunun Lucanthone, hycanthone, niridozole ve indazole analoglarına karşı oldukça hassas oldukları belirlenmiştir. Yapılan çalışmada konidial süspansiyonlarla muamele edilen bu mutajen ilaçların, besiyerinde kullanılmaları vejetatif kültürde mutasyonu 50 kat arttırdığı gözlenmiştir. Bu durum, metabolik aktivasyondan sonra mutajenitenin arttığını göstermektedir [Ong ve De Serres, 1975].

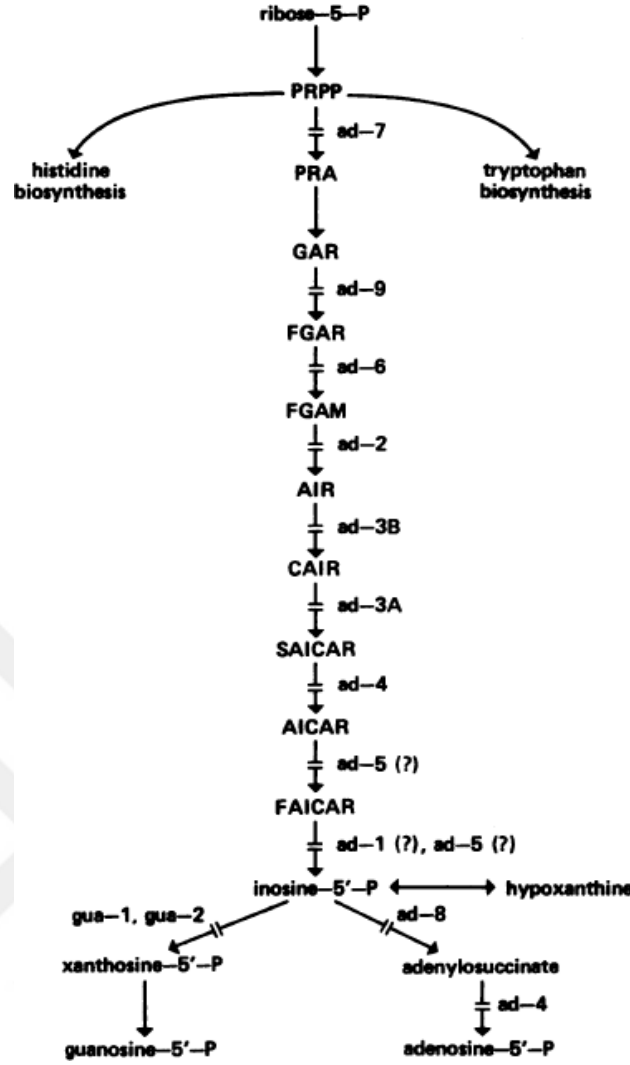
Çalışmamızda S9 metabolik enzimleri kullanmadan sadece konidialar ile çalışılmıştır. Fungusların sitokrom P-450 sistemlerine sahip olması nedeniyle dışarıdan metabolik aktivasyon eklenmesine gerek yoktur [Callen ve Phillot, 1977]. Çalışmamızda inkübasyon süresi kısa tutularak 3 günlük sonuçlar değerlendirilmiştir. Fungusların gelişim sürecinde bazı biyokimyasal enzimleri ürettikleri için konidiaların henüz hif başlangıç evresinde çalışılmaya özen gösterilmiştir.

N. crassa, yedi kromozoma sahip, haploid yaşam döngüsü ile genetik çalışmalarda eşsiz bir model organizma olarak bilinmektedir. Yaşam döngüsünün çok kısa bir evresinde iki spor arasında oluşan füzyon, kısa bir diploid evre geçirmesine neden olur. Ancak, bu evrede oluşan mayoz ile yeniden haploid sporlar oluşur. (Raju, 2009). Aseksüel yaşam döngüsünün ilk basamağını makrokonidia oluşturur ve ilk vejetatif hifini oluşturur. Ana gövdeden sayısız hif uzayarak ve dallanarak havasal hifler ve miselyumlar oluşur. Hifin yapısında bol miktarda karetenoid pigmenti bulunur. Fotoindüksiyondan sorumlu bu pigmentler, *Neurospora crassa* hif büyümesi için hayati öneme sahiptir. Yapılan çalışmalar, cyclic adenosine 3',5'-mono-phosphate (cyclic AMP) ile pigmentasyon arasında güçlü bir paralel ilişki olduğunu göstermiştir. *Neurospora crassa* besi ortamında siklik AMP değişiminin hifin uzamasını ve konia oluşumunu etkileyen temel molekül olduğu belirtilmiştir. Besi ortamında adenin eksikliği *Neurospora crassa* sporlarının oluşumunu ve gelişimini olumsuz etkilemekte, besiyerinde renksiz koloniler gözle görülebilmektedir [Terenzi, 1976; Kritsky vd., 1982]. Çalışmamızda renksiz kolonilerin görüldüğü *N. crassa* kültürü Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Adeninsiz ortamda *N. crassa* suşunun morfolojik görüntüsü.

Adenin varlığının hif oluşumunda ve gen ekspresyonunda önemli oluşu, *Neurospora*'da oluşturulan ad-3A ve ad-3B mutasyonu ile genotoksik çalışmaların temelini oluşturur. *Neurospora crassa* kromozomunda ad-3A ve ad-3B lokusları ayrı bölgelerde bulunur (Şekil 4.15). Oksotrofik ad-3 mutantları adeninin çok az bulunduğu ortamda, kırmızımsı veya turuncumsu renkte pigment oluşumlarıyla karakterize edilir. *Neurospora crassa* kromozomlarında oluşturulan bir çok mutasyon ile rahatlıkla genetik çalışmalar yapılabilmektedir. Pürin sentez basamağında kromozom lokuslarda oluşturulmuş UV-orjinli mutasyonlar ile hem ileri hemde geri mutasyonlar ölçülebilir [Perkins ve Davis, 1982]. N23 suşunda baz çifti değişimine neden olabilen mutajenler belirlenebilirken, N24 suşunda çerçeve kayması mutasyonuna neden olan mutajenler belirlenebilmektedir. N23 suşunda oluşturulan mutasyon, karotenoid protein sentezinde sitozin yerine timin bazının geçmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu mutasyon iki şekilde açıklanmaktadır; yeni gelen baz, protein dizisine yeni bir aminoasit girişine neden olmayacak şekilde sessiz kalabilir ya da yeni bir aminoasit oluşumuna da neden olabilir. N24 suşunda oluşturulan mutasyon sitozin delesyonu ile sonuçlanan çerçeve kayma mutasyonuna neden olmaktadır. Bu değişiklik, okuma esnasında üçlü kodonların kaymasıyla sonuçlanır. Mutasyon, bütün aminoasit dizisini kaydırır ve farklı aminoasit dizilimine neden olmaktadır [Hatakeyama, 2013].



Şekil 4.15. Adenin biyosentez yolu (Perkins ve Davis, 1982).

Çalışmamızda nokta mutasyon testi ile uçucu yağların 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06 ve 0.03 mg/ml konsantrasyonlarındaki durumları araştırılmıştır. Mutajen ajanın belirlenmesinde nokta mutasyon testi çok sağlıklı sonuçlar vermediğinden, süspansiyon testine göre geri dönenlerin sayıldığı koloni sayma metoduna geçilmiştir. Ancak, nokta mutasyon testi ile uçucu yağların çalıştığımız konsantrasyonlarda sitotoksiteleri hakkında ön bilgiler elde edilmiştir. Çalışmanın devamında süspansiyon testinin daha güvenilir sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Bu nedenle mutajenitenin belirlenmesinde, süspansiyon testine göre geri dönenlerin sayısal verileri istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca nokta ve süspansiyon testi ile içerisinde uçucu yağ çözdüğümüz %10'luk DMSO'nun yalnız başına *Neurospora crassa* üzerinde herhangi bir sitotoksositeye neden olmadığı çalışmanın başlangıcında belirlenmiştir.

Süspansiyon testine göre, geri dönüşüm (revertant) testi ile etkisi araştırılan kimyasal maddenin *N. crassa* mutant suşlarının geriye dönen (ade- ade+) koloni sayılarına etkisi saptanabilmektedir. İnkübasyon sonunda adenin okzotrof halden adenin prototrof hale dönen

kolonilerin sayımı yapılmıştır. Çalışmamızda ortamda S9 fraksiyonu olmadan, sadece *N. crassa* konidialarıyla çalışılmıştır. Sonuçlar ise koloni sayma metoduna göre değerlendirilmiş olup, istatistik analiz t-student testine göre yapılmıştır.

4.7.1. *Neurospora crassa* N23 Suşu Mutajenite Bulguları

Çalışmamızda *Salvia heldreichiana*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, ve *Stachys rupestris* uçucu yağlarının *N. crassa* N23 mutajenik etki potansiyelleri Çizelge 4.12'de gösterilmiştir. Çizelge nokta mutasyonunu tespit edebileceğimiz N23 suşlarının negatif kontrol başına düşen geri dönen kolonilerin sayılarını göstermektedir.

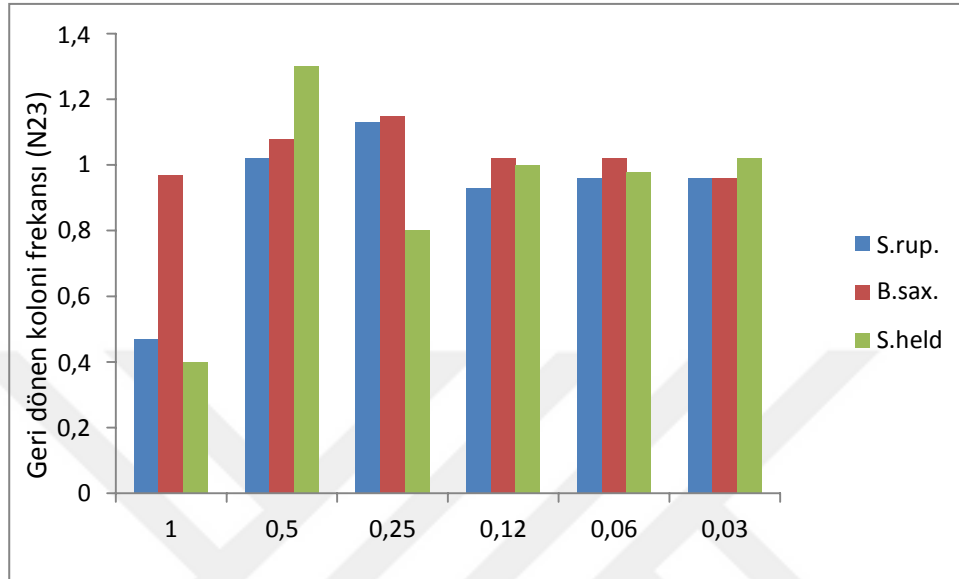
Çizelge 4.12. Süspansiyon testi ile *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* uçucu yağlarının çalışma konsantrasyonlarında *N. crassa* N23 suşunun geri dönen koloni sayıları. Veriler bir deneyin ortalamaları alınarak hesaplandı. Her doz için 5 petri uygulandı. $p \leq 0.01$ farklılıklar anlamlıdır. Ort.koloni: (Geri dönen kolonilerin sayısı/negatif kontrol N23 koloni sayısı)

Kons. mg/ml	<i>B.saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> Ort.koloni ± SD	<i>S. heldreichiana</i> Ort.koloni ± SD	<i>S.rupestris</i> Ort.koloni ± SD
1	0.8 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.82 ± 0.04
0.5	1.2 ± 0.24	1.5 ± 0.28	1.26 ± 0.13
0.25	0.92 ± 0.02	0.98 ± 0.001	1.18 ± 0.06
0.12	0.95 ± 0.05	1.01 ± 0.01	1.17 ± 0.3
0.06	1.05 ± 0.05	0.97 ± 0.06	1.02 ± 0.03
0.03	1.01 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.99 ± 0.05
p(1)	0.001	1.6	0.0004
p(0.5)	0.08	0.01	0.006
p(0.25)	0.008	0.1	0.01
p(0.12)	0.09	0.01	0.092
p(0.06)	0.09	0.139	0.089
p(0.03)	0.08	0.009	0.344

Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitki uçucu yağının çalıştığımız tüm konsantrasyonlarda, geri dönen koloni sayısında bir değişim söz konusu olup, bu değişimi bir mutajenite olarak değerlendiremeyiz. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağının 0.25 mg/ml'den 0.5 mg/ml konsantrasyon artışına bağlı olarak geri dönen koloni sayısında bir artış görülmüştür (Şekil 4.16). Ancak bu artış N23 suşu için olası bir mutasyon varlığını ifade etmemektedir. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu bileşenleri 1 mg/ml konsantrasyonunda N23 suşu üzerinde bir toksik etki oluşturmakta, bunun sonucunda geri dönen koloni sayısı ve kendiliğinden geri dönenlerin sayısı azalmaktadır.

