

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***SIDERITIS TROJANA* BORNM. VE**
***SIDERITIS ATHOA* PAPANIKOLAOU & KOKKINI**
BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN AMES TESTİ
İLE MUTAJENİK VE ANTİMUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Merve BALLI

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 18/07/2012

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

MERVE BALLI tarafından YRD. DOÇ. DR. NESLİHAN DEMİR yönetiminde hazırlanan “*SIDERITIS TROJANA* BORNM. VE *SIDERITIS ATHOA* PAPANIKOLAOU & KOKKINI BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN AMES TESTİ İLE MUTAJENİK VE ANTİMUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Danışman



Prof. Dr. Hülya SİVAS

Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

Jüri Üyesi

Sıra No :

Tez Savunma Tarihi: 18/07/2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Merve BALLI

TEŞEKKÜR

Tez çalışma konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR'e; çalışmada kullanılan test suşlarının temini ve değerli katkıları için Sayın Prof. Dr. Hülya SİVAS'a; çalışmada test edilen bitkileri öneren Sayın Yrd. Doç. Dr. Hanife AKYALÇIN'a; bitkilerin teşhisi için Sayın Yrd. Doç. Dr. Ersin KARABACAK'a; ekstraktların eldesindeki yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ERDUĞAN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a; çalışma boyunca yapmış oldukları değerli katkıları için Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatma AYDIN'a ve Sayın Arş. Gör. Dr. Tülay BİCAN SÜERDEM'e; çalışmada kullanılan cihazların temini için Sayın Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN'a ve Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarının her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Didar GÜZEY, Deniz ÇAKMAK ve İbrahim DENİZ'e; beni yalnız bırakmayan ve çalışmanın farklı aşamalarında vermiş oldukları desteklerden dolayı sevgili arkadaşlarım Gizem ÖZKURNAZ, Nebahat ÖZCAN, Tuğba ÇELİK, İlknur Nezahat ÇILDIR ve Alper YAŞAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Göstermiş oldukları sabır, anlayış ve fedakarlıklar için her zaman yanımda olan annem Remziye BALLI ve babam Muhterem BALLI'ya sonsuz teşekkürler...

Merve BALLI

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
2AA	2-Aminoantrasen
2AAF	2-Asetilaminofloren
2AF	2-Aminofloren
2NF	2-Nitrofloren
4NQO	4-Nitroquinolin-1-oksit
5NFAA	3-(5-Nitro-2-füril) akrilik asit
A	Adenin bazı
AFB1	Aflatoksin B1
B(a)P	Benzo(a)piren
C	Sitozin bazı
CHP	Kümolhidroperoksit
cm	Santimetre
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ENNG	<i>N</i> -Etil- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrozoguanidin
g	Gram
G	Guanin bazı
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HB	Histidin/biyotin
HBA	Histidin/biyotin/ampisilin
IQ	2-Amino-3-metil-3H-imidazo[4,5-F]quinolin
kg	Kilogram
KN	Kaynama noktası
kob	Koloni oluşturan birim
M	Molarite
m	Metre
MA	Molekül ağırlığı

mg	Miligram
MGA	Minimal glukoz agar
ml	Mililitre
MMC	Mitomisin C
MMS	Metil metansülfonat
N	Normalite
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
NPD	4-Nitro- <i>o</i> -fenilendiamin
NQNO	4-Nitroquinolin- <i>N</i> -oksit
OD	Optik yoğunluk
°C	Santigrat derece
ROS	Reaktif oksijen türleri
S9	Sıçan karaciğeri mikrozomal enzimleri
SA, NaN ₃	Sodyum azid
sn	Saniye
T	Timin bazı
UV	Ultraviyole
β-NADP	β-Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

ÖZET

***SIDERITIS TROJANA* BORNM. VE *SIDERITIS ATHOA* PAPANIKOLAOU & KOKKINI BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN AMES TESTİ İLE MUTAJENİK VE ANTİMUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve BALLI

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

18/07/2012, 90

Bu çalışmada, *Sideritis trojana* Bornm. ve *Sideritis athoa* Papanikolaou & Kokkini bitkilerinin (Lamiaceae) mutajenik ve antimutajenik etkileri kısa zamanlı mutajenite/antimutajenite test sistemlerinden Ames testi ile araştırılmıştır. Çalışmada test edilmek üzere, bitkilerin farklı ekstraktları (kloroform, aseton, metanol ve su) elde edilmiştir. Mutajenite çalışmalarında ekstraktların 100, 20, 4, 0,8 ve 0,16 mg/plak dozları ve antimutajenite çalışmalarında 800, 160, 32, 6,4 ve 1,28 µg/plak dozları kullanılmıştır. Deneyler *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 mutant suşları ile yürütülmüştür. Bitki ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik potansiyelleri, mikrozomal enzimler içeren S9 varlığında ve yokluğunda test edilmiştir.

S9 varlığında yapılan mutajenite çalışmaları sonucunda, *S. trojana* metanol ve su ekstraktları ile *S. athoa* metanol ekstraktının baz çifti değişimine yol açabilen potansiyel mutajenik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Antimutajenite çalışmalarında ise, *S. trojana* ve *S. athoa* ekstraktlarının genellikle doza bağlı olarak orta ya da güçlü antimutajenik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Sadece *S. trojana* metanol ekstraktında doz arttıkça, antimutajenik etkinin azaldığı saptanmıştır. S9 varlığında en yüksek koruma, *S. trojana* kloroform ve aseton ekstraktlarında (800 µg/plak dozunda TA98 suşunda) sırasıyla %65 ve %63 inhibisyon oranlarıyla gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Sideritis trojana*, *Sideritis athoa*, Ames testi, mutajenite, antimutajenite.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MUTAGENIC AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES OF EXTRACTS OBTAINED FROM *SIDERITIS TROJANA* BORNM. AND *SIDERITIS ATHOA* PAPANIKOLAOU & KOKKINI PLANTS BY THE AMES TEST

Merve BALLI

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Chair for Biology Thesis, Master of Science

Advisor: Assist. Prof. Dr. Neslihan DEMİR

18/07/2012, 90

In this research, the mutagenic and antimutagenic effects of *Sideritis trojana* Bornm. and *Sideritis athoa* Papanikolaou & Kokkini plants (Lamiaceae) have been investigated by using short-term mutagenicity/antimutagenicity test system named Ames. In this study for testing, different extracts (chloroform, acetone, methanol and water) of plants have been obtained. 100, 20, 4, 0,8 and 0,16 mg/plate doses of extracts in mutagenicity studies and 800, 160, 32, 6,4 and 1,28 µg/plate doses in antimutagenicity studies have been used. Experiments were carried out on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 mutant strains. Mutagenic and antimutagenic potencies of plant extracts have been tested in absence or presence of S9 which contains microsomal enzymes.

As a result of the mutagenicity studies in presence of S9, it has been determined that *S. trojana* methanol and water extracts and *S. athoa* methanol extract have potential mutagenic effect which can lead to base pair substitution. In antimutagenicity studies, it has been detected that *S. trojana* and *S. athoa* extracts have generally dose-dependent moderate or strong antimutagenic activity. But only, antimutagenic effect was decreased with increasing doses of *S. trojana* methanol extract. The highest protection in presence of S9 was observed in *S. trojana* chloroform and acetone extracts with inhibition percentages of 65% and 63% (at 800 µg/plate in TA98 strain), respectively.

Keywords: *Sideritis trojana*, *Sideritis athoa*, Ames test, mutagenicity, antimutagenicity.

İÇERİK

	Sayfa
TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
BÖLÜM 1 – GİRİŞ	1
1.1. Mutasyonlar	1
1.1.1. Kromozom mutasyonları	2
1.1.2. Gen mutasyonları	3
1.2. Antimutajenite	4
1.3. Ames Testi (<i>Salmonella</i>/Mikrozom Testi)	5
1.4. Lamiaceae Familyası	8
1.5. <i>Sideritis</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri	9
1.6. <i>Sideritis</i> L. Cinsinin Fitokimyasal İçeriği	10
1.7. <i>Sideritis</i> L. Cinsinin Biyolojik Aktiviteleri ve Halk Arasında Kullanımı	11
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	13
2.1. <i>Sideritis trojana</i> ve <i>Sideritis athoa</i> ile Yapılan Bazı Çalışmalar	13
2.2. Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitki Ekstraktları ile Yapılan Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmaları	14
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Test edilen bitkiler	25
3.1.2. Test suşları	26

3.1.3. Kimyasal maddeler	26
3.1.4. Stok çözeltiler ve besiyerleri	27
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Ekstraktların elde edilmesi	35
3.2.2. Ekstraktların verimlilik oranlarının belirlenmesi	36
3.2.3. Test suşlarının genetik özelliklerinin kontrol edilmesi	36
3.2.3.1. Histidin gereksinimi	36
3.2.3.2. <i>rfa</i> mutasyonu	37
3.2.3.3. <i>uvrB</i> mutasyonu	37
3.2.3.4. R faktörü	37
3.2.4. Test suşlarının master plaklarının hazırlanması	38
3.2.5. Test suşlarının uzun süre saklanması ve stok kültürlerinin açılması	38
3.2.6. Test suşlarının gecelik kültürlerinin hazırlanması	38
3.2.7. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi	39
3.2.8. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	39
3.2.9. Mutajenite çalışmaları	39
3.2.10. Antimutajenite çalışmaları	40
3.2.11. Pozitif kontrol	41
3.2.12. Negatif kontrol	41
3.2.13. Spontan kontrol (kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü)	41
3.2.14. Sonuçların değerlendirilmesi	42
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	43
4.1. Ekstraktların Verimlilik Oranları	43
4.2. Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü	43

4.2.1. Histidin gereksinimi	43
4.2.2. <i>rfa</i> mutasyonu	45
4.2.3. <i>uvrB</i> mutasyonu	45
4.2.4. R faktörü	46
4.3. Mutajenik Aktivite Sonuçları	47
4.4. Antimutajenik Aktivite Sonuçları	57
BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	73
Çizelgeler	I
Şekiller	II
Özgeçmiş	III

BÖLÜM 1**GİRİŞ**

Bitki ekstraktları, eski çağlardan beri birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkiler, tıbbi etken maddelerin doğal kaynakları olarak binlerce yıldır insanlığa hizmet etmektedirler (Pezzuto, 1997; Topçu ve Ulubelen, 2007). Dünya çapında, geleneksel ve modern tıbbi sistemlerde 50.000-70.000 bitki türünün kullanıldığı bilinmektedir (Schippmann ve ark., 2006). Kullanıma sunulan bütün ilaçların yaklaşık %50'si doğal ürünler ve onların türevlerini içermektedir. Bu oranın yarısını, bitkilerden elde edilen doğal ürünler oluşturmaktadır (Balandrin ve ark., 1993). Son yıllarda, tıbbi ve aromatik bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif bileşenler üzerinde çok sayıda çeşitli araştırmalar yapılmış olup halen artarak devam etmektedir.

Pek çok bitki tedavi edici özelliğe sahip olmasına rağmen, içerdikleri bazı etken maddeler nedeniyle potansiyel mutajenik, kanserojenik, toksik ve teratojenik olabilmektedir (Gadano ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda, birçok bitkinin mutajenik bileşenler içerdiği tespit edilmiştir (Gomes-Carneiro ve ark., 1998; Ferreira ve Vargas, 1999; Varanda ve ark., 2002; Rietjens ve ark., 2005; Santos ve ark., 2008). Mutasyonların birikimi, yaşlanma gibi çeşitli dejeneratif olguların ve çoğu kanserin gelişimi ile yakından ilişkilidir (Migliore ve Coppede, 2002). Genotoksik ya da sitotoksik kimyasallar içeren bitkilerin kanser gelişiminde rolleri olduğu düşünülmektedir (Ames, 1983).

1.1. Mutasyonlar

Biyolojik moleküllerin çoğu sınırlı bir yaşam süresine sahiptir. Pek çok protein, lipid, karbonhidrat ve RNA molekülleri hasara uğradıklarında ya da uzun süre ihtiyaç olmadığında parçalanırlar. Oluşan küçük moleküller enerji üretimi ya da depolanması için gerekli bileşenlere metabolize olurlar. Bununla birlikte, genetik bilginin depolanması ve ifade edilmesinde görev alan deoksiribonükleik asit (DNA) bilinen en kararlı biyolojik moleküldür. DNA nesilden nesile aktarılır ve sadece hücreler öldüğünde parçalanır. Ancak, bu molekül değişebilir; yani mutasyona uğrayabilir (Hardison, 2005). Genetik materyalde oluşan herhangi bir kalıtsal değişiklik mutasyon olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklik gamet (eşey) hücrelerinde ya da somatik hücrelerde olabilir. Gamet hücrelerinde meydana gelen genetik değişiklikler sonraki nesillere aktarılabilir. Somatik hücrelerde oluşan mutasyonların ise, kanser oluşumunda etkili bir rol oynadığı bilinmektedir (Hayashi, 1992; Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006). Bununla birlikte, oluşan mutasyon organizmanın fenotipini etkileyebilir ya da etkilemeyebilir. İnsan ya da hayvan fenotipini olumsuz yönde

etkileyen bir mutasyon, genetik bir bozukluk ya da kalıtsal bir hastalıkla sonuçlanabilmektedir (Campbell ve Reece, 2010).

Mutasyonlar kendiliğinden (spontan) olarak ortaya çıkabildiği gibi, mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal bazı ajanların etkisiyle de oluşabilmektedir. Spontan mutasyonlar, bütün hücrelerde görülebilen ve doğal olarak oluşan mutasyonlardır. Bu tip mutasyonlar, genellikle DNA replikasyonu, onarımı ya da rekombinasyonu sırasında meydana gelen hatalar sonucu oluşabilmektedir. Bir genin spontan mutasyona uğrama olasılığı 10^6 - 10^8 replikasyonda birdir. Aynı zamanda, UV ve X ışınları gibi fiziksel ya da çeşitli kimyasal mutajenlerin etkisiyle genetik değişikliklerin oranı artmaktadır (Venitt ve Parry, 1984; Forster, 1986; Keeton ve ark., 2003; Campbell ve Reece, 2010).

Mutajenler en az üç farklı mekanizma ile mutasyonları uyarırlar:

- DNA'daki bir bazın yerini alabilirler. Böylelikle, DNA replikasyonu sırasında hatalı eşleşmelere sebep olabilirler.
- DNA'nın yapısına katılabilir ve bu şekilde genetik materyalin yapısının bozulmasına neden olabilirler. Sonuçta, DNA replikasyonunun doğru yapılmasını engelleyebilirler.
- Bazların yapısında değişiklik yapabilirler. Böylece, bazların eşleşme özelliklerinin değişmesine neden olabilirler (Campbell ve Reece, 2010).

Bütün hücreler çeşitli yollarla DNA hasarını tamir eden bir seri enzimatik sisteme sahiptirler. Bu tamir mekanizmalarından bazıları mutajenik potansiyele sahip bileşenler DNA ile reaksiyona girmeden önce, bazıları da DNA'da değişiklik olduktan sonra etki etmektedirler (Hardison, 2005). Ancak, tamir mekanizmalarının inhibisyonu (engellenmesi) ya da aksaması sonucu mutasyon frekansı artar ve hücrede dengeler bozulur.

Mutasyonları genel olarak iki gruba ayırmak mümkündür:

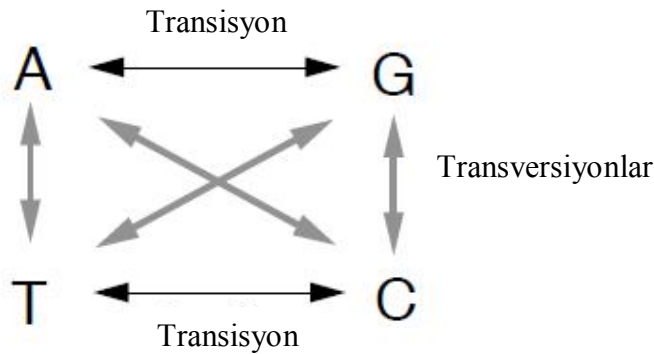
1.1.1. Kromozom mutasyonları

Kromozomal mutasyonlar, kromozomların sayısının ya da yapısının değişmesi sonucu meydana gelen mutasyonlardır. Kromozom sayısının değişmesi, hücrenin sahip olduğu kromozom sayısının setler halinde artması ya da azalması şeklinde (öplöidi)

olabildiği gibi bu seti oluşturan bir ya da daha fazla kromozomun artması ya da azalması şeklinde (anöploidi) de olabilmektedir. Kromozom yapısında meydana gelen değişiklikler ise kromozomun bir parçasının kopup kaybolması (delesyon), kopan parçanın 180° dönüp aynı kromozoma tekrar yapışması (inversiyon), kromozomdaki bir segmentin tekrarlanması (duplikasyon) ve homolog olmayan iki kromozom arasında segmentlerin yer değiştirmesi (translokasyon) şeklinde gerçekleşmektedir (Akı, 2007; Campbell ve Reece, 2010).