Negatif kontrol başına üreyen kolonilerin sayısındaki bu azalış, *Ballota saxatilis* subsp.

brachyodonta uçucu bileşenlerinin içeriğindeki hidrokarbonlardan kaynaklanmış olabilir. Çünkü *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağının yaklaşık %50 sini hidrokarbonlar oluşturmaktadır. Ya da içeriğindeki yaklaşık %30' unu oluşturan seskiterpen molekülleri veya tüm bileşenlerin etkileşimlerinden oluşmuş olabilir.



Şekil 4.16. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* uçucu yağları çalışma konsantrasyonlarında *N.crassa* N23 suşu ile verdikleri koloni sayılarının negatif kontrole bağlı frekanslarının grafiksel gösterimi. ($p \leq 0.01$).

Çizelge 4.12'ye göre, *Salvia heldreichiana* uçucu yağ bileşenleri *N.crassa* N23 suşu için denenen dozlarında negatif kontrol plağı başına geri dönen kolonilerde önemli bir değişim söz konusudur. Özellikle 0.5 mg/ml'den 1 mg/ml konsantrasyon artışıyla birlikte kendiliğinden geri dönenlerdeki azalış sitotoksiteyi işaret etmekte ancak, sonuçlar t-student testine göre anlamlı bulunmamaktadır ($p \leq 1.6$).

Çizelge 4.12'e göre *Stachys rupestris* uçucu yağı bileşenleri 1, 0.5, 0.25, 0.6, 0.12 ve 0.6 mg/ml ($p \leq 0.01$) konsantrasyonlarındaki değişim uçucu yağının artan konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik olabileceği ancak, çalıştığımız konsantrasyonlarda *N. crassa* N23 suşu için mutajenik olmadığı gösterilmiştir.

Her üç bitki uçucu yağının mutajenite araştırmasında N23 suşu üzerinde olası nokta mutasyonundan söz edemeyiz. Ancak, uçucu yağın her üç bitki için 1 mg/ml üzerinde sitotoksik potansiyeli belirlenmiştir. Diğer alt konsantrasyonlarda ise hücresel tahribata neden olmadığı ve biyokimyasal süreçler ile genotoksik etki oluşturmadığı anlaşılmaktadır.

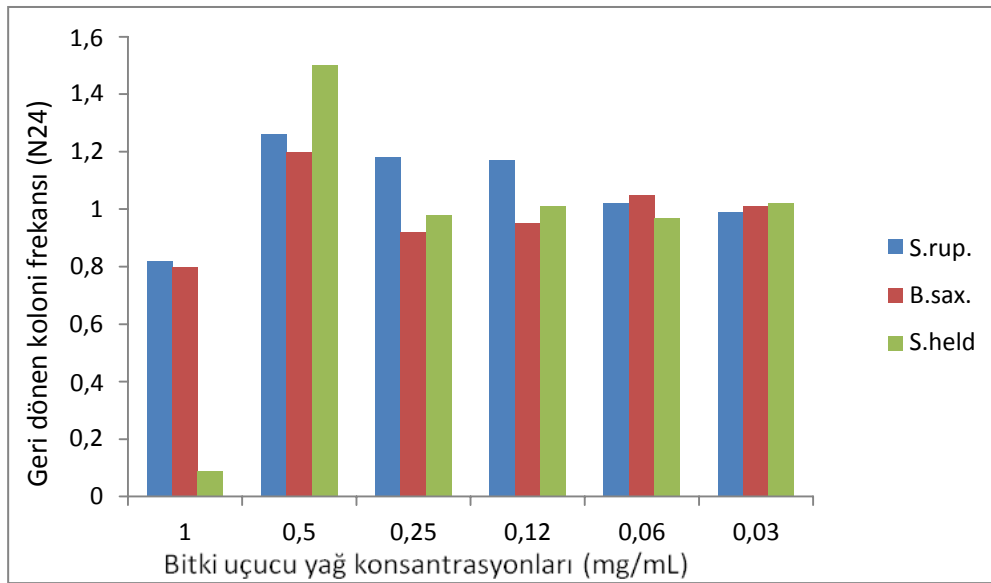
4.7.2. *Neurospora crassa* N24 Suşu Mutajenite Bulguları

Çalışmamızda *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* uçucu yağlarının *N. crassa* N24 suşları üzerine mutajenik etki potansiyelleri Çizelge 4.13'de gösterilmiştir. Çerçeve mutasyonunu belirleyebileceğimiz N24 suşlarının negatif kontrol başına düşen geri dönen kolonilerin sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.13. Süspansiyon testi ile *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* uçucu yağlarının çalışma konsantrasyonlarında *N. crassa* N24 suşunun geri dönen koloni sayıları. Veriler bir deneyin ortalamaları alınarak hesaplandı. Her doz için 5 petri uygulandı. $p \leq 0.01$ farklılıklar anlamlıdır. Ort.koloni: (Geri dönen kolonilerin sayısı/negatif kontrol N24 koloni sayısı)

Kons. mg/ml	<i>B. saxatilis</i> subsp. <i>brachyodonta</i> Ort.koloni \pm SD	<i>S. heldreichiana</i> Ort.koloni \pm SD	<i>S. rupestris</i> Ort.koloni \pm SD
1	0.97 \pm 0.05	0.4 \pm 0.05	0.47 \pm 0.05
0.5	1.08 \pm 0.05	1.3 \pm 0.24	1.02 \pm 0.1
0.25	1.15 \pm 0.01	0.8 \pm 0.47	1.13 \pm 0.15
0.12	1.02 \pm 0.01	1.00 \pm 0.001	0.93 \pm 0.11
0.06	1.02 \pm 0.02	0.98 \pm 0.08	0.96 \pm 0.11
0.03	0.96 \pm 0.08	1.02 \pm 0.08	0.96 \pm 0.1
p(1)	0.1	1.08	0.001
p(0.5)	0.04	0.01	0.3
p(0.25)	0.05	0.1	0.1
p(0.12)	0.008	0.009	0.1
p(0.06)	0.06	0.3	0.1
p(0.03)	0.18	0.31	0.1

Çizelge 4.13'de ve Şekil 4.16'da görüldüğü gibi *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitki uçucu yağının çalıştığımız tüm konsantrasyonlarda *N. crassa* N24 suşu için bir mutajeniteye ve yüksek bir sitotoksiteye rastlanmamıştır. Uçucu yağın farklı dozlarında, geri dönen koloni sayılarındaki değişim göz ardı edilebilmektedir.

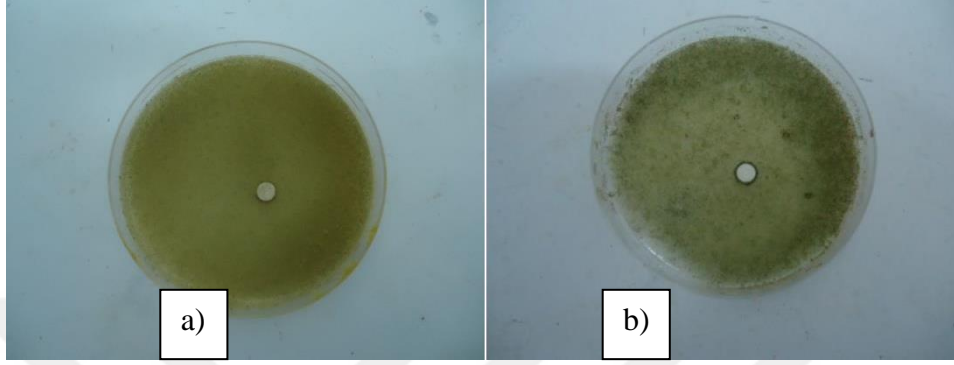


Şekil 4.17. *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* uçucu yağları çalışma konsantrasyonlarında *N.crassa* N24 suşu ile verdikleri koloni sayılarının negatif kontrole bağlı frekanslarının grafiksel gösterimi. ($p \leq 0.01$).

Çizelge 4.13'ye ve Şekil 4.17'ye göre, *Salvia heldreichiana* uçucu yağ bileşenleri *N.crassa* N24 suşu koloni sayısında denenen dozlara bağlı olarak değişimler oluşturmuştur. *Salvia heldreichiana* 1mg/ml konsantrasyonunda kendiliğinden geri dönen koloni sayılarındaki azalış sitotoksositeye işaret etmektedir. Uçucu yağın 0.5 mg/ml konsantrasyonunda negatif kontrol plağı başına geri dönen kolonilerde önemli bir artış söz konusudur. Uçucu yağın 0.25 ve 0.5 mg/ml konsantrasyon arasındaki değişim N24 suşu için olası bir mutasyonu işaret etmektedir. 0.5 mg/ml konsantrasyonunda negatif kontrol plak başına geri dönen koloni sayısı 0.8'den 1.3'e yükselerek 0.625 katlık bir koloni artışı söz konusudur. Ong (1978) makalesine göre *N. crassa* 24 suşları için plak başına 0.5'lik artış mutajen olarak kabul edilmektedir [Ong, 1978]. Bu nedenle *Salvia heldreichiana* 0.5 mg/ml konsantrasyonunda ($p \leq 0.01$) uçucu yağ bileşenleri genotoksik potansiyele sahiptir.

N. crassa suşlarındaki mutajenite, hiflerinde renk değişimine neden olacağından morfolojik olarak gözlenebilmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda kırmızımsı-turuncumsu-morumsu gibi renk değişimlerinin, inkübasyonun devamında gözlemlendiği belirtilmiştir. [De Serres ve Osterbind, 1962; Malling ve De Serres, 1972]. Bizim çalışmamızda uçucu yağın 0.5 mg/ml konsantrasyonunda, küfün 7 günlük inkübasyon süreci sonunda morfolojisi gözlemlenmiştir. Değişim negatif kontrole karşılaştırılmıştır. Değişim Şekil 4.18'de görüldüğü gibi belirgin bir kırmızılaşma görülmemiştir, ancak belirgin olmayan kahverengiye kaçan renk farklılaşması belirlenmiştir. Bu durum sayısal değerlerde olduğu gibi, yüksek sayıda geri dönen kolonilerden kaynaklanmaktadır. Ancak, *N. crassa* küf kültürüne hakim olan koloniler

kendiliğinden geri dönenler olduğundan morfolojik olarak baskın renk yeşil olmaktadır. *Salvia heldreichiana* ile çalışmamızın sonucunda, 0.5 mg/ml *S. heldreichiana* uçucu yağ konsantrasyonunun N24 suşuna karşı zayıf mutajen olduğu şeklinde değerlendirmekteyiz. Çünkü, bir çok çalışma mutajenite çalışmasında N24 suşu için geri dönen koloni artışı 5, 10 hatta daha fazla artışlar belirlenebilmiştir [Ong, 1978; Şen 2005].



Şekil 4.18. *Salvia heldreichiana* uçucu yağının 0.5 mg/ml konsantrasyonunda (a) ve negatif kontrolünün (b) *N. crassa* N24 suşu ile 7 günlük inkübasyon sonucundaki morfolojik görüntüleri.

N. crassa suşunun kullanıldığı N24 mutasyon deneyinde belirlenen zayıf mutajen *Salvia heldreichiana* bitki içeriğinin büyük bir kısmını oluşturan monoterpenlerden kaynaklanmış olabilir. *Salvia heldreichiana* bitkisinin diğer iki bitki içeriğinden farkı yapısındaki monoterpenlerdir. *Stachys rupestris*'te bulunan seskiterpenler ve diterpenler monoterpenlere göre büyük moleküller olduklarından, hücre membranı ya da mitokondriyal membranı etkileyen sitotoksik süreçlere dahil olmuş olabilir. Monoterpenlerin hücre çekirdeği ile hatta DNA ile etkileşimi moleküler büyüklüğüne bağlı olarak daha hızlı ve kolay olabilmış olabilir. Ayrıca *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağında bol miktarda bulunan hidrokarbon bileşenlerinden toluene ve p-xylene bileşenlerinin genotoksik özelliklerinin düşük olduğu bilinmektedir [Chen, 2007].