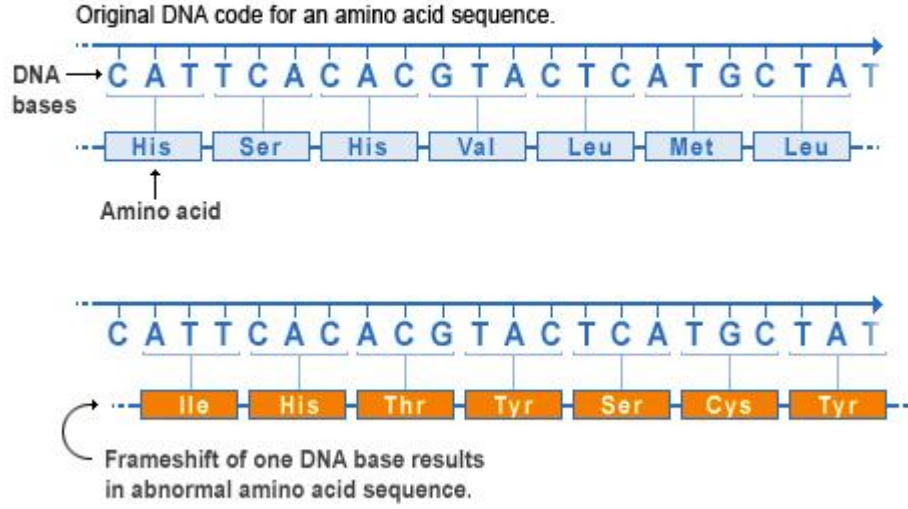
1.1.2. Gen mutasyonları

Gen mutasyonları DNA'daki herhangi bir bazın ve komplementer zincirdeki eşinin farklı bir baz çifti ile yer değiştirmesi (baz substitisyonu), DNA'ya baz çiftlerinin eklenmesi (insersiyon) ya da çıkarılması (delesyon) şeklinde gözlenmektedir. Baz substitisyonları da kendi arasında transisyon (karşılıklı geçiş) ve transversiyon (çaprazlama geçiş) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Transisyon, bir pürin bazının (A ya da G) diğer pürin bazıyla ya da bir pirimidin bazının (T ya da C) diğer pirimidin bazıyla yer değiştirmesi şeklinde olmaktadır. Transversiyon ise, bir pürin bazının bir pirimidin bazıyla ya da bir pirimidin bazının bir pürin bazıyla yer değiştirmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Keeton ve ark., 2003; Hardison, 2005; Campbell ve Reece, 2010) (Şekil 1). İnsersiyon ya da delesyon tipindeki mutasyonlar, yer değiştirme mutasyonlarına oranla protein üzerinde daha olumsuz bir etkiye sahiptir. Eklenen ya da çıkarılan bazlar bir üçlü şeklinde olmadığında ortaya çıkan mutasyon, çerçeve kayması mutasyonu olarak adlandırılır. Değişikliğin olduğu noktadan itibaren okuma çerçevesi kayacak ve bu durum çoğunlukla işlevsiz bir protein üretimine neden olacaktır (Campbell ve Reece, 2010) (Şekil 2).



Şekil 1. Baz substitisyonları çeşitleri: transisyonlar ve transversiyonlar (Hardison, 2005).

Frameshift mutation



U.S. National Library of Medicine

Şekil 2. Çerçeve kayması mutasyonu

(<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/frameshift>).

Mutajenik ve kanserojenik etkenler, insanoğlunun yaşadığı ortamda varlığını sürdürmektedir ve bunların tamamının ortadan kaldırılması da mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, antimutajenik ajanların belirlenmesine yönelik çalışmalar önem ve hız kazanmaktadır (De Flora ve Ramel, 1988).

1.2. Antimutajenite

Fiziksel ve kimyasal mutajenlerin sebep olduğu mutajeniteyi azaltan kimyasallar antimutajen olarak tanımlanmaktadır (Mitscher ve ark., 1986). Bir antimutajen promutajenik bir bileşenin mutajene dönüşümünü önleyebilir, mutajeni inaktive edebilir ya da mutajen ve DNA arasındaki reaksiyonu engelleyebilir (desmutajenler). Antimutajenlerin diğer bir çeşidi de DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamirinde görev alan enzimleri doğrudan ya da dolaylı olarak uyarabilir, baskı altında tutabilir veya inaktive edebilir (biyo-antimutajenler). Mutajenler, DNA ile etkileşime geçmeden önce enzimatik ya da kimyasal yolla desmutajenler tarafından tamamen veya kısmen inaktif hale getirilir. Biyo-antimutajenler ise, mutajenin genetik materyal ile reaksiyona girmesinden sonra hasar görmüş DNA'nın tamir ve replikasyon mekanizmaları üzerinde rol oynayarak

etkili olmaktadır (Ferguson, 1994; Bhattacharya, 2011).

Mutajenlerin, kanser oluşumu dışında birçok kronik dejeneratif hastalıkların (kronik inflamasyon, artrit, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve karaciğer hastalıkları) gelişimi ve yaşlanma süreci ile de ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu maddelerin zarar verici etkilerini en aza indirmenin en iyi yollarından biri doğal antimutajenlerin kullanımınıdır. Bitkilerde, günlük tükettiğimiz gıdalarda ve diğer kaynaklarda bulunan doğal antimutajenik maddeler mutajenlere karşı koruyucu etkiye sahiptirler. Bunlar arasında flavonoidler, fenolik bileşikler, kumarinler, pigmentler, taninler, terpenoidler, saponinler, fitoöstrojenler gibi farklı kimyasal grubundan çeşitli biyoaktif bileşenler bulunmaktadır (Weisburger, 2001; Bhattacharya, 2011). Antimutajenik ya da korucuyu etkiye sahip en az 25 kimyasal sınıfa ait 500'den fazla bileşen tanımlanmıştır (Boone ve ark., 1990).

Çeşitli maddelerin potansiyel mutajenik/antimutajenik etkilerinin deney hayvanları kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalarla test edilmesi daha akılcı bir yaklaşım olur. Ancak bu tür çalışmaların sonuçlanması, hem çok uzun zaman gerektirmekte hem de maliyetli olmaktadır (Paolini ve Forti, 1997). Bu nedenle, mutajenite/antimutajenite test sistemlerinden bakterilerin kullanıldığı kısa zamanlı testler daha çok tercih edilmektedir. Bakterilerin temel üreme ortamlarında hızlı üremeleri, sonucun çabuk alınabilmesi, kolay uygulanabilir ve ucuz olması gibi avantajları sayesinde bakteriyel test sistemleri mutajenite/antimutajenite çalışmalarında daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Joseph ve ark., 1997; Lelie ve ark., 1997).

1.3. Ames Testi (*Salmonella*/Mikrozom Testi)

Ames testi, 1970'lerin başında Prof. Dr. Bruce N. Ames ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve kısa sürede dünya çapında kabul görmüş bir bakteriyel mutajenite/antimutajenite testidir (Ames, 1971; Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Salmonella/mikrozom testi, mutasyonla sonuçlanan genetik hasara yol açan kimyasalları belirlemek için yaygın olarak kullanılan kısa süreli bir testtir. Bu testte, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar sonucu elde edilmiş oksotrofik mutantlar kullanılmaktadır. Ames testinde kullanılan *S. typhimurium* suşları,

histidin operonunda yer alan çeşitli genlerde farklı tipte mutasyonlara sahiptirler. Dolayısıyla, çoğalmaları için gerekli histidin aminoasidini sentezleme yeteneğini kaybetmiş olan bu oksotrofların, ortamda histidin olmadığı sürece gelişip koloni oluşturmaları mümkün değildir. Bu testin temeli; oksotrof (his^- = histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş) *Salmonella* suşlarının genellikle kimyasal bir ajanla muamele edildikten sonra, ikinci mutasyon sonucu prototrof (his^+ = yabani tip) haline dönmesi esasına dayanır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Test suşlarında başka mutasyonlar da oluşturularak, fazla sayıda çeşitli kimyasala karşı hassasiyetlerinin artırılması amaçlanmıştır (Mortelmans ve Zeiger, 2000). Genellikle bu işlemler DNA onarım mekanizmasının zarar görmesi, bakteri hücre duvarının geçirgenliğinin artırılması ve antibiyotik direnç geni içeren bir plasmidin hücreye sokulması şeklinde olmaktadır (Gatehouse ve ark., 1990).

Ames test sisteminde kullanılan *Salmonella* suşlarının genetik özellikleri şöyledir:

- Ames test sisteminde kullanılan her test suşu, histidin operonunda yer alan genlerden birinde farklı tipte (baz çifti değişimi ya da çerçeve kayması) bir mutasyon taşımaktadır. Örneğin; yaygın olarak kullanılan *S. typhimurium* TA100 suşunda bulunan *hisG46* mutasyonu, histidin sentezindeki ilk enzimi kodlayan *hisG* geninde bir baz çifti değişimi mutasyonu sonucunda meydana gelmiştir. Bu mutasyonla enzim yapısına lösin aminoasidi (GAG/CTC) yerine prolin aminoasidi (GGG/CCC) katılır. Bu tip bir mutasyon, baz çifti değişimine neden olan mutajenler tarafından eski haline döndürülebilmektedir. *S. typhimurium* TA98'de bulunan *hisD3052* mutasyonu da, histidin sentezindeki son enzimi (histidinol dehidrogenaz) kodlayan *hisD* geninde meydana gelen çerçeve kayması mutasyonu sonucunda oluşmuştur. Bu mutasyon, genin sahip olduğu -C-G-C-G-C-G-C-G-dizisinin yakınındaki bir bazın yapıdan ayrılması sonucunda meydana gelmiştir. *hisD3052* mutasyonunun eski haline dönmesi, çerçeve kayması tipinde mutasyona yol açabilen mutajenler tarafından mümkün olabilmektedir. Ames testinde kullanılan bütün suşlar, histidin operonunda bir mutasyon taşıdığından yaşamsal öneme sahip histidin aminoasidini sentezleyememektedirler. Böylelikle bu genetik özelliğe sahip mutant suşlar, ortamda histidin bulunmadığı sürece hayatta kalıp çoğalamazlar.

- Bütün suşlar, kendilerini kuşatan lipopolisakkarit tabakanın yapımından sorumlu genlerde bir mutasyon (*rfa*) taşımaktadırlar. Bu nedenle, hasarlı bir hücre duvarına sahiptirler. *rfa* taşıyan bakteriler, büyük moleküllere karşı hassastırlar. Normalde hücre duvarından geçemeyecek büyüklükteki maddeler hücreye girerek, bakterinin ölmesine neden olmaktadır.

- Ames testinde kullanılan suşların (TA102 suşu hariç) genel bir özelliği de, *uvrB*-bio genlerinde delesyon tipinde bir mutasyon taşımalarıdır. *uvrB*, hatasız kesip çıkarma tamir mekanizmasını engellemekte ve hata yapmaya eğilimli DNA tamir mekanizmasını devreye sokmaktadır. Aynı zamanda biyotin vitamininin sentezinden sorumlu bio geni de delesyona uğradığından, bu mutasyona sahip test suşları üreyebilmek için biyotine ihtiyaç duymaktadırlar.

- Son olarak, suşların çoğu (TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA104) ampisilin direnç geni taşıyan pKM101 plazmidi içermektedir. Bu plazmid, hem hata yapmaya eğilimli DNA tamir mekanizmasını uyarmakta hem de plazmidin hücredeki varlığını belirlemek için uygun bir marker taşımaktadır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Ames testi, özellikle kimyasal olarak indüklenmiş mutajeniteyi belirlemek amacıyla tasarlanmıştır (Ames ve ark., 1975). Bu test sistemi ile kısa sürede 5000'den fazla kimyasalın mutajenitesi test edilmiştir (Maron ve Ames, 1983). Ayrıca, bitkilerin ve onlardan izole edilen biyoaktif bileşenlerin mutajenitesinin Ames testi ile araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (Cardoso ve Cólus, 2006; Ghazali ve ark., 2011). Ames test sistemi toprağın, suyun ve havanın mutajenik potansiyelini belirlemek için de yaygın olarak uygulanmaktadır (Lewtas, 1988; Kool ve ark., 1989; Cerná ve ark., 1996; Cerná ve ark., 2000; Aleem ve Malik, 2003; Umbuzeiro ve ark., 2004; Watanabe ve ark., 2008; Vu ve ark., 2012). Bunlarla birlikte, doğal ya da yapay kimyasalların antimutajenik etkilerinin çalışılmasında da popüler bir test modelidir. Bir bileşenin antikanserojenik potansiyelinin kısa sürede belirlenmesinde kullanılmaktadır (Hong ve Lyu, 2011). Şimdiye kadar, Ames testi ile vitaminler, karotenoidler, flavonoidler ve terpenoidler gibi fitokimyasalların antimutajenik/antikanserojenik etkisi test edilmiştir (Sghaier ve ark., 2011a). Ames testi sonucu pozitif çıkan bir kimyasal için kesin olarak mutajen/kanserojen ya da antimutajen/antikanserojen olduğunu söylemek mümkün değildir. Bu kimyasalın sadece

potansiyel olarak bu özellikleri taşıyabileceği öngörülebilir. Sonucun kesinlik kazanabilmesi için, mutlaka deney hayvanlarının kullanıldığı çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Ames test sistemi, geleneksel hayvan kanserojenite testlerini tamamlayıcı özelliğe sahiptir (McCann ve Ames, 1976). Bilinen pek çok mutajen madde ilk kez *Salmonella*/mikrozom testi ile belirlenmiş olup, daha sonra deney hayvanlarıyla yapılan *in vivo* çalışmalarla genotoksik özelliğe sahip oldukları kanıtlanmıştır (Maron ve Ames, 1983). Çevresel kanserojen ve mutajenlerin belirlenmesinde yardımcı olan bu test ile, bu çeşit kimyasallarla muameleden kaçınarak ya da bunlara en az düzeyde maruz kalınarak kanserden korunma mümkün olabilmektedir (McCann ve Ames, 1976).

Bazı kimyasallar, metabolik aktivasyon sonucu mutajenik aktivite kazanabilirler. Ames testinde kullanılan bakteriler, memelilerde mevcut olan enzim sisteminden yoksundurlar. Bu nedenle, test maddesinin memelilerde oluşan metabolizmasını taklit etmek amacıyla, bu bakteriyel test sistemine dışarıdan mikrozomal enzimler ilave edilmektedir. Böylece, test edilen maddenin enzim aktivasyonu sonucu mutajenik etkiye sahip olup olmadığı belirlenebilmektedir. Bu enzim karışımı (sitokrom P-450 enzim sistemi ile birlikte çeşitli metabolik enzimler), kısaca S9 olarak isimlendirilmekte ve genellikle sıçan karaciğerinden elde edilmektedir (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000; Sakura ve ark., 2004).

Daha önce yapılan çalışmalarla kanserojen olup olmadığı bilinen 300 kimyasal, mutajenite ile kanserojenite arasındaki ilişkiyi belirlemek için Ames test sisteminde araştırılmıştır. Sonuçta, test edilen 175 kanserojen maddenin %90'ının mutajen özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Kanserojen olmayan 108 kimyasalın test edildiği deneylerde ise, %87'sinin mutajenik etki göstermediği rapor edilmiştir (McCann ve Ames, 1976). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, mutajenezis ve kanser oluşumu arasındaki yakın ilişkinin anlaşılmasından sonra bitki içeriklerinin mutajenik ve antimutajenik potansiyellerini belirleme üzerine odaklanmıştır (Loh ve ark., 2009).