Mikrobiyolojik genotoksik analizlerde, *Saccharomyces* türleri bir çok kimyasalın taranmasında yaygın olarak kullanılan ökaryotik testlerdendir. *Saccharomyces* türleri *Neurospora crassa*'da olduğu gibi, basit genomik yapısı, yaşam döngüsünün ve kromozom yapılarının iyi bilinmesi ökaryotik araştırmalar için model organizma olarak kullanılmaktadır [Falco ve Dumas, 1985]. Yaşam döngüsünde haploid ve diploid evrelere sahip *Saccharomyces cerevisia* ve *Neurospora crassa* suşlarında olduğu gibi, kromozomlarında oluşturulmuş mutasyonlar bazı kimyasallar tarafından geri döndürülebilmektedir. Bakkali ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış olduğu uçucu yağlarla ilgili genotoksik bir araştırmada, içeriğinin %50'sini 1,8-cineole monoterpeninin oluşturduğu *Cinnamomum camphora* ve %68'nin linalool oluşturan

Origanum compactum bitkilerinde *S. cerevisiae* D7 suşu üzerinde nükleer mutajenite oluşturmadaıkları tespit edilmiştir. Uçucu yağların daha çok mitekondri DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir. Diploid *S. cerevisiae* D7 mutant suşu ile nokta mutasyonları, mitotik intragenik rekombinasyon (gen değişimi) ve intergenik rekombinasyon (crossing over) mutasyonları tespit edilebilmektedir [Bakkali vd., 2005]. Uçucu yağ içerikleri, terpinen-4-ol, borneol, camphor, linalool, 1,8-cineole, murulene, naphthalene, beta- caryophyllene, cadinol terpen ve terpenoidlerince zengin *Ocimum basilicum* ve linalool monoterpini ile ilgili bakteriyel ve fungal mutasyon testi yapılmıştır. Uçucu yağ ve linalool UV-indüklenmiş *E.coli* K12 mutant suşları üzerinde antimutajen etki göstermiştir. Bakterilerde toksik olmayan konsantrasyonlarda oluşan antimutajenik etki mekanizmasının, uçucu yağ ve linaloolün, hücrede protein sentezinin ve proliferasyonun inhibisyonu şeklindedir. Buna karşılık uçucu yağın ve linaloolün koruyucu etkisi mayalarda oksidatif mutajenleri sınırlama şeklinde olduğu belirtilmiştir. Yüksek organizasyonlu ökaryotlarda, *Ocimum* türlerinin antioksidan enzimlerini (glutatyon redüktaz, süperoksid dismutaz, katalaz) indüklediği ve kanserle ilişkili olan faz I enzimlerini inhibe ettiği şeklinde açıklanmıştır [Stanojevic vd., 2008]. *Ocimum basilicum* temel bileşenleri ile benzer içeriği sahip, terpinen-4- ol, borneol, camphor, linalool, 1,8-cineole, murulene, naphthalene, beta- caryophyllene, cadinol terpen ve terpenoidlerince zengin *Salvia heldreichiana* uçucu yağının *N.crassa* N23 suşunda mutajenitesi yokken, N24 suçunda ise zayıf mutajen belirlenmiştir. *Ocimum basilicum* türlerinin *Saccharomyces* mutasyon analizinde mutajeniteye neden olmayışı bizim *N. crassa* analizleri ile benzerlik göstermektedir. Daha önce prokaryotik mutasyon testi olan *Umu*-testi ile de olası antimutajenite belirlenmişti.

Salvia heldreichiana bitkisinde tespit ettiğimiz beta-pinene bileşeni (%33.73) bitkinin temel bileşenini oluşturmaktadır. *Salvia heldreichiana* bitkisi ile yapmış olduğumuz çalışmada belirlenen antimikrobiyal ve non-mutajenik etkiden sorumlu bileşen, bulunma miktarından dolayı beta-pinene olabilir. İlaç hammadde bileşenlerinin biyolojik analizi ile ilgili verileri depolayan Pubmed internet sitesi, beta-pinene (pseudopinene) monoterpininin bir çok biyolojik özelliğini yayınlamıştır. Maya suşları ile yapılan ilaç taramalarında antikanser özelliğinin inaktif olduğunu gösteren bir çok çalışma vardır [Beta pinene, pubchem, 2013]

In vivo memeli sistemlerde *Salvia officinalis* (sage) bitkisinin terpenoid fraksiyonlarının antimutajenitesi test edilmiştir. Sitotoksik olmayan konsantrasyonda (25 µL/kg), sage, fareler de kromozomal anomaliye neden olan mitomycin mutajeninin mutajenik etkisini düşürdüğü belirlenmiştir. Antimutajenik etkiye sahip olduğu belirlenen *S. officinalis* uçucu yağının mutagenesis ve karsinogenesis inhibitörü olarak kullanılabileceği önerilmiştir. Ayrıca, bileşenleri Beta-pinene, myrcene, 1,8-cineole, caryophyllene, δ-cadinene, camphor, γ-murulene [Vujosevic ve Blagojevic, 2004] gibi bileşenler, çalışmış olduğumuz *Salvia heldreichiana* uçucu yağ içeriği ile aynıdır. Bu durum, *Salvia heldreichiana* uçucu yağının antimutajenik

araştırmalarının genişletilmesi gerektiğine işaret etmektedir. Benzer bir çalışmada, *S. officinalis* uçucu yağının albino fareler ile yapılan mikronükleus ve comet genotoksik testleri ile belirli dozlarda methyl parathion mutajen insektisitinin sebep olduğu DNA hasarını azalttığı ve genler üzerinde genkoruyucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Her iki çalışma da *S. officinalis* uçucu yağının günlük gıdalarla alınımında, vücudumuzu çevresel toksik maddelerden ve kronik hastalıklardan koruduğunu göstermiştir [Mathew ve Troppil, 2012].

Alpha-pinene bileşeni *Stachys rupestris* (%8.20) ve *Salvia heldreichiana* (%6.26) bitkisinde yüksek miktarda bulunan bir monoterpendir. Terapötik uygulamalarda önemli bir yeri olan Alpha-pinene, metastatik Melanom (deri kanseri) hücreleri üzerinde, apoptotik süreci kanserin erken evresinde başlatarak tümör hücre çoğalmasını engellemektedir. Bu bileşen, mitekondriyal membran potansiyelinin permeabilitesinde hızlı bir azalmaya neden olmaktadır. Mitekondriyal membranda başlayan tahribat, reaktif oksijen türlerinin üretiminin artmasına, apoptotik süreçte kromatin agregasyonundan ve DNA fragmentasyonuna neden olan kaspaz 3 aktivitesinin artmasına neden olduğu belirlenmiştir [Matsuo vd., 2011]. Ayrıca, alpha-pinene bileşeninin mutajen olmadığı Ames (*Salmonella typhimurium*) testi belirlenmiştir. Aynı çalışmada, beta-myrcene ve alpha-terpinene uçucu bileşenlerinin de mutajen olmadığı gösterilmiştir [Gomes-Carneiro vd., 2005]. *Salvia mirzayanii* bitkisinden izole edilen spathulenol monoterpeni tıpkı alpha-pinene molekülü gibi ökaryotik hücrelerde apoptoza neden olduğu belirlenmiştir. Ancak alpha-pinene molekülünden farklı olarak apoptotik süreci kaspaz 3 aktivitesine bağlı olmadan farklı bir yoldan ilerlettiği belirlenmiştir. Çünkü, çalışmada, hücre proliferasyonunun bloke edilme sürecinde kaspaz 3 artışı belirlenmemiştir [Ziaei, 2011]. *Stachys rupestris* ve *Salvia heldreichiana* bitkilerinde sırasıyla %6.16 ve %5.23 oranlarında tespit ettiğimiz spathulenol bileşeninin yüksek biyolojik aktivitesi ve hücre içerisindeki biyokimyasal mekanizması araştırılmaya değerdir.

Stachys rupestris bitkisinde tespit ettiğimiz manool ve abietatriene diterpeninin sırasıyla %23.13 ve %15.22 oranlarında bulunmaktadır. Yüksek oranda belirlenen bu diterpenlerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili oldukça az veri vardır. Farelerde lösemili hücre hatlarında herhangi bir antikanser aktivite belirlenmemiştir. Benzer şekilde, abietatriene diterpeni de insan tümörü hücre hatlarında antikanser özelliğinin inaktif olduğu bulunmuştur [Caryophyllene, Pubchem, 2013].

Stachys petrokosmos yapraklarından hazırlanan metanol ekstraktının insan lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik etki oluşturmadığı ancak, kanser tedavisinde kullanılan cytophosphane ilacının genotoksik etkisini azalttığı belirlenmiştir [Rencuzogullari, 2012].

Genetik değişiklikler ve kanser arasındaki paralel ilişkinin varlığı birçok mutajenite çalışmaları ile desteklenmektedir. Gamet hücrelerinde veya somatik hücrelerde oluşabilecek mutasyonlar ve bu mutasyonların birikmesi ile kanserli hücre oluşabilmektedir. Normal bir

hücreden kanserli bir hücreye geçişte, hücre siklusunun düzenlenmesi, apoptozis, hücre farklılaşması ve daha birçok hücre fonksiyonunu etkileyen spesifik mutasyon gereklidir. Kansere yalnızca, bir hücrede farklı genlerde birden çok mutasyon olursa ortaya çıkan bir hastalıktır. DNA onarımındaki hatalar da genetik kararsızlığa neden olurlar ve kanseri çoğu da tamir edilmemiş DNA hasarlarından ortaya çıkarlar. DNA onarım sistemindeki bozukluklar, bu işlemlerde görevli enzimlerdeki deformasyon kanserin kalıtsal türleriyle ilişkilidir. Örneğin, kolorektal kanser mutasyona bağlı, baz çıkarma onarımındaki bir bozukluktan, hatalı eşleşmenin onarımındaki bozukluktan ise non-polipozal kolorektal kanser meydana gelir. Kansere tedavisinde, kanser hücrelerinin hayatta kalma oranını düşürmek amacıyla, iyonize radyasyon ve birçok anti-kanser ilaç DNA çift zincir kırıklarının onarımında görev alan proteinlerin inaktivasyonu veya ekspresyonlarının azaltılması şeklinde bir yaklaşım kullanılmaktadır. Çünkü, bu kırıkların onarımı hücrenin genomik kararlılığının sürdürülmesinde ve hücrelerin hayatta kalmasında kritik bir öneme sahiptir [Bütüner ve Kantarcı, 2006]. Çalışmamızda *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* bitkinin mutajen etkilerinin belirlenmemesi, genetik hastalıkların araştırılmasında birer hammadde olabilirler. Çünkü, özellikle kanser araştırmalarında, tümör engelleyici ilaçların, normal hücrelere de zarar vermesi, dokuya özgü çalışmayı zorunlu hale getirmiştir. Bu nedenle genetik hastalıkların tedavisinde sağlıklı dokulara zarar vermeyen, ancak mutant dokuyu hedef alan ilaçlar bu anlamda çok önemlidir. Uçucu yağlar ve içerikleri ile ilgili bir çok araştırma onların mutasyon kaynaklı hastalıkların araştırılmasında hammadde olması gerektiğini savunmaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma antimikrobiyal, mutajenik ya da antimutajenik etkili olabileceği düşünülen Lamiaceae familyasından endemik *Salvia heldreichiana*, *Stachys rupestris* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağlarının içerikleri ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır.

Çeşitli bitkilerden ekstrakte edilen esansiyel yağların geleneksel tıpta ve endüstriyel alanda kullanımları çok yaygındır. Tüketimi çoğu kez bilinçsiz ve kontrolsüz yapılan uçucu yağların biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Çoğunlukla antimikrobiyal araştırmaların yapıldığı bu bileşiklerin genotoksik ve antimutajenik aktiviteleri hakkında yeterli bilgiye sahip değiliz. Bu çalışma bize hem antimikrobiyal etki hem de genotoksik etkiler sonucunda mikrobiyal hücreler ve uçucu bileşenler arasındaki etkileşimleri anlamamıza katkı sağlamıştır. Birkaç yıldır uçucu yağların antimikrobiyal etkisinin hücre zarı ile ilişkilendirildiği çalışmalar daha çok ön plandadır. Ancak, henüz bu hipotez tam anlamıyla netlik kazanmamıştır. Çünkü, uçucu yağ içerisinde bulunan yüzlerce bileşen ve etkileşimleri hücrede, sadece hücre zarında etkindir demek, yetersiz bir açıklamadır. Bunun nedeni ise, uçucu yağların her bir bileşeninin saf olarak çalışıldığı ve bazı bileşenlerin DNA ile etkileşim içerisinde olduğunu belirten çalışmalar olmasındandır.

Çalışmamızın başlangıç aşamasını oluşturan antimikrobiyal etki değerlendirmesinde, daha önceki çalışmalarla paralel sonuçlar alınmış ve uçucu yağların belirli organizmalara spesifik etki gösterdiği tespit edilmiştir. *Stachys rupestris* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı benzer bir etki gösterirken, *Salvia heldreichiana* Gram pozitiflere karşı daha düşük seviyede bir antimikrobiyal etkiye sahiptir. Bu farklılık *Salvia heldreichiana* uçucu bileşenlerinde bulunan ve diğer iki bitkide bulunmayan bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Yaptığımız analizde, *Salvia heldreichiana* uçucu yağının monoterpen bileşenleri bakımından zengin olması, düşük antimikrobiyal etkinin bu bileşenlerden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Orhan ve çalışma ekibi, genel olarak uçucu yağda gözlediğimiz antimikrobiyal etkinin zayıf ya da güçlü olmasının bu bileşenler arasında oluşan sinerjik veya antagonistik etkiden kaynaklanabildiklerini belirtmişlerdir [Orhan vd., 2012].

Her üç bitkinin toplamını değerlendirdiğimizde ise, uçucu yağların Gram negatif, Gram pozitiflere ve mayalara karşı etkin olduğu görülmektedir. Bu etki Gram negatif ve mayalara göre, Gram pozitiflerde daha düşük seviyededir. Gram pozitiflerin uçucu yağlara karşı daha dirençli olması Gram negatif bakteriler ile Gram pozitif bakteriler arasındaki hücre duvar yapısındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Gram pozitif bakterilerdeki kalın peptidoglikan yapı hidrofobik bileşiklere karşı bir bariyer oluşturmaktadır [Puupponen-Pimia vd., 2001; Sikkema vd., 1995].

Uçucu yağların antimikrobiyal mekanizmalarıyla ilgili en geçerli teori, terpenlerin hidrofobik özelliğine bağlı olarak hücrelerin fizikokimyasal bütünlüğünü bozmasıdır. Terpenlerin, mikroorganizma hücre duvarındaki lipitler ile interaksyonu, lipitlerin bir arada toplanmasına ve zarın geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Uçucu yağ içerisindeki küçük moleküllerden, büyük moleküllere kadar tüm bileşenlerin ayrı ayrı etkileri olabileceği gibi birbirleri ile olan etkileşimleri de bu etkiyi azaltıp çoğaltabilmektedir. Hücreden geçişte meydana gelebilecek tüm biyokimyasal ve fizyolojik etkileşimler hücrede proton hareketi elektron akışının ve dolayısıyla taşınımın aksamasına, sonuçta da hücre içeriğinin koagülasyonuna ve uçucu yağların içerisindeki onlarca maddenin oluşturduğu zincirleme hücre reaksiyonları artan konsantrasyona da bağlı olarak hücre tahribatına neden olabilecektir. Antimikrobiyal bileşenlerin aynı zamanda hücre duvarındaki proteinlerle [Silva ve Fernandes, 2010] ve fosfolipid yapıyla da direk olarak etkileşim içinde olabilmektedirler. (+)-Totarol diterpenoidin yapay fosfolipidlerle interaksyonu tespit edilmiştir. Yapay fosfolipit molekülü ile belirli oranlarda uçucu bileşen karıştırılmış ve totarol membran karışımının fiziksel değişimi gözlenmiştir. Diterpenin konsantrasyonuna bağlı olarak fosfolipid molekülünün stokiyometrik yapısında farklılıklar oluşturduğu belirtilmiştir [Micol vd., 2001].

Çalışmış olduğumuz *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* bitkilerinde tespit ettiğimiz α -pinene, β -pinene, terpinolene gibi monoterpenler sislik hidrokarbonlardır. Konsantrasyonlarına bağlı olarak bakteriler üzerine inhibisyon etkileri bilinmektedir. Ökaryotik bir hücre olan *Saccharomyces cerevisiae* ve fare karaciğer mitekondrial sistemde yapılan çalışmalara dayanarak β -pinene sislik hidrokarbon molekülünün sitotoksik mekanizması, mitekondri elektron zincirindeki *sitokrom b* bölgesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Direk olarak solunum sistemiyle ilişkili olduğu tespit edilen β -pinene terpeni mitekondri zarlarında proton ve potasyum iyon translokasyonunu inhibe etmektedir. ATPaz aktivitesine etki etmemektedir. Konsantrasyona bağlı olarak potasyum iyon geçişini bloke ettiği, elektron akışının tahribatına neden olduğu ve sonuçta solunumun durmasına neden olduğu belirtilmiştir [Sikkema vd., 1995].

α -pinene, camphene, β -pinene, cymene, borneol, α -terpineol gibi çalıştığımız bitkilerde de tespit ettiğimiz terpenlerin hücreler üzerinde fizikokimyasal yapıyı bozdukları bilinmektedir. Örneklemek gerekirse, Lamiaceae familyasına ait olan *Rosmarinus officinalis* uçucu yağının *Propionibacterium acnes* üzerine antimikrobiyal etkisi Atomik Force Mikroskopta morfolojik görüntüleri ile incelenmiştir. Zamana bağlı olarak artan konsantrasyonlarda hücre morfolojisinde nanometrik ölçümler alınmıştır. En düşük konsantrasyonda hücre eninin ve yüksekliğinin genişlediğini, konsantrasyon arttıkça hücrenin hasar gördüğünü ve buna bağlı olarak eninin ve yüksekliğinin küçülerek büzüştüğünü saptamışlardır [Fu vd., 2007].

Özetle, antimikrobiyal etki değerlendirmesinde, hidrokarbonlu bileşiklerin,

seskiterpenlerin ve diterpenlerin prokaryotik ve ökaryotik hücrelere karşı oldukça aktif olduklarını söyleyebiliriz.

Ayrıca, uçucu yağ içerikleri bakımından zengin oldukları belirlenen, *Stachys rupestris*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* ve *Salvia heldreichiana* uçucu yağların mutajen olup olmadıkları araştırılmıştır. Mutajenitenin araştırılması için *Salmonella thyphimurium* TA1535/pSK1002 suşu ile *Umu*-test yöntemi kullanılarak hem metabolik enzimlerin kullanıldığı S9'lu ortamda hem de S9'suz ortamda kullanılmıştır. Her üç bitkinin uçucu yağ genotoksik etki değerlendirmeleri, *Umu*-test ile ilk kez yapılmış ve sonuçta, biyolojik örneklerin *Umu*-testi ile uygulanabilirliğini de ortaya koyulmuştur.

Umu-test *Salmonella* test sistemleri içinde yer alan bakteriyel bir yöntemdir. Bizim laboratuvar çalışmalarımızda olduğu gibi, bir çok ülkenin laboratuvarında da *Umu*-testinin Ames test ile paralel sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Test, Ekoloji ve Biyoloji Enstitüsü'nde (Berlin Üniversitesi, Almanya) yapılan çalışma ile Almanya standartları tarafından kabul görmüştür [Wetting, 2000]. *Umu*-test metodu literatürde daha çok çeşitli kimyasalların, metal tuzlarının ve atık suların mutajenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan bir test sistemidir [Yamamoto, 2001]. Biyolojik örneklerin araştırılmasında bu yöntemin kullanılabilirliği ile ilgili çok az veri bulunmaktadır. Çalışmamızda bitkisel örneklerin *Umu*-test ile taranması, son yıllarda sayısı hızla artan bitki kökenli ürünlerin, ilaçların ya da gıdaların mutajenitelerini tespit edilmesinde, sistemin uygulanabilirliği araştırılmıştır. Bitki uçucu yağlarının *Umu*-test ile değerlendirilmesinde Yamamoto'nun 2001 yılında metal tuzları ile yaptığı çalışmasında, bakterilerin stres koşullarında oluşan SOS cevabına bağlı olarak, β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerlendirme yöntemi dikkate alınmıştır. *Stachys rupestris*, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* ve *Salvia heldreichiana* uçucu yağları ile ilgili olarak çalıştığımız konsantrasyonda herhangi bir mutajenite belirlenmemiştir. Grafikler daha çok uçucu bileşenlerin hücrede toksik etki oluşturduğunu göstermiştir. Çünkü, mutajeniteden sorumlu β -galaktosidaz enzim aktivitesi, belirli bir aşamaya kadar artmakta, ancak bu artış mutajenite olarak değerlendirebileceğimiz kadar 2 ve 3 katlı bir artış olmamaktadır. Her üç bitki için de, metabolik aktivasyon (S9) kullanmadan yapılan çalışmalarda, hemen hemen negatif kontrole eşit absorpsiyon değerleri okunmuştur. Ancak, S9 kullanıldığı deneylerde, enzimsel faaliyetlerin hücredeki uçucu bileşenlerin biyokimyasal etkilerini değiştirebildiğini göstermiştir. Enzimsel faaliyet sonucunda, bir mutajenite gözlenmemiş olsa da, uçucu bileşenlerin karaciğer enzimleri ile biyokimyasal etkileşim sonucunda, olası antimutajenite oluşturabileceklerini görmekteyiz. Açıkça belirtmek gerekirse, S9'lu deneyler sonucunda okunan absorpsiyon değerlerinin negatif kontrolün de altına düştüğünü göstermektedir. Bu durum, normal koşullarda var olan, hiçbir zaman sıfırlanamayacak stress koşullarından kaynaklı olarak oluşan DNA eşleme hatalarının da azaldığını işaret etmektedir. Bunu belkide, DNA onarım sisteminin işleyişini modifiye ederek

yapmaktadır.

Çalışmamızda *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağı S9'lu ortamda bakterinin β -galaktosidaz aktivitesinde değişimlere neden olsa da negatif kontrole oldukça yakın değerler elde edilmiştir. Bu durum, hidrokarbon ve monoterpen bakımından zengin *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* bitkisinin prokaryotik hücre testi ile mutajen olmadığını kanıtlamaktadır. Benzer şekilde S9'suz ortamda da herhangi bir mutajenite gerçekleşmemiştir. *Stachys rupestris* ve *Salvia heldreichiana* bitki uçucu yağlarının S9'suz ortamda negatif kontrole eşdeğer sonuçlar, bakteri metabolizmasının uçucu yağı tolere ettiğini göstermektedir. Antimikrobiyal aktivite mekanizmasında hücre zarına entegre olan uçucu yağ bileşenleri, muhtemelen hücre zarında genetik materyale mutajenik bir etkiyle komplike olmadan metabolize olmaktadır. Eğer direk olarak DNA yapısında genotoksik olsa idi, bakteri genomunda SOS gen bölgesinin aktivasyonunu etkileyecek ve biz bunu çalışmamızda beta-galaktosidaz aktivitesindeki konsantrasyonlara bağlı farklılıklar şeklinde görebilecektik. Oysaki çalışmamızda antimikrobiyal aktivite konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyon noktaları seçilmiş olmasına rağmen genom üzerinde stres gen bölgelerinde büyük bir etki oluşturamamışlardır. S9'suz ortamda her üç bitkinin de genotoksik potansiyeli, Lamiaceae bitkilerinin hücreler üzerindeki yatıştırıcı karakteristik özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir. Martino ve arkadaşları, Lamiaceae familyasına ait birçok bitkinin Ames mutasyon testi ile mutajenik aktivitelerinin olmadığını belirlemişlerdir [De Martino vd., 2009]. Bitki uçucu yağlarının (S9) metabolik aktivasyon sonrası ortaya çıkan β -galaktosidaz aktivite değerleri ise S9'suz koşullara göre daha değişkendir. Bu durum uçucu yağın hücre zarından geçtikten sonra bir dizi biyokimyasal süreç tabii olduğunu ve oluşan metabolitlerin ise hücrede genotoksik potansiyel oluşturabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda her üç bitki uçucu yağı S9 ile birlikte bakterilerle inkübe edildiğinde β -galaktosidaz enzim aktivitesinde değişimler oluşturmakta, bu durum genotoksik olmamakla birlikte, normal koşullarda hücrenin β -galaktosidaz enzim aktivitesini daha da düşürdüğünü görmekteyiz. Normal koşullarda bakterilerin bir miktarda olsa, SOS mekanizması aktif olacağından, uçucu yağların S9 varlığında oluşturduğu beta galaktosidaz enzim aktivitesinin düşüşü, olası antimutajenite ile açıklanabilir. Normal koşullarda, DNA replikasyon sırasında 10^9 - 10^{10} baz çiftinde bir meydana gelebilecek olası replikasyon hataları her zaman bulunmaktadır [Lüleyap, 2008]. Buna bağlı olarak hiçbir zaman SOS aktivitesi sıfır olmayacaktır. β -galaktosidaz enzim aktivitesinin SOS aktivitesine bağlı enzim aktivitesindeki negatif değerler, dış kaynaklı mutajeniteyi azalttığı, hatta antimutajenik aktivite gösterdiğini önerebiliriz. Çalışmamızla ilgili olarak her üç bitkinin uçucu yağının mutajenitesinden ziyade, olası antimutajenitesi içeriğindeki bileşenlerinin genler üzerinde daha çok koruyucu etki oluşturmasından kaynaklı olabilir. Bu hipotezimizi doğrulayan bazı çalışmalar vardır. Bunlar, Lamiaceae familyasına ait *Salvia* ve *Ocimum* türleridir. İçerik olarak çalıştığımız bitki

içeriklerine benzerlik göstermektedirler. Belirli dozlarda methyl parathion mutajen insektisitinin sebep olduğu DNA *S. officinalis* uçucu yağının albino fareler üzerinde, genotoksiteyi azalttığı gösterilmiş, bu çalışma ile *Salvia officinalis* içeriğinin genler üzerinde genkoruyucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [Mathew, 2012]. Gen koruyucu hipotezinin oluşmasına neden olan bir başka çalışma ise, Lamiaceae familyasına ait *Ocimum* türlerinin uçucu yağının ve bileşenlerinden biri olan linalolün mayalarda koruyucu etkisi olduğu ve mekanizmasının ise oksidatif mutajenleri sınırlama şeklinde olduğu belirtilmiştir. Bitki uçucu yağ bileşenlerimizde hidrokarbonlar, monoterpenler, seskiterpenler ve diterpenler gibi bileşenler bir çok çalışmada ayrı ayrı çalışıldıklarında mutajenik ya da antimutajen etkileri bulunmuştur. Ancak bu bileşenlerin birbirleri ile etkileşimleri hücreler üzerinde etki biçimini değiştirebilmektedir.