1.4. Lamiaceae Familyası

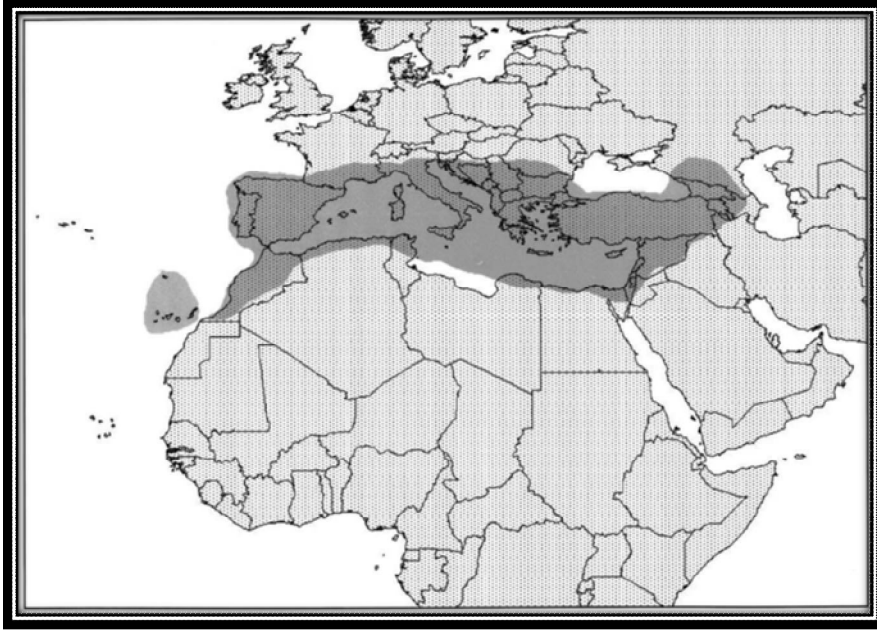
Dünya üzerinde yaklaşık 250 cins ve 3000 tür ile temsil edilen Lamiaceae (Labiatae=Ballıbabagiller) familyası, en yüksek endemizm oranına (%33) sahip familyalardan biri olma özelliğine sahiptir. Bu familya, Türkiye'de 45 cins ve 247'si endemik olmak üzere 558 tür ile temsil edilmektedir (Davis ve ark., 1988; Güner ve ark.,

2000).

Lamiaceae familyası, tıbbi ve aromatik özelliğe sahip ekonomik açıdan değerli pek çok türü barındıran oldukça geniş bir familyadır. Bu familyaya ait *Sideritis*, *Salvia*, *Thymus*, *Origanum* ve *Mentha* cinsinden birçok bitki türü halk arasında yaygın olarak çay şeklinde tüketilmektedir.

1.5. *Sideritis* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Lamiaceae familyasına ait *Sideritis* cinsi, 150'den fazla tür tarafından temsil edilmektedir. Bu cinse ait türler Bahama Adaları'ndan Batı Çin'e, Almanya'dan Fas'a Kuzey Yarımküre'nin ılıman ve tropikal bölgelerinde yayılış göstermektedirler (Şekil 3). Ancak, *Sideritis* türleri özellikle Kanarya Adaları'ndan Kafkasya'ya kadar olan bölgeyi içine alan Akdeniz Havza'sında bulunmaktadır. Tür çeşitliliği bakımından en yoğun ülkeler Türkiye ve İspanya'dır. Türkiye'de ise, Marmara ve Ege Bölgeleri'nde hakim durumdadırlar (Aslan ve ark., 2006; Loğoğlu ve ark., 2006; Güvenç ve ark., 2010).



Şekil 3. *Sideritis* L. cinsinin dünya üzerinde yayılışı (Barber ve ark., 2002).

Sideritis türleri tek yıllık ya da çok yıllık, aromatik özelliğe sahip, otsu ya da kısa çalimsı formda türlerdir. Korolla çoğunlukla sarı, nadiren beyaz ya da kırmızı ve kaliksten daha kısadır. *Sideritis* türleri en iyi olarak güneş alan yerlerde yetişirler ve kuraklığa uyum sağlamışlardır. Bu türlere kayalık yamaçlarda ve otlaklarda, deniz seviyesinden yaklaşık

5-3000 m yükseklerde rastlamak mümkündür. Besince fazla zengin olmayan biraz alkali topraklarda yetişmektedirler (Davis, 1982; Davis ve ark., 1988).

Sideritis cinsinin karakteristik bir özelliği de türler arasında hibritleşme oranının çok yüksek olmasıdır. Hibridizasyonun bir sonucu olarak, *Sideritis* türlerinin sistematik sınıflandırılmasında güçlük çekilmektedir. Bu nedenle bu cinsin sınıflandırılması, morfolojik özellikleri ile birlikte içerdiği sekonder metabolitlerin analizi göz önünde tutularak yapılmaktadır (González-Burgos ve ark., 2011).

Sideritis cinsinin önemli bir özelliği de endemizm oranının oldukça yüksek (%77) olmasıdır. Türkiye’de yetişen 46 türün 36’sı, 12 alttürün 10’u ve 2 varyete endemiktir (Çarıkçı ve ark., 2007).

1.6. *Sideritis* L. Cinsinin Fitokimyasal İçeriği

Sideritis cinsinde terpenler, flavonoidler, uçucu yağlar, iridoidler, kumarinler, lignanlar ve steroller gibi pek çok kimyasal bileşen tanımlanmıştır (González-Burgos ve ark., 2011).

Sideritis türleri ile yapılan fitokimyasal analiz çalışmaları sonucunda diterpenler, uçucu yağlar, flavonoid ve feniletanoid glikozitleri bakımından zengin içeriğe sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu fitokimyasallar, *Sideritis* cinsinin sahip olduğu farmakolojik aktivitelerden sorumlu biyoaktif bileşenler olarak gösterilmektedir (Venturella ve ark., 1975; González ve ark., 1978; Fernández ve ark., 1986; Fraga ve ark., 1987; Fernández ve ark., 1988; Ezer ve ark., 1992; Ezer ve Akcoş, 1995; Başer ve ark., 1996; Ezer ve ark., 1996; Topçu ve ark., 1999, 2002; Şahin ve ark., 2004; Piozzi ve ark., 2006; Çarıkçı ve ark., 2007; Fraga ve ark., 2009; Kılıç ve ark., 2009; González-Burgos ve ark., 2011; Kırmızıbekmez ve ark., 2012).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar neticesinde, *Sideritis* cinsine ait türlerin içerdikleri metabolitler arasında α -pinen, β -pinen, siderol, sideridiol, sabinen, linearol, foliol ve epicandicandiol bulunduğu belirlenmiştir (Piozzi ve ark., 1968; Kırimer ve ark., 2001; İşcan ve ark., 2005; Ertaş ve ark., 2009).

1.7. *Sideritis* L. Cinsinin Biyolojik Aktiviteleri ve Halk Arasında Kullanımı

Sideritis cins ismi, Yunanca kökenli “sideros” (demir) kelimesinden gelmektedir. Antik çağlarda, bu metalden üretilen savaş aletlerinin neden olduğu yaraların iyileştirilmesinde çeşitli *Sideritis* türlerinden yararlanılmasından dolayı bu ismi almıştır. *Sideritis* türlerinin tedavi amacıyla kullanılmalarından bahseden ilk yazılı eser, Dioscorides’in 1. yüzyılda yazdığı “De Materia Medica” adlı kitabıdır (Font Quer, 1999).

Halk arasında yüzyıllardır tıbbi ve aromatik özelliklerinden dolayı *Sideritis* türlerinden yararlanılmaktadır. Günümüzde özellikle toprak üstü kısımları halk arasında gastrit, gastrik ülser, mukoz membran inflamasyonu, hipertansiyon, yanıklar ve yaralanmalarda kullanılmaktadır. *Sideritis* türlerinin toprak üstü kısımları anti-inflamatuvar, anti-ülseratif, antimikrobiyal, antioksidan, antikolinesteraz, antispazmodik, analjezik (ağrı kesici) ve karminatif (karın gazı giderici) etkiye sahiptir. Bu amaçla, demleme veya kaynatma şeklinde hazırlanıp hem oral yolla hem de topikal olarak uygulanmaktadır. Ayrıca, *Sideritis* türlerinin sahip olduğu bazı aktif maddelerin antiproliferatif, anti-HIV ya da antifeedant (iştah kesici) özelliklere sahip oldukları tespit edilmiştir (Zaruelo ve ark., 1993; Bondi ve ark., 2000; Bruno ve ark., 2002; Hernández-Pérez ve ark., 2004; Tunalier ve ark., 2004; Dülger ve ark., 2005; Gürbüz ve ark., 2005; Özkan ve ark., 2005; Dülger ve ark., 2006; Demirtaş ve ark., 2009; Ertaş ve ark., 2009; Brankovic ve ark., 2011; González-Burgos ve ark., 2011).

Türkiye’de “dağ çayı, yayla çayı, ada çayı” olarak bilinen *Sideritis* türleri, çiçeklenme döneminde (Temmuz-Ağustos) toplanıp çok çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kazdağları endemik türü *Sideritis trojana*, en fazla talep edilen ve tüketilen tıbbi bitkilerden birisidir. Yerli halk tarafından toplanarak pazarlarda satılmaktadır. Bu tür, özellikle boğaz ağrısı, hazımsızlık, göğüs rahatsızlıkları tedavisinde kullanılan ve aranılan bir bitkidir (Çelik ve ark., 2008). Dünya üzerinde sadece Türkiye’nin Kazdağları ile Yunanistan’ın Athoa Dağı’nda yayılış gösteren *Sideritis athoa* bitkisi de, halk arasında başta soğuk algınlığı olmak üzere gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Başer ve ark., 1986; Polat ve Satıl, 2012).

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda, *Sideritis* türlerinin mutajenik ve/veya antimutajenik etkilerinin belirlenmesi üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile *Sideritis trojana* ve *Sideritis athena* bitkilerinden elde edilen farklı ekstraktların (kloroform, aseton, metanol ve su) Ames (*Salmonella*/mikrozom) testi yardımıyla potansiyel mutajenik ve antimutajenik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2 ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Sideritis trojana* ve *Sideritis athoa* ile Yapılan Bazı Çalışmalar

S. trojana bitkisinin potansiyel insektisidal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, aseton ekstraktı ile üç aktif bileşenin (7-epicandiciol, 7-epicandiciol diasetat ve 18-asetilsideroksol) üç böcek türüne (*Acanthoscelides obtectus*, *Sitophilus granarius* ve *Ephestia kuehniella*) karşı toksisitesi belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak, *S. trojana* bitkisinin doza bağlı insektisidal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Aslan ve ark., 2006).

Başka bir çalışmada, *S. trojana* da dahil olmak üzere toplam 7 endemik *Sideritis* türünün metanol ekstraktlarının klotrimazol dirençli *Candida albicans*'a karşı etkili olduğu bulunmuştur (Dülger ve ark., 2006).

İçlerinde *S. athoa*'nın da bulunduğu bazı *Sideritis* türlerinden elde edilen ekstraktların merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, farelere *Sideritis* türlerinin su ekstraktları iki farklı dozda (250 ve 500 mg/kg) verilmiş ve yüzme performansları üzerindeki etkileri test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, antidepresan ilaçların kullanıldığı deneylerle karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda; *Sideritis* türlerinin su ekstraktlarının düşük dozlarının farelerde depresan aktivite gösterdiği, yüksek dozlarının ise antistres etkide bulunduğu tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 1996).

Diğer bir çalışmada, *S. athoa* bitkisinin diterpenik bileşenleri elde edilip bunların kimyasal yapıları belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonunda izole edilen bazı diterpenlerin antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Bunların, yaygın bakterilere karşı düşük düzeyde antibakteriyel etkiye sahip oldukları ve sadece *Bacillus subtilis*'e karşı anlamlı bir etki gösterdikleri belirlenmiştir (Gören, 1997).

S. athoa'nın da içinde bulunduğu 14 bitki türünün bazı yaygın mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçta, *S. athoa* bitkisinin çalışmada kullanılan bakterilere (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, koagülaz (-) *Staphylococ*, *Klebsiella pneumoniae*) karşı antimikrobiyal bir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Özkavalalı, 2010).

Bazı *Sideritis* türlerinin (*S. trojana*, *S. athoa*, *S. dichotoma*, *S. spilyea* ve *S. argyrea*) fitokimyasal içerikleri ve biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, bütün türlerden toplam 41 diterpenoid bileşen izole edilmiş olup bu bileşenlerden bazılarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Kılıç ve ark., 2003).

S. trojana ve *S. athoa* bitkilerinin kimyasal içeriklerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda ise, özellikle diterpenler ve glikozidler içerdikleri saptanmıştır (Topçu ve ark., 1999, 2002; Fraga ve ark., 2003; Halfon ve ark., 2011; Kırmızıbekmez ve ark., 2012).

2.2. Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitki Ekstraktları ile Yapılan Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmaları

Calendula officinalis (aynısafa, nergis) bitkisinin genotoksik potansiyeli Ames test sistemi ve fare kemik iliği mikronükleus testi ile araştırılmıştır. Çalışmada, *Salmonella typhimurium*'un TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları kullanılmıştır. Test sonuçlarına göre, *C. officinalis*'in uygulanan konsantrasyonlarında genotoksik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Ramos ve ark., 1998).

Baharat olarak kullanılan *Myristica fragrans* (küçük hindistan cevizi), *Coriandrum sativum* (kişniş), *Carthamus tinctorius* (yalancısafran, aspir), *Carum carvi* (frenk kimyonu), *Rhus coriaria* (sumak), *Anisum vulgare* (anason), *Piper nigrum* (karabiber), *Elettaria cardamomum* (kakule), *Cuminum cyminum* (kimyon) ve *Nigella sativum* (çörekotu) bitkilerinin potansiyel mutajenik özellikleri Ames testi ile araştırılmıştır. *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşlarının kullanıldığı mutajenite testinde, küçük hindistan cevizi ve kimyon dışında mutajenik etki gözlenmemiştir. Küçük hindistan cevizinin zayıf çerçeve kayması mutasyonuna ve kimyonun oksidasyon yoluyla çok zayıf mutajeniteye neden olduğu belirlenmiştir (Al-Bataina ve ark., 2003).

Güney Afrika'nın tıbbi bitkilerinden oluşan 51 türün genotoksik potansiyeli Ames testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada, ekstraktların eldesinde çözücü olarak diklorometan ve metanol kullanılmıştır. *Crinum macowanii* bitkisinin soğanından elde edilen diklorometan ekstraktı ile *Chaetacme aristata* ve *Plumbago auriculata* yaprak ekstraktlarının mutasyona neden olduğu bildirilmiştir. *Catharanthus roseus* yapraklarından ve *Combretum mkhzense* sürgünlerinden elde edilen ekstraktlar ise, sadece metabolik

aktivasyon sonucu mutajenik aktivite göstermişlerdir. Ayrıca, *C. roseus* ve *Ziziphus mucronata* yapraklarının sadece metanol ekstraktlarının S9 varlığında mutasyona neden olduğu bulunmuştur. Çalışmada tespit edilen mutajenik aktiviteler sadece TA98 suşunda görülürken, TA100 suşunda genotoksik etkiye rastlanılmamıştır (Elgorashi ve ark., 2003).

Meksika’da yerel halk tarafından tedavi amacıyla kullanılan ve ticari öneme sahip 15 bitkinin (*Amphipteryngium adstringens*, *Hintonia standleyana*, *H. latiflora*, *Piper sanctum*, *Haemathoxylon brasiletto*, *Iostephane heterophylla*, *Valeriana procera*, *Arracacia toluensis*, *Brickellia veronicaefolia*, *Scaphyglottis livida*, *Exostema caribaeum*, *Hippocratea excelsa*, *Ligusticum porteri*, *Poliomintha longiflora* ve *Gnaphalium sp.*) mutajenik potansiyelleri Ames test sistemi ile araştırılmıştır. *Gnaphalium sp.* ekstraktının *S. typhimurium* TA98 suşunda (S9 ±) ve *Valeriana procera* ekstraktının TA100 suşunda (S9 +) mutasyona neden oldukları bulunmuştur (Déciga-Campos ve ark., 2007).

Yıllardır Çin ve Japonya’da tıbbi ve aromatik özelliklerinden dolayı faydalanılan *Magnoliae officinalis* (manolya) kabuğu ekstraktının *in vitro* ve *in vivo* genotoksik potansiyeli araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalarda, *Escherichia coli* WP2 *uvrA* ile *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları kullanılmış olup deneyler S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, manolya kabuğu ekstraktının test edilen konsantrasyonlarının (18,5-300 µg/plak ve 625-2500 mg/kg) mutajenik ve genotoksik bir etkiye sahip olmadığı anlaşılmıştır (Li ve ark., 2007).