Aynı zamanda, uçucu yağlar, yüksek organizasyonlu ökaryotlarda, antioksidan enzimlerini (glutatyon redüktaz, süperoksid dismutaz, katalaz) indüklendiği ve kanserle ilişkili olan faz I enzimlerini inhibe ettiği de açıklanmıştır [Stanojevic vd., 2008].

Bakteriyel hızlı testler yıllardan beridir kimyasal ajanların mutajenitelerin değerlendirilmesinde oldukça avantajlıdır. Ames test hem sentetik kimyasalların hem de bitki bileşenlerinin değerlendirilmesinde çok fazla kullanılan bakteriyel bir hızlı testtir. Bugüne kadar bitki bileşenlerinin mutajeniteleri bu yöntemle belirlenebilmiştir. Ames test, mutant *Salmonella typhimurium* suşu kullanılarak çalışılmaktadır. Histidin aminoasidini sentezleme yeteneğini kaybetmiş *Salmonella typhimurium* suşunun, ortama kimyasal bir ajan verildiğinde yeniden histidin sentezleme yeteneğine sahip olması prensibine dayanır. Nokta mutasyonuna bağlı olarak histidin sentezleyebilen, geri dönen koloniler sayılarak, sonuç negatif kontrole göre değerlendirilir. Ames test, diğer hayvan hücreleri ile yapılan testlere göre kısa zamanda sonuç vermesi ve maliyetinin düşük olması nedeniyle tercih edilir. Ancak son yıllarda geliştirilen ve giderek kullanımı artan *Umu*-test, Ames teste göre daha avantajlı görünmektedir. *Umu*-testte de Ames testte olduğu gibi mutant *Salmonella typhimurium* suşu kullanılmaktadır. Birkaç özel mutasyona sahip *Salmonella typhimurium* histidin mutasyonundan farklı olarak, bakterinin DNA'sında SOS bölgesine yerleştirilmiş β -galaktosidaz genlerinin SOS'a bağlı aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülür. *Umu*-test, Ames teste göre çok daha pratik olmakla birlikte, kısa zamanda hızlı sonuç vermektedir. Ames test ile bir çalışma 3 günlük bir işgücüne dayanırken, *Umu*-test ile yaklaşık 6 saatte sonuç alınabilmektedir. Ayrıca, Ames test sonucunun koloni sayımına göre yapılması, farklı laboratuvarlarda farklı değerlendirmelere neden olabilmektedir. *Umu*-test sonucu spektrofotometrik olarak okunduğundan daha güvenilirdir. Ames test ile yapılan bir çalışma da 200-300 mg örnek miktarı ile çalışılabilirken, *Umu*-test ile 10 mg örnek yeterli olabilmektedir [Ota vd., 2005]. Çalışmamızda, bitki uçucu yağların mutajenitelerinin araştırılmasında, *Umu*-testin kullanılması, bakteriyel yöntemle mutajenite

veya antimutajenite araştırmalarının uygulanabilirliğini göstermiştir.

Çalışmamızın devamında, *Salvia heldreichiana*, *Stachys rupestris* ve *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta* uçucu yağlarının ökaryotik hücrelerde mutasyon analizi yapılmıştır. Bunun için ise seçilen *Neurospora crassa* mutasyon testi ile koloni sayma metodunun avantajı ve dezavantajı araştırılmıştır. *N. crassa* N23 ve N24 mutant suşlarının uçucu yağlar ile geri döndürülebilirliği araştırılmıştır.

Araştırmamızda, *Ballota saxatilis* subsp. *brachyodonta*, *Salvia heldreichiana* ve *Stachys rupestris* bitki uçucu yağlarının ökaryotik *Neurospora* suşları üzerine belirgin bir mutajenite belirlenmemiştir. Sadece monoterpenlerce zengin *Salvia heldreichiana* uçucu bileşenlerin N24 suşunda zayıf mutajen oluşturması, monoterpenlerin genler üzerine etkili olabileceğini göstermiştir. Bitki içeriğini oluşturan maddelerin genotoksik potansiyellerinin düşük oldukları, bu maddelerin birbirleri ile olan sinerjistik etkilerinin mutajeniteyi azatlığını ya da bu maddelerin mutajen olmadıklarını söyleyebiliriz. Bu çalışma mutajen olmayan bu bileşenlerin kanser araştırmalarında, güvenli gıda veya genotoksik olmasını istemediğimiz tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde kullanılabilir ilaç hammaddeleri olabilirler.

Çalışmamızın mutajenik araştırmasında seçilen üç farklı metod (*Umu*, Ames ve *N. crassa* testleri), yapılan in vivo çalışmalara göre, pratik, kolay ve ucuzdur. *Umu*-genotoksite testi, yıllardır kullanılan Ames testinin yerine kullanılabilir kolay bir testtir. Ames testinde koloni sayma metodu, *Umu*-testine göre daha uzun zaman alabileceğinden, *Umu*-genotoksite testi, zaman olarak da bir avantajdır. Bu değerlendirmemiz, Stammati ve ekibinin çalışmaları tarafından da desteklenmektedir. Örnelemek gerekirse; thymol, carvacrol, carvone, cinnamaldehyde uçucu yağ bileşenlerinin genotoksik potansiyellerini kısa-zamanlı mikrobiyal ve memeli test sistemleri ile karşılaştırdıkları çalışmada, Ames test, *E.coli*'de SOS kromotest ve Hep-2 hücrelerinde proliferasyon ve sitotoksisite testlerinin yapıldığı araştırmada otomasyona bağlı testlerin performansının daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca, çalışmada, tüm genotoksik testlerin bitki kimyasallarına karşı yeteri kadar hassas olduklarını ve hücrese seviyede genotoksik etkinin doğru bir biçimde belirlenebileceğini gözlemlemişlerdir [Stammati vd., 1999].

N. crassa testi, Ames testinde olduğu gibi koloni sayma metoduna bağlı kalarak çalışılmaktadır. Deneylerimizde, *N. crassa* ve *Umu*-testini kıyasladığımızda,

N. crassa testi daha az pratiktir. *N. crassa* ökaryotik bir mikroorganizma olmasından kaynaklı olarak, deney 3-5 gün arasında sürebilmektedir.

Araştırmamızda, Ames, *Umu*-test ve *N. crassa* testleri, bitki ekstraktlarının bu yöntemlerle analiz edilebileceğini, onlarca bileşenin aynı zaman diliminde genotoksisitesinin araştırılabileceğini göstermiştir.

Son yıllarda, alternatif tıbbın hızla yaygınlaşması, buna bağlı olarak piyasada hızla artan

bitkisel ürünler ve kontrolsüz satışlar bitkilerin yararlarının yanında zararlarının da sorgulanmasını ortaya çıkarmıştır. Kullanımı yaygınlaşan bu tip drogların biyolojik aktiviteleri ve dozları belirlenmeden kullanılmamalıdır.

Bitkilerin mutajenik özelliklere sahip olmaları onların gıda veya ilaç sektöründe kullanılmadan önce bazı testlere tabi tutulması gerektiği önerilmektedir. Mutajenik özellik, ayrıca antikanser araçlar olarak kullanılabilmesi araştırılmalıdır. Benzer şekilde bitkilerin antimutajenik özelliğe sahip olmaları, terapötik veya farmakolojik alanlarda araştırılması gerekmektedir [Verschaeve ve Staden, 2008].

İlaç, kimya ve gıda endüstrisinde her yıl milyonlarca bileşik piyasaya sürülmektedir. Maruz kaldığımız doğal veya yapay bileşenlerin canlılar üzerindeki etkileri ise antimikrobiyal ve genotoksik araştırmalarla aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Mikrobiyolojik testler hızlı, güvenilir ve ucuz olmaları bu ajanların taranmasında kullanışlı olabilmektedir. Ayrıca, mikrobiyolojik genotoksik araştırmaların, bir üst araştırmalar için oldukça verimli ve geniş ölçekte datalar sunduğu açıktır. Bu nedenle, farmakolojik araştırmalar ya da genetik kaynaklı hastalıkların tedavi araştırmalarının ilk basamağını mikrobiyolojik analizler oluşturmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1]. Adam, K. Sivropoulou, Kokkini, S. Lanaras, T. and Arsenakis, M. -Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against Human Pathogenic Fungi||, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(5): 1739-1745, (1998).
- [2]. Adams P.,-Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry||, 4th Ed., Carol Stream, Illinois, USA., (2007).
- [3]. Ahıskalıoğlu A., -*Anemone narcissiflora* Bitkisinin Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi||, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2 s., (2007).
- [4]. Akin, M. Demirci, B. Bağcı, Y. and Baser, K.H.C. -Antibacterial activity and composition of the essential oils of two endemic *Salvia* sp. from Turkey||, African Journal of Biotechnology, 9(15): 2322-2327, (2010).
- [5]. Aktaş, K. -Bazı Lamiaceae (Labiatae) türleri üzerinde taksonomik bir araştırma||. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s. 20-50, (2001).
- [6]. Amirghofran, Z. Bahmani, M. Azadmehr, A. and Javidnia, K. -Anticancer effects of various Iranian native medicinal plants on human tumor cell lines||, Neoplasma,53: 428-33, (2006)
- [7]. Ames, B.N. Lee, F.D. and Durston, W.E. -An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens||, Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A., 70: 782-786 (1973).
- [8]. Awadh Ali, N.A. Marongiu, B. Piras, A. Porcedda, S. Falconieri, D. Molicotti, P. and Zanetti, S. -Essential oil composition of leaves of *Stachys yemenensis* obtained by supercritical CO₂||, Natural Product research, 24(19): 1823-1829, (2010).
- [9]. Aydin, A. Sener, B. Cakici, I. Turan, N.N. and Erdemoglu, N. -Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts||. Phytotherapy Research, 20: 9-13, (2006)
- [10]. Bağdat, R. B. -The Essential Oil of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Its components and Using Fields||. Journal of Faculty of Agriculture, 21(1): 116-121, (2006).
- [11]. Bakkali, F. Averbeck, S. Averbeck, D. and Idaomar, M. -Biological effects of essential oils- A Review, Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475,(2008).
- [12]. Bakkali, F. Averbeck, S. Averbeck, D. Zhiri, A. Idaomar, M. -Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*||. Mutation Research, 585: 1-13, (2005).
- [13]. Barış A., -Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemek Mutajenitelerinin Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması||, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 10-13s., (2007).
- [14]. Basaran, A.A. Yu, Tian-Wei. Plewa M.J. and Anderson D. -An Investigation of Some Turkish Herbal Medicines in Salmonella typhimurium and in the COMET Assay in Human Lymphocytes||. Teratogenesis- Carcinogenesis, and Mutagenesis, 16: 125-138, (1996).