Brezilya’da yüksek ateş, ülser, astım, deri enfeksiyonları tedavisinde kullanılan ve gıda olarak da tüketilen *Byrsonima intermedia* bitkisinin mutajenitesi farklı testlerle araştırılmıştır. Bu amaçla, *B. intermedia* yapraklarından elde edilen metanol, hidrometanol ve kloroform ekstraktları *in vitro* (Ames testi) ve *in vivo* (mikronükleus testi) olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, metanol ekstraktının Ames testinde mutajenik aktivite gösterdiği bildirilmiş olup mikronükleus testinde ise hiçbir ekstraktın genotoksik etkisi görülmemiştir (Sannomiya ve ark., 2007).

Küba’da yerel halk tarafından solunum rahatsızlıklarında kullanılan *Punica granatum* (nar) meyvesinin potansiyel genotoksik etkisi Ames testi de dahil çeşitli testlerle saptanmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde, *P. granatum* meyvesinden elde edilen ekstraktın hem *in vitro* hem de *in vivo* genotoksik özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Sánchez-Lamar ve ark., 2008).

Tıbbi ve aromatik bir bitki olan *Hypericum lysimachioides* Boiss. var. *lysimachioides*'in genotoksitesisi Ames ve SOS kromotest ile belirlenmeye çalışılmıştır. Petrol eteri, hekzan, etil asetat ve metanol ekstraktlarının test edildiği çalışma sonunda, bu bitkinin önemli derecede mutajenik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Tolan ve ark., 2009).

Hafıza kaybı ve stres gibi durumlarda kullanılan *Coccoloba mollis* bitkisinin mutajenik ve genotoksik potansiyeli bazı *in vitro* ve *in vivo* testlerle ölçülmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, *C. mollis* yaprak ve kökünden elde edilen etanol ekstraktları *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında ($S9 \pm$) test edilmiştir. Yapılan Ames, comet ve mikronükleus testlerinin sonuçlarına göre, *C. mollis* bitkisinin mutajenik özelliğe sahip olmadığı belirlenmiştir (Tsuboy ve ark., 2010).

Tıbbi ve aromatik özelliğe sahip *Coriandrum sativum* (kişniş) bitkisinin potansiyel mutajenik aktivitesi Ames test sistemi ile araştırılmıştır. *C. sativum* su ekstraktının test edilen yüksek dozlarının (1,6-8 µg/plak) mutajenik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, aynı çalışmada *C. sativum*'un sitotoksik ve embriyotoksik özellikleri de belirlenmiştir. Kişniş su ekstraktının doza bağlı olarak mitotik indeksi azalttığı ve embriyonik gelişim sırasında ağır malformasyonlara neden olduğu saptanmıştır (Reyes ve ark., 2010).

İndigo boyası üretiminde ve pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan *Indigofera truxillensis* ve *I. suffruticosa* bitkilerinin mutajenik aktivitelerinin Ames testi ile araştırıldığı bir çalışmada, bitkilerden metanol ekstraktları ve bu ekstraktlardan gliserolipid, flavonoid ve alkaloid fraksiyonları elde edilmiştir. Test sonuçlarına göre, *I. truxillensis* ve *I. suffruticosa* flavonoid ve alkaloid fraksiyonlarının mutajenik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Calvo ve ark., 2011).

Ames testi ile *Limonium effusum* ve *L. globuliferum* bitkilerinin mutajenik aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından farklı ekstraktlar (metanol, aseton:metanol (2:1) ve su) elde edilmiştir. Çalışma sonunda, *L. effusum* köküne ait metanol ve su ekstraktlarının zayıf mutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, *L. globuliferum* yaprak metanol ekstraktı ve kök su ekstraktının bazı dozları ile gövde ve yaprak su ekstraktlarının mutajenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Eren, 2011).

Nijerya’da bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkilerden *Alchornea cordifolia*, *Cnestis ferruginea*, *Lonchocarpus sericeus*, *Trema orientalis* ve *Senna alata*’nın potansiyel mutajenik etkileri Ames testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. *A. cordifolia*, *C. ferruginea*, *L. sericeus* ve *T. orientalis*’in uygulanan en yüksek dozlarında (5000 µg/plak) bile mutajenik aktivite göstermedikleri görülmüştür. Ancak, *S. alata* bitkisinde mutajenik etkiye rastlanmıştır (Hong ve Lyu, 2011).

Geniş kullanım alanına sahip çay (*Camellia sinensis*) bitkisi çiçeğinin güvenilirliğini belirlemek amacıyla Ames test sistemi uygulanmıştır. Çalışma sonunda, çay çiçeği ekstraktının mutajenik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır (Li ve ark., 2011).

Tıpta kullanılan *Thermopsis turcica* (Eber sarısı, sarı meyan) bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçeklerinden elde edilen su ekstraktlarının potansiyel mutajenik etkisi Ames test sisteminde araştırılmıştır. Sonuçta, *S. typhimurium* TA98 suşunda (S9 +) tüm *T. turcica* su ekstraktlarının (0.375-3750 µg/plak) ve *S. typhimurium* TA102 suşunda (S9 ±) yaprak ekstraktının (3750 µg/plak) mutajenik etkiye neden olduğu belirlenmiştir (Liman ve ark., 2011).

Güneydoğu Asya’da yaygın olarak çay şeklinde tüketilen *Orthosiphon stamineus* bitkisinden elde edilen su ekstraktının genotoksik potansiyeli Ames testi ve fare kemik iliği mikronükleus testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonunda, *O. stamineus* bitkisinin genotoksik risk taşımadığı saptanmıştır (Muhammad ve ark., 2011).

Ames testi ile bazı meyve ve sebzelerin antimutajenik potansiyelinin ölçüldüğü bir çalışmada meyan kökü, kivi, havuç, brokoli, ananas, soğan, sarımsak ve yeşil biber gibi yiyecekler test edilmiştir. Mutajen olarak çeşitli nitrözleşmiş bileşikler kullanılmıştır. Sonuçta, bütün mutajenlere karşı koruyucu etki (%39-72) bir tek meyan kökü etanol ekstraktında görülmüştür. Kivinin de güçlü antimutajenik aktiviteye (%51) sahip olduğu rapor edilmiştir. Bütün meyve ve sebze ekstraktları test edilen dozlarında (50-2000 µg/plak), değişen oranlarda antimutajenik etki göstermişlerdir (Ikken ve ark., 1999).

Güney Afrika’da çay olarak tüketilen iki bitkinin antimutajenik özellikleri Ames testi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada, fermente edilmiş ve edilmemiş *Aspalathus linearis* ve *Cyclopia intermedia*’nın sulu ekstraktları 2-asetilaminoflora (2AAF), aflatoksin B1 (AFB1), metil metansülfonat (MMS), kumolhidroperoksit (CHP) ve hidrojen peroksit

(H₂O₂) mutajenlerine karşı test edilmiştir. Sonuçta, fermente edilmemiş *A. linearis* ve *C. intermedia* bitkilerinin antimutajenik etkilerinin daha fazla olduğu görülmüştür (Marnewick ve ark., 2000).

Çeşitli hastalıkların (ülser, anemi, astım) tedavisinde kullanılan *Terminalia arjuna* bitkisinin benzen, kloroform, aseton ve metanol fraksiyonlarının antimutajenik etkileri Ames test sistemi kullanılarak araştırılmıştır. Mutajen olarak siyah asit boyası, 2-aminofloren (2AF) ve 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) kullanılmıştır. Çalışma sonunda, aseton ve metanol fraksiyonlarının daha fazla antimutajenik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Kaur ve ark., 2002).

Zengin polifenol içeriğine sahip *Punica granatum* (nar) kabuklarından elde edilen ekstraktların antimutajenik aktiviteleri Ames test sistemi kullanılarak araştırılmıştır. Ekstraktların eldesinde etil asetat, aseton, metanol ve su kullanılmıştır. Test edilen ekstraktların bütün dozlarının (625, 1250 ve 2500 µg/plak) sodyum azid (NaN₃) ile indüklenen mutajeniteyi azalttıkları belirlenmiştir. En fazla antimutajenik etkiye sahip sulu ekstraktı sırasıyla aseton, etil asetat ve metanol ekstraktları izlemiştir (Negi ve ark., 2003).