- [15]. Baser, K.H.C. "Essential oils of *Labiatae* from Turkey Resent Results", *Lamiaceae Newsletter*, 3: 6-11, (1994).
- [16]. Beric, T. Nikolic, B. Stanojevic, J. And Vukovic-Gacic, B. -Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis||. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 724-732, (2008).
- [17]. Beta-pinene, -Compound Summary||,
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary>
- [18]. Beveridge, T. -Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles||, *Journal of Bacteriology*, 181(16): 4725-4733,(1999).
- [19]. Bozin, B. Mimika-Dukic, N. Simin, N. and Anackov, G. -Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils||, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1822-1828, (2006).
- [20]. Bunkova, R. Marova, I. Pokorna, Z. and Lojek, A. -Analysis of Plant Extracts Antimutagenicity Using the Ames Test and the Cytogenic Analysis of Peripheral Blood Lymphocytes||, *Food Science and Technology International*, 11(2): 107-112, (2005).
- [21]. Bütüner, B.D. Kantarcı, G. -Mutasyon , DNA Hasarı ,Onarım Mekanizmaları ve Kanserle İlişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 35(2): 149 - 170, (2006).
- [22]. Caillet, S. Lessard, S. Lamoureux, G. and Lacroix, M. -Umu Test Applied for Screening natural antimutagenic agents||, *Food Chemistry*, 124: 1699-1707, (2011).
- [23]. Callen, D.F. and Phillot, R.M. -Cytochrome P-450 and the activation of promutagens in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mutation Research Journal*, 45: 309-324,(1977).
- [24]. Cardile, V. Russo, A. Formisano, C. Rigano, D. and Senatore, F. -Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from lebanon: chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells||. *Journal of Ethnopharmacology*, 126: 265-272, (2009).
- [25]. Caryophyllene, Pubchem, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary>.
- [26]. Cauladis, M. Chinou, I.B. Tzakou, O. and Loukis, A. -Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Ballota pseudodictamnus* L., Bentham||, *Phytotherapy research*, 16: 723-726, (2002).
- [27]. Cavalcanti, B.C. Costa-lotufo, L.V. Moraes, M.O. Burbano, R.R. Silveira, E.R. Cunha, K.M.A. Rao, V.S.N. Moura, D.J. Rosa, R.M. Henriques, J.A.P. Pessoa,C. -Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil||. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 388-392, (2006).
- [28]. Cellat, K. Gül, S.and S. Everest A.,—Investigation of Essential Oil Composition of *Stachys rupestris* Montbret Et Aucher Ex Bentham from Mersin||, VII.Lokman Hekim Days. Poster Discussion, (2011).
- [29]. Cerit L.S., -Bazı Baharat Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri||, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 20 s., (2008).
- [30]. Chang, S.T. Wang, S.Y. and Kuo, Y.H. -Resources and bioactive substances from Taiwania||. *Journal of Wood Science*, 49: 1-4, (2003).

- [31]. Cheng, A. Lou Y. Mao, Y. Lu, S. Wang, L. and Chen, X. -Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions||. Journal of Integrative Plant Biology, 49: 179-186, (2007).
- [32]. Chavan M.J. Wakte, P.S. Shinde, D.B. -Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark||. Phytomedicine, 17: 149–151, (2010).
- [33]. Chiba, T. Takii, T. Nishimura, K. Yamamoto, Y. Morikawa, H. Abe, C. Onozaki, K. -Synthesis of new sugar derivatives from *Stachys sieboldi* Miq and antibacterial evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Staphylococcus aureus*”. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 17(9): 2487– 2491, (2007).
- [34]. Cimanga, K. Kambu, K. Tona, L. Apers, S. De Bruyne, T. Hermans, N. Totte, J. Pieters, L. Vlietinck, A.J. -Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo||. Journal of Ethnopharmacology, 79: 213–220, (2002).
- [35]. Citoglu, G.S. Çoban, T. Sever, B. and İşcan, M.—Antioxidant properties of *Ballota* species growing in Turkey, Journal of Ethnopharmacology, 92:275-280, (2004)
- [36]. Couladis, M. Chinou, I.B. Tzakou, O. and Loukis, A.—Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Ballota pseudodictamnus* L. Benth||, Phytotherapy Research, 16 : 723-726,(2002)
- [37]. Cowan, M. M. -Plant Products as Antimicrobial Agents||, Clinical Microbiology Reviews,12(4): 564-582, (1999).
- [38]. Çelen, S., -Anadolu Çaprazına Özgü Dört *Thymus* L. (Lamiaceae) Türü Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimleri, Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivite Özellikleri||, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 10 s.,(2011).
- [39]. Çelik, E. ve Çelik, G.Y. -Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri||, Orta Doğu On-line Mikrobiyoloji Dergisi , 5(2): 1-6, (2007).
- [40]. Çökmüş, C., -Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi||, 11. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 70 s., (2010).
- [41]. Dağcı, E.K. ve Dığrak, M. -Bazı Meyve Ekstraktlarının Antibakteriyal ve Antifungal Aktiviteleri||, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2): 1-7, (2005).
- [42]. Davis P.H., Tan K., Mill R.R. Flora of Turkey and The East Aegean Islands (Suppl.) Edinburg University Press, United Kingdom, (1988).
- [43]. Davis, R.H. and Perkins D. D. -A model of model microbes||. Nature Reviews Genetics, 3: 397-403, (2002).
- [44]. De Martino, L. De Feo, and V. Nazzaro, F. -Chemical Composition and in Vitro Antimicrobial and Mutagenic Activities of Seven Lamiaceae Essential Oils||, Molecules, 14(10): 4213-4230,(2009).
- [45]. De Serres, F.J. and Osterbind, R.S. -Estimation of the relative frequencies of X-ray induced viable and recessive lethal mutation in the ad-3 region of *Neurospora crassa*”. Genetics, 47: 793-796, (1962).

- [46]. Demirci, B. Başer, H. C. Yıldız, B. and Bahçecioğlu, Z. -Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp. from Turkey||, Flavour and Fragrance Journal, 18:116–121, (2003).
- [47]. Didry, S. Seidel, V. Dubreuil, L. Tillequin, F. and Bailleul, F.—Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*”, Journal of Ethnopharmacology, 67:197-202, (1999).
- [48]. Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. -Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils||, Journal of Applied Microbiology, 88: 308-316, (2000).
- [49]. Duarte, M.C.T. Figueira, G.M. Sartoratto, A. Rehder, V.L.G. and Delarmelina, C. -Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants||, Journal of Ethnopharmacology, 97: 305-311, (2005).
- [50]. Dulger, G. and Aki, C. -Antimicrobial Activity of the Leaves of endemic *Stachys pseudopinardii* in Turkey||, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 8(4): 371-375, (2009).
- [51]. Durceylan, Z., -Karyofillen Oksit'in *Neurospora crassa* ile Biyotransformasyonunun İncelenmesi||, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 16-19 s., (2007).
- [52]. Durusoy, M. ve Kambur, S. -The Application of the Umu Test System for Screening Mutagenicity of Surface Water||, Turkish Journal of Biochemistry, 28(1): 3-7, (2003).
- [53]. Ebrahimabadi, A.H. Ebrahimabadi, E.H. Djafari-Bidgoli, Z. Kashi, F.J. Mazoochi, A. Batooli,
- [54]. H. -Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran||, Food Chemistry, 119: 452-458, (2010).
- [55]. Edris, A.E. -Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review|| *Phytother. Res.* (in press) Published online in Wiley InterScience, DOI: 10.1002/ptr.2072, (2007).
- [56]. Erdemoğlu, N. Turan, N.N. Cakıcı, I. Sener, B. Aydın, A. -Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts||, Phytotherapy Research, 20(1): 9-13,(2006).
- [57]. Ergene, E., -Bazı 2-Substitue 1 H-Fenetro (9,10-d) İmidazol Bileşiklerinin mutajenik Etkilerinin Araştırılması||, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 5.,(1998).
- [58]. *European Pharmacopoeia*, 5th ed. Council of Europe, 217-218 s.,Strasbourg Cedex, France, 1:(2004).
- [59]. Evandri, M. G. Battinelli, L. Daniele, C. Mastrangelo, S. Bolle, P. And Mazzanti, G. -The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay||. Food and Chemical Toxicology 43: 1381-1387 (2005).
- [60]. Falco, S.C. and Dumas, K.S. -Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl||. Genetics 109: 21-35, (1985).
- [61]. Forster, R. Blowers, S. D. Cinelli, S. Marquardt, H. and Westendorf, J. -Mutagenicity Testing of İmidazoleand Realed Compounds||, Mutation Research, 292: 71 – 79 (1992).
- [62]. Fu, Y. Zu, Y. Chen, L. Efferth, T. Liang, H. Liu, Z. and Liu, W. -Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with Atomic Force

Microscopy||, *Planta Med*, 73:1275-1280, (2007).

[63]. Gomes-Carneiro, M.R Viana, M.E.S. Felzenszwalb, I. and Paumgarten F.J.R. -Evaluation of beta-myrcene, alpha-terpinene, (+) and (-) alpha pinene in Salmonella/microsome assay||, *Food and Chemical Toxicology*, 43 (2):247-252, (2005).

[64]. Goren, A. C. Piozzi, F. Akcicek, E. Kılıç, T. Carıkcı, S. Mozioglu, E. Setzer, W. N. -Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities||. *Phytochemistry Letters*, 4: 448-453, (2011).

[65]. Grujic-Jovanovic, S. Skaltsa, H. D. Marin, P. and Sokovic, M. -Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia||. *Flavour Fragr. J.* 19: 139-144, (2004).

[66]. Gupta, R. L. Vats, V. and Juneja, T. R. -Activation of Tinidazole, an Antiprotozoal Drug to a Mutagen by Mamalian Liver S9||, *Mutation Research*, 371: 195-201 (1996).

[67]. Hacıoğlu, S., -Bazı *Heracleum* L. (Umbelliferae) Taksonlarında Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi||, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 3-6 s., (2006)

[68]. Hamasaki, T. Sato, T. Nagase, H. and Kito H. -The Genotoxicity of Organotin Compounds in Sos Chromotest and Rec – Assay||. *Mutation Research*, 280: 195 – 203, (1992).

[69]. Hanamanthagouda, M.S. Kakkalameeli, S.B. Naik, P.M. and Nagella, P. Seetharamareddy, H.R. and Murthy, H.N. -Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities||. *Food Chemistry*, 118:836-839, (2010).

[70]. Hasdemir, U. -Çoklu ilaç direncinde bakteri hücre duvarı organizasyonu ve aktif pompa sistemlerinin rolü||, *Mikrobiyol Bülteni.* , 41: 309-327,(2007).

[71]. Hatakeyama, Shin. -Mutagen Response and Repair, in *Neurospora: genomics and Molecular Biology* (Edith. Kasbekar Durgadas, McCluskey K), Caister Academic Press., 129-154 s., Norfolk, UK., (2013).

[72]. Hayashi, K. Nagamatsu, T. Ito, M. Hattori, T. and Suzuki, Y. -Acotoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent. Effects of acetoside on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats||. *Japanese Journal of Pharmacology*, 65: 143-51, (1994).

[73]. Haznagy-Radnai, E. Rethy, B. Czige, S. Zupko, I. Weber, E. Martinek, T. Falkay, G. and Mathe, I. -Cytotoxic activities of *Stachys* species||, *Fitoterapia*, 79: 595-597, (2008).

[74]. Hendler, R.W. and Bose, S. -Interconversions among four M-intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle||. *European Journal of Biochemistry*, 270: 3518-3524 (2003).

[75]. Iwu, M.M. Duncan and A.R. Okunji, C.O., -New Antimicrobials of Plant Origin||, J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA.; 457-62, (1999).

[76]. İşcan G., -Umbelliferae familyasına ait bazı bitki türlerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması||, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, Xs., (2002).

[77]. Joshi, R.K. Mujawar, M.H.K. and Kholkute, S.D., -Antimicrobial activity of the extracts of *Craniotome furcata* (Lamiaceae)||, *Journal of Ethnopharmacology*, 128: 703-704, (2010). Kamatou, G.P.P. Viljoen, A.M. Gono-Bwalya, A.B. Van Zyl, R.L. Van Vuuren, S.F. Lourens, A.C.U.

Başer, K.H.C. Demirci, B. Lindsey, K.L. Van Staden, J. and Steenkamp, P. -The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species||, Journal of Ethnopharmacology,102: 382-390,(2005).

[78]. Kamatou GPP. -Indigenous *Salvia* species—an investigation of their pharmacological activities and phytochemistry||. Ph.D. Thesis, University of the Witwatersrand, South Africa, (2006).

[79]. Karioti, A. Bolognesi, L. Vincieri, F.F.and Bilia, A.R. -Analysis of the constituents of aqueous preparations of *Stachys recta* by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS||, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 53(1): 15-23,(2010).

[80]. Khanavi, M. Manayi, A. Lotfi, M. Abbasi, R. Majdzadeh, M. and Ostad, N. -Investigation of Cytotoxic Activity in Four *Stachys* Species from Iran||. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11(2):589-593, 2012.

[81]. Kılıç A. -Bitkisel Kaynaklı Bazı Uçucu Yağ ve Monoterpenlerin Olası Genotoksik Etkilerinin Araştırılması||, Anadolu Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, s.33, (2005).

[82]. Kızılköçü, Ö. -*Salvia cryptantha* Montbret & Auchr Ex. Bentham ve *Salvia pomifera* L. türlerinin metanol, Etanol, ekstraktlarının ve uçucu yağlarının antibakteriyel, antifungal, ve antitüberküloz aktivitelerinin tayini||. Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, s.33, (2007).

[83]. Knezevic-Vukcevic JB, Vukovic-Gacic Branka S, Stevic T, Stanojevic J, Nikolic B, Simic D.-Antimutagenic effect of essential oil of Sage (*Salvia officinalis* L.) and its fractions against UV-induced mutations in bacteria and yeast cells||. Archives of Biology and Technology, 57(3):163-72, (2005).

[84]. Kocabaş, Y.Z. and Karaman, S. -Essential oils of Lamiaceae family from South East Mediterranean Region (Turkey)||, Pakistan Journal of Biological Sciences, 4(10):1221- 1223, (2001).

[85]. Korkmaz, B., -Bazı 2-sübstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi||, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 35 s., (2005).

[86]. Kritsky, M.S. Sokolovsky, V.Y. Belozerskaya, T.A. and Chernysheva, E.K. -Relationship between cyclic AMP level and accumulation of carotenoid pigments in *Neurospora crassa*||, Archives of Microbiology,133(3): 206-208(1982).

[87]. Kukic, J. Petrovic, S.and Niketic, M. -Antioxidant Activity of Four Endemic *Stachys* Taxa||. Biological Pharmaceutical Bulletin. 29(4): 725-729,(2006).

[88]. Kuramsan, W. R. Wakabayashi K. Ogori, A. Tepsuwan, A. Nagao, M. and Sugimura, T. -Mutagenicities of Bangkok and Tokyo River Waters||, Mutation Research., 325: 99- 104 (1994).

[89]. Kurita, S. Kitagawa, E. Kim, C.H. Momose, Y. and Iwahashi, H. -Studies on the antimicrobial mechanisms of capsaicin using yeast DNA microarray Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 66:532-536, (2002).

[90]. Kuzma L, Kalemba D, Rozalski M, Rozalska B, Wieckowska-Szakiel M, Krajewska U, Wysokinska H. -Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil from *Salvia*

sclareae Plants Regenerated in vitro||. *Molecules*, 14: 1438-1447. (2009).

[91]. Laggoune, S. Zeghib, A. Kabouche, A. Kabouche, Z. Maklad, Y.A. Leon, F. Brouard, I. Bermejo, J. Calliste, C.A. and Duroux, J.L. -Components and antioxidant, anti-inflammatory, anti-ulcer and antinociceptive activities of the endemic species *Stachys mialhesi* de Noe||. *Arabian Journal of Chemistry*. 2011. DOI:10.1016/j.arabjc.2011.03.005.

[92]. Lazarvic, J.S. Palic, R.M. Radulovic, N.S. Ristic, N.R. and Stojanovic, G.S. -Chemical composition and screening of the antimicrobial and antioxidative activity of extracts of *Stachys* species||, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(10): 1347-1359,(2010).

[93]. Lazutka, J. R. Mierauskiene, J. Slapsyte, G. Dedonyte, V. -Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha Xpiperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*". *Food and Chemical Toxicology*, 39:485-492, (2001).

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

[95]. Malling H.V. and De Serres F. J. -Genetic characterization of Diethylnitrosamine-induced purple Adenine (ad-3) mutants in *Neurospora crassa*||. *Cancer research*. 32: 1273-1277, (1972).

[96]. Maron, D. R. and Ames, B.N. -Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test||, *Mutation Research*, 113: 173 – 215, (1983).

[97]. Martino, L.D. Feo, V.D. and Nazzaro F. -Chemical composition and *in Vitro* antimicrobial mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils||, *Molecules*, 14: 4213-4230, (2009).

[98]. Mathew, J. and Thoppil, J. E. -Genotoxicity of methyl parathion and antimutagenic activity of *Salvia officinalis* L. (sage) extracts in Swiss albino mice||. *Asian Journal of Pharmaceutical and clinical Research*, 5 (2): 164-170, (2012).

[99]. Matkowski, A. and Piotrowska, M. -Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae||. *Fitoterapia*, 77: 346-53, (2006).

[100]. Matsuo, A.L. Figueiredo, C. R. Arruda, D. C. Pereira, F. V. Borin Scutti, J. A. Tavassos, L. R. Sartorelli, P. and Lago, J. H. G. -Alpha-pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model||. *Biochemical and Biophysical research Communication*, 411: 449- 454, (2011).

[101]. Matzinger, P.K. and Ong, T.M.. -Mutation induction by rodent liver Microsomal Metabolites of Aflatoxins B1 and G1 in *Neurospora crassa*", *Mutation Research*, (37): 27-32. (1976).

[102]. Mc Cann, J. Spingain, N.E. Kobar, J. ve Ames, B.N. -Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with r factor plasmids||. *Proc. National Academic Science*, 72: 979-983, (1975).

[103]. Mezzoug, N. Elhadri, A. Dallouh, A. Amkiss, S. Skali, N. S. Abrini, J. Zhiri, A. Baudoux, D. Diallo, B. El Jaziri, M. and Idaomar, M. -Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents||. *Mutation Research*, 629:100-110, (2007).

- [104]. Micol, V. Mateo, C.R. Shapiro, S. Aranda, F.J. Villalain, J. -Effects of (+)- totarol, a diterpenoid antibacterial agent on phospholipid model membranes||, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1511: 281-290, (2001).
- [105]. Mitic-Culafic D, Zegura B, Nikolic B, Vukovic-Gacic B, Knezevic-Vukcevic J, Filipic M. -Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells||. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1): 260-6, (2009).
- [106]. Miyazawa, M. and Hisama, M. -Suppression of chemical mutagen-induced SOS response by alkylphenols from clove (*Syzygium aromaticum*) in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 *umu* test||. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4019- 4025, (2001).
- [107]. Mohsen, C. Halimeh, M. and Mohsen, N. -Mohammad, K. -Anti-microbial effect of *Stachys schtschegleevii* (Poulk) on some bacterial species (*in vitro*)||, *Daneshvar Medicine*, 14(67): 1-8, (2007).
- [108]. Monzote, L. Stamberg, W. Staniek, K. Gille, L. -Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondrial||, *Toxicology and Applied Pharmacology*|| 240: 337-347, (2009).
- [109]. Mosaddik, M.A. -In vitro cytotoxicity of Tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge against P388 lymphocytic leukemia cells||. *Phytomedicine*. 10: 682-685, (2003). Mumcu, E. -Seydi çayı (Eskişehir) çevresinden toplanan su ve toprak örneklerinden Ames/Salmonella/mutajenite testi ile bor elementinin mutajenitesinin araştırılması||, Anadolu Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, (2005).
- [110]. Murganathan, G. and Pabbithi, S.C. -Antimicrobial Constituents from plants||, *International Research Journal of Pharmacy*, 3(1): 5-9, (2012).
- [111]. Nathalie, D. Yannick, G. Caroline, B. Sandrine, D. Claude, F. Corinne, C. and Pierre-Jacques, F. -Assesment of The Phototoxic Hazard of Some Essential Oils Using Modified 3T3 Neutral Red Uptake Assay||, *Toxicology in Vitro*, 20: 480-489, (2006).
- [112]. Navarre, W.W. and Schneewind, O. -Surface proteins of Gram-Positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope||, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1):174-229, (1999).
- [113]. Nobukawa, T. and Sanukida, S. -Contributions of genotoxic precursors from Tributary Rivers and Swage to the Yodo River in Japan||, *Water Research*, 36: 989 – 995, (2002).
- [114]. Oda, Y. Nakamura, S. Oki, I. Kato, T. and Shinagawa, H. -Evaluation of new system (*Umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens||. *Mutation Research*, 147: 219-229, (1985).
- [115]. Olasupo, N.A. Fitzgerald, D.J. Gasson, M.J. and Narbad, A. -Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia Coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*”. *Letters in Applied Microbiology*, 36:448-451, (2003).
- [116]. Ong, T. and De Serres, F.J. -Mutagenicity of chemical carcinogens in *Neurospora crassa*||, *Cancer Research*, 32: 1890-1893, (1972).
- [117]. Ong, T. M. and De Serres, F.J.—Mutagenic evaluation of antichistosomal drugs and their derivatives in *Neurospora crassa*||, 1(2): 271-279,(1975).

- [118]. Ong, T.M., -Use of the spot, plate and suspension test systems for the detection of the mutagenicity of environmental agents and chemical carcinogens in *Neurospora crassa*", Mutat. Res., 53: 297-308, (1978).
- [119]. Ono, Y. Somiya, I. and Oda, Y. -Identification of a carcinogenic heterocyclic amine in river water||. Water Research, 34(3): 890-894, (2000).
- [120]. Opalchenova, G. and Obreshkova, D. -Comparative studies on the activity of Basil-an Essential Oil From *Ocimum Basilicum* L.-against Multidrug Resistant Clinical Isolates of the Genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods||, Journal of Microbiological Methods, 54: 105-110, (2003).
- [121]. Orhan, İ.E. Özçelik, B. Kartal, M. Kan, Y. -Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components||, Turkish Journal of Biology, 36: 239-246, (2012).
- [122]. Osman A. K. E. -Comparative anatomical and palynological studies on genus *Ballota* (Lamiaceae) from Egypt, Journal of Medicinal Plants Research, 6(47): 5797-5812, (2012).
- [123]. Ota, M. Nakamura, Y. Kitamoto, S. and Morimoto, T. -Alternative methods for the safety evaluation of chemicals||, Sumitomo Chemical Co., Ltd. Environmental Health Science Laboratory, (2005).
- [124]. Özbek T., -Doğu Anadolu tıbbi bitkilerine ait bazı türlerin Ames/Salmonella Mikrozoim testi kullanılarak antimutajenik özelliklerinin saptanması||, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 11-13s., (2006).
- [125]. Özkan G., -Türkiye’de Lamiaceae (Labiatae) familyasına ait baharat veya çeşni olarak kullanılan bazı bitkilerin fenolik bileşenleri ile antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi||, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 4 s., (2007).
- [126]. Panizzi, L. Flamini, G. Cioni, P.L. and Morelli, I. -Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae||, Journal of Ethnopharmacology, 39(3):167-170, (1993).
- [127]. Patenkovic, A. Stamenkovic-Radak, M. Banjanac, T. and Andjelkovic, M. -Antimutagenic effect of sage tea in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*", Food and Chemical Toxicology, 47: 180-183, (2009).
- [128]. Paduch, R. Kandefer-Szerszen, M. Trytek M. and Fiedurek J. -Terpenes: substances useful in human healthcare. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 55: 315-327, (2007).
- [129]. Pelclova, D. Cerna, M. Pastorkova, A. Vrbikova, V. Prochazka, B. Hurychova, D. Dlaskova, Z. Hornychova, M. -Study of the genotoxicity of Toluene||, Archives of Environmental Health, 55:4, 268-273, (2000).
- [130]. Perkins, D. D. and Davis, H. R. -Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses||, Applied and Environmental Microbiology, 66(12): 5107-5109, (2000).
- [131]. Petronilho, S. Maraschin, M. Coimbra, M.A. and Rocha, S.M. -In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.)||, Industrial Crops and Products, 40:1-12, (2012).
- [132]. Petrovic, S. Ristic, M. Milenkovic, M. Kukic, J. Antic-Stankovic, J. Niketic, M. -Composition

and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys plumose* Griseb|| Flavour and Fragrance Journal, 21(2): 250-252, (2006).

[133]. Piozzi, F. and Bruno, M.—Diterpenoids in the essential oils from the genus *Stachys*". Record of Natural Product, 3(3): 120-125, (2009).

[134]. Pişkin Ç., -Lamiaceae familyasına mensup bazı baharat bitkilerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi||, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 10 s., (2007).

[135]. Puupponen-Pimia, R. Nohynek, L. Meier, C. Kahkonen, M. Heinonen, M. Hopia, A. Okman-Caldentey, K.M. -Antimicrobial properties of phenolic compounds from Berries||, Journal of Applied Microbiology. 90: 494-507, (2001).

[136]. Roma-Torres, Teixeira, J.P. Silva, S. Laffon, B. Cunha, L.M Mendez, J. Mayan, O. -Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. Mutation Research, 604: 19-27, (2006).

[137]. Qazan, W.S. -Hypolipidaemic effects of *Ballota undulata* in Rabbits||, Pakistan Journal of Biological Sciences, 11 (8): 1169-1172, (2008).

[138]. Radulovic, N. Lazarevic, J. Ristic, N. Palic, R. -Significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): Essential oil composition of four Balkan *Stachys* species||, Biochemical Systematics Ecology, 35: 196-208, (2007).

[139]. Rencuzogulları, E. Yildiz, A.M. and Büyükleyla, M.—The genotoxic and anti-genotoxic effects of *Stachys petrokosmos* leaf extract in human lymphocytes using microsomal fractions||, Cytotechnology, 64: 83-94, (2012).

[140]. Saeedi, M. Morteza-Semnani, K. Mahdavi, M.R. and Rahimi, F. -Antimicrobial Studies on Extracts of Four Species of *Stachys*||. Indian Journal Pharmaceutical Sciences, 70(3): 403-406, (2008).

[141]. Sacchetti, G. Maietti, S. Muzzoli, M. Scaglianti, M. Manfredini, S. Radice, M. and Bruni, R. -Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods||, Food Chemistry, 91: 621-632, (2005).

[142]. Sarac, N. ve Ugur, A. -Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey||, EurAsian Journal of BioSciences, 4: 28- 37, (2007).

[143]. Savelev, S. Okello, E. Perry, N.S.L. Wilkins, R.M. Perry, E.K. -Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil||, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 75: 661-668, (2003).

[144]. Sefidkon, F. and Mirza M. -Chemical composition of the essential oils of two *Salvia* species from Iran, *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia syriaca* L.||, Flavour and Fragrance Journal, 14: 45-46, (1999).

[145]. Şarer E., Pançalı S. ve Yıldız S., -*Origanum minutiflorum* O.Schwarz et P.H. Davis uçucu yağının bileşimi ve antimikrobiyal aktivitesi||, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 25(1): 29-38, (1996).

[146]. Serbetçi, T. Demirci, B. Güzelce, Ç.B. Kültür, Ş. Ergüven, M. and Başer, K.H.C. -Essential oil composition, antimicrobial and cytotoxic activities of two endemic *Stachys cretica* subspecies

(Lamiaceae) from Turkey||. Natural Product Communications, 5: 1369-74, (2010).

[147]. Shamon, L.A. Pezzuto, J.M. Graves, J.M. Mehta, R.R. Wangcharoentrakul, S. Sangsuwan, R. Chaichana, S. Tuchinda, P. Cleason, P. Reutrakul, V. -Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii*||, Cancer Letters, 112(1): 113-117, (1997).

[148]. Sikkema, j. De Bont, J.A. and Poolman, B. -Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons||, Microbiology and Molecular Biology Rewievs, 59: 201-222, (1995).

[149]. Silva, N.C.C., and Fernandes, J.A. -Biological Properties of Medicinal Plants: A Review of Their Antimicrobial Activity||, The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 16(3): 402-413,(2010).

[150]. Simic, A. Sokovic, M.D. Ristic, M. Grujic-Jovanovic, S. Vukojevic, J.and Marin, P.D. -The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities||, Phytotherapy Research, 18:713-717,(2004).

[151]. Silva, A. C. R. De. Lopes, P. M. Azevedo, M. M. B. De. Costa, D. C. M. Alviano, C. S. Alvino, D. S. -Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers||, Molecules, 17: 6305-6316, (2012).

[152]. Skaltsa, H.D. Demetzos, C. Lazari, D. Sokovic, M. -Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys species* from Greece||, Phytochemistry, 64: 743-752, (2003).

[153]. Solmaz E., -*Lamium purpureum* L. Var. *Purpureum* türünün farklı ekstrelerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi ve aktivitede rol oynayan fenoliklerin belirlenmesi||, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 1-10.s., (2009).

[154]. Sotto A.D. Evandri M.G. and Mazzanti, G. -Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay||, Mutation research, 653(1-2): 130-133, (2008).

[155]. Stammati, A. Bonsi, P. Zucco, F. Moezelaar, R. Alakomi, H. L. Von Wright, A. -Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-term Assays||. Food and Chemical Toxicology, 37(8): 813-823, (1999).

[156]. Stanojevic, J. Beric, T. Opacic, B. Vukovic-Gacic, B. Simic, D. and Knezevic-Vukcevic, J. -The Effect of Essential Oil of Basil (*Ocimum basilicum* L.) on UV-Induced Mutagenesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*||. Archives of Biology Science, Belgrade. 60: 93-102, (2008).

[157]. Şen G., -*Bacillus subtilis* ve *Neurospora crassa* suşları ile Bazı Benzoksazol Türevlerinin Mutajenik Potansiyellerinin Karşılaştırılması||, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 4-6 s., (2005).

[158]. Şenel, Ü., -Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Sentetik Boyarmaddelerin Mutajenik Etkilerinin Umu-Testi ile Araştırılması|| İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, Doktora Tezi, 17-19 s., (2006).

[159]. Tanker, N. İlisulu, F. Koyuncu, M. and Coşkun, M. -Phytochemical screening of plants from the Ermenek-Mut-Gumar (Turkey) Area, III. *Lamiaceae*"İnt||, Journal of Crude Drug Research, 24(4):177-182, (1986).

- [160]. Tekeli, Ç. -Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Türler Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Bir Araştırma||, Yüksek Lisans tezi, Ondokuz Mayıs üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 20-50 s., (2006).
- [161]. Terenzi H.F. Flawia M.M. Teloslez-Inon and Torres H. N. -Control of *Neurospora crassa* morphology by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate and dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate||. Journal of Bacteriology, 126(1): 91, (1976).
- [162]. Tomlinson,C.R.—Effects of pH on the mutagenicity of sodium azide in *Neurospora crassa* and *Salmonella typhimurium*, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 70(2): 179-191(1980).
- [163]. Toroğlu, S. ve Çenet, M. -Tedavi amaçlı kullanılan Bazı bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Kullanılan Metodlar||, KSÜ.Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(2): 12-21, (2006).
- [164]. Türk M., -Bazı önemli tıbbi bitkilerin kimyasal kompozisyonu ve antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde sub ve süperkritik akışkanların etkisi||, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 6-16 s., (2010).
- [165]. Uenobe, F. Nakamura, S. I. and Miyazawa, M. -Antimutajenic effect of reveratrol agaist Trp-P – 1||, Mutation Research, 373: 197 – 200 (1997).
- [166]. Ulubelen, A. Topcu, G. and Tan, N. -Diterpenes from *Salvia heldreichiana*", Phytochemistry, 40(5): 1473-1475,(1995).
- [167]. Umay, A., -*Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* bitkilerinin kimyasal içeriklerinin araştırılması||, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 6-7 s., (2007).
- [168]. Uysal A. -Bazı bitki gelişim düzenleyicilerinin Salmonella/Mikrozom Test sisteminde mutajenik etkilerinin araştırılması||, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü||, Yüksek Lisans Tezi, 13-14 s., (2006).
- [169]. Verschaeve, L. and Staden, J.V. -Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants||, Journal of Ethnopharmacology, 119: 575- 587, (2008).
- [170]. Vujosevic M. And Blagojevic J. -Antimutagenic effects of extracts from sage (*salvia officinalis*) in mammalian system in vivo||. Acta Veterinaria Hungarica, 52(4), 439-443, (2004).
- [171]. Vukovic-Gacic, B. Nikcevic, S. Beric-Bjedov, T. Knezevic-Vukcevic, J. and Simic, D. -Antimutagenic effect of essential oil of Sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*". Food Chemical Toxicology, 44: 1730-1738. (2006).
- [172]. Wattenberg, L.W. -Inhibition of carcinogenesis by Minor Dietary Costituents||, Cancer Research, 52: 2085-2091, (1992).
- [173]. Wittekindt E., Fisher, B. ve Hansen P.D. -Genotoxicity assay: *Umu*-test (ISO/DIS 13829,2000). Institute for Ecology and Biology, Department of Exotoxicology||, Berlin University of Tecnology, Germany. (2000).
- [174]. Yamamoto, A., Kohyama, Y. ve Hanaws, T. -Mutagenicity evaluation of fortyone metal

salts by the *Umu*- test. National Inst. For Material Science||, DOI 10.1002/jbm.1231. (2002).

[175]. Yang, D. Michel, L. Chaumont, J.P. Millet-Clerc, J. -Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis||, *Mycopathologia*, 148: 79-82, (1999).

[176]. Yılmaz, B. S. Citoglu S. G. -Chemical constituents of *Ballota* L. species||. Journal.of Faculty of Pharmacology, 32(1): 37-53, (2003).

[177]. Yumrutas, O. Sokmen, A. Akpulat, H.A. Ozturk, N. Daferera, D. Sokmen, M. Tepe, B. -Phenolic acid contents, essential oil compositions and antioxidant activities of two varieties of *Salvia euphratica* from Turkey||, *Natural Product Research*, 1: 1-4, (2011).

[178]. Yüksek, N. D. -Yeni bazı benzimidazol ve İndol türevi bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması||. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s., 28-32, (2010).



ÖZGEÇMİŞ

27.09.1981 yılında Mersin’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin’de tamamladı. 1999-2000 yılında başladığı Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden, 2005 yılında mezun oldu. 2006 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisansa başladı. 2008 yılında yüksek lisansını tamamlayarak, aynı yılın Eylül ayında Mersin Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü’nde doktora başladı. 2008 yılından beri Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

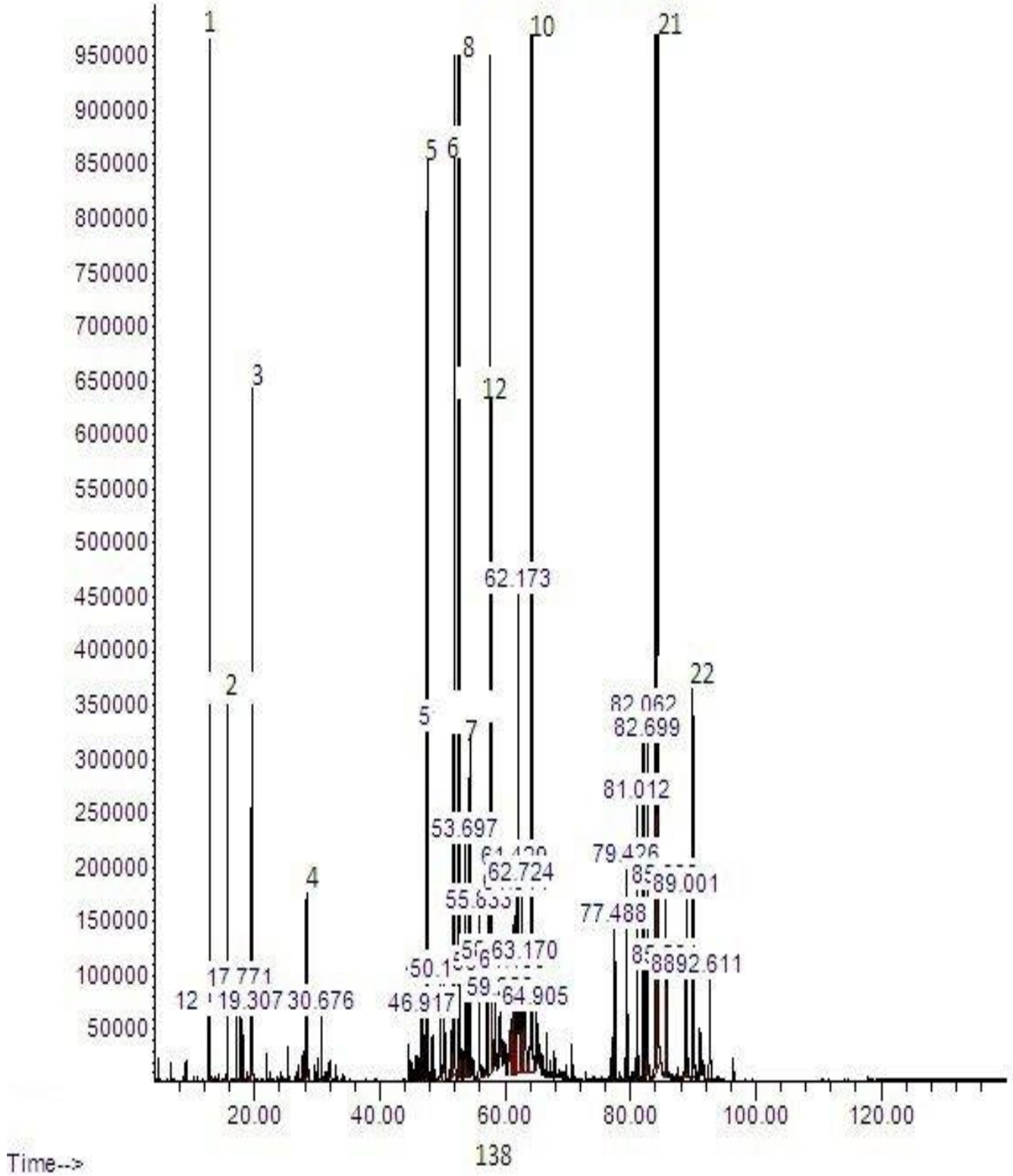


EKLER

Abundance

S. rupestris bitkisinin uçucu yağının GCMS kromotogramı. Çizelge 4.4.' te bitkinin ana maddesini oluşturan bileşenler, kromotogram üzerinde numaralandırılmıştır.

TIC: SR-YENI.D\data.ms



Abundance

S.heldreichiana bitkisinin uçucu yağının GCMS kromatogramı. Çizelge 4.2.'de bitkinin ana maddesini oluşturan bileşenler, kromatogram üzerinde numaralandırılmıştır.

TIC: SHEL-YENI.D\data.ms