Güney Afrika'da çay olarak tüketilen *Aspalathus linearis* ve *Cyclopia spp.* (*C. intermedia*, *C. subternata*, *C. genistoides* ve *C. sessiliflora*) bitkilerinin antimutajenik özellikleri *Camellia sinensis* (siyah ve yeşil çay) bitkisi ile karşılaştırılmıştır. Fermente edilmiş ve edilmemiş bu bitkilerden elde edilen sulu ekstraktların, Ames test sisteminde AFB1 ve 2AAF mutajenlerine karşı antimutajenik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonunda, fermentasyona uğramamış *C. genistoides* dışında test edilen bitkilerin belirli oranlarda antimutajenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Merwe ve ark., 2006).

Alternatif tıpta kullanılan *Stevia pilosa* ve *S. eupatoria* bitkilerinin potansiyel antimutajenik etkilerinin Ames testi ile belirlendiği bir çalışmada, bu iki türün kök, yaprak ve çiçeklerinden elde edilen metanol ekstraktları kullanılmıştır. Mutajen olarak TA98 suşu için 2-aminoantrasen (2AA), TA100 suşu için *N*-etil-*N*-nitro-*N*-nitrozoguanidin (ENNG) ve TA102 suşu için de mitomisin C (MMC) olmak üzere 3 kimyasal kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, her iki türün çeşitli ekstraktlarının 2AA, ENNG ve MMC tarafından indüklenmiş mutajeniteyi farklı oranlarda engelleyici etkilerinin olduğu görülmüştür (Cariño-Cortés ve ark., 2007).

Cinnamomum zeylanicum (tarçın) kurutulmuş meyvelerinin çeşitli ekstraktlarının (etil asetat, aseton, metanol ve su) antimutajenik aktiviteleri Ames testi ile araştırılmıştır. Çalışma sonunda, bütün ekstraktların *S. typhimurium* TA100 suşunda sodyum azid (NaN₃) ile indüklenmiş mutajeniteyi azalttığı tespit edilmiştir. 5000 µg/plak konsantrasyonda bütün ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Ekstraktlar, sahip oldukları antimutajenik özelliklerine göre su>aseton>metanol>etil asetat şeklinde sıralanmışlardır (Jayaparakasha ve ark., 2007).

Acacia salicina (akasya) bitkisinin bakterilerde ve insan lenfoblast hücre kültürlerinde DNA hasarı ve mutasyon oluşumuna karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, *A. salicina* yapraklarından elde edilen üç çeşit ekstraktın (su, metanol ve etil asetat) Ames testinde benzo(a)piren ve comet testinde hidrojen peroksit mutajenlerine karşı antigenotoksik etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Su, metanol ve etil asetat ekstraktlarının sırasıyla 500, 50 ve 500 µg/plak dozlarında en yüksek antimutajenik etkiye sahip oldukları bulunmuştur. Comet testi sonuçlarına göre, metanol ve etil asetat ekstraktlarının belirli oranlarda DNA hasarını azaltmada etkili oldukları saptanmıştır (Bouhleb ve ark., 2008).

Kırmızı soğan (*Allium cepa*) kabuğunun çeşitli ekstraktlarının/fraksiyonlarının (toluen, diklorometan, etanol, dietil eter, etil asetat ve *n*-bütanol) antioksidan ve antimutajenik potansiyellerinin Ames testi ile araştırıldığı çalışma sonucunda, etil asetat ekstraktının doza bağlı olarak tütün ile indüklenmiş mutajeniteyi engellediği tespit edilmiştir (Singh ve ark., 2009).

Pistachia vera (Şam fıstığı, Antep fıstığı) yeşil kabuk ekstraktının antimutajenik aktivitesinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada Ames testi kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, *P. vera* bitkisine ait ham ve saflaştırılmış iki su ekstraktının antimutajenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Rajaei ve ark., 2010).

Punica granatum (nar) kabuğundan elde edilen fraksiyonların antimutajenik aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, öncelikle ekstraktların antioksidan özellikleri çeşitli testlerle belirlenmiş ve en güçlü antioksidatif fraksiyonun çeşitli *S. typhimurium* suşlarıyla test etmişlerdir. Antioksidan testleri sonuçlarına göre, fraksiyonlar metanol>etanol>aseton>etil asetat şeklinde sıralanmışlardır. Bu nedenle, *P. granatum* kabuğunun antimutajenik aktivitesinin belirlenmesi için metanol fraksiyonu seçilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, metanol fraksiyonunun doza bağlı olarak değişen oranlarda (%66.76-91.86) antimutajenik etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Zahin ve ark., 2010a).

Salmonella typhimurium bakterisinin TA98 suşunda ve insan karaciğer hücrelerinde (HepG2 hattı) *Rosmarinus officinalis* (biberiye) ekstraktlarının antigenotoksik ve antioksidan etkileri araştırılmıştır. Ames testinde, bu ekstraktların 4-nitroquinolin-*N*-oksit (NQNO) ve 2-amino-3-metil-3H-imidazo[4,5-F] quinolin (IQ) mutajenlerine karşı koruyucu etkisi test edilmiştir. Sonuçta, *R. officinalis* ekstraktlarının güçlü antioksidan, antimutajenik ve antigenotoksik özelliklere sahip olduğu saptanmıştır (Žegura ve ark., 2011).

Origanum vulgare L. ssp. *vulgare* bitkisinin antimutajenik potansiyeli Ames test sistemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla, bitkinin ham ekstraktı ile ondan elde edilen petrol eteri, kloroform, etil asetat, *n*-bütanol ve su fraksiyonları kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonunda, metanol ekstraktının ve onun *n*-bütanol fraksiyonunun önemli derecede antimutajenik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Güllüce ve ark., 2012).

Güney Afrika'da yaygın olarak kullanılan bazı tıbbi bitkilerin (*Rhamnus prinoides*, *Ornithogalum longibracteatum*, *Gardenia volkensii*, *Spirostachys africana*, *Diospyros whyteana*, *Syzigium cordatum* ve *Prunus africana*) mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri Ames ve mikronükleus testleri ile araştırılmıştır. Bu amaçla, bitkilerin farklı kısımlarından diklorometan ile elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır. Ames testinde ekstraktların hiçbirinde mutajenik aktivite gözlenmemekle birlikte, 4-nitroquinolin-1-oksit (4NQO) mutajenin etkisini engelleyici bir etkiye sahip olmadıkları da anlaşılmıştır. Mikronükleus testinde ise, bazı ekstraktların genotoksik etkiye sahip olduğu ve bazılarının da mitomisin C (MMC) mutajenin etkisini önemli derecede azalttıkları bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bu bitkilerin dikkatli bir şekilde kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (Verschaeve ve ark., 2004).

Ames testi ile *Cyperus rotundus*'un farklı ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri araştırılmıştır. Ekstraktların eldesinde su, etil asetat ve metanolden yararlanılmıştır. *S. typhimurium*'un TA98, TA100, TA1535 ve TA1538 suşlarının kullanıldığı çalışmada, ekstraktların mutajenik etkiye sahip olmadıkları bulunmuştur. Ayrıca, *C. rotundus*'un aflatoksin B1 (AFB1) ve sodyum azid (NaN₃) mutajenlerine karşı güçlü antimutajenik aktivite gösterdiği de belirlenmiştir (Kilani ve ark., 2005).

Güney Afrika'da yetişen 42 tıbbi bitki türünün diklorometan ve metanol (%90) ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri Ames testi ile değerlendirilmiştir. Yapılan testler sonucunda; *Helichrysum simillimum*, *H. herbaceum* ve *H. rugulosum* bitkilerine ait metanol ekstraktlarının mutajenik etkiye sahip oldukları bulunmuştur. Ayrıca, 6 türün (*Bauhinia galpinii*, *Clerodendrum myricoides*, *Datura stramonium*, *Buddleja saligna*, *Millettia sutherlandii* ve *Sutherlandia frutescens*) S9 varlığında antimutajenik özelliklere sahip oldukları saptanmıştır (Reid ve ark., 2006).

Myrtus communis (mersin) bitkisinin mutajenik ve antimutajenik özelliklerinin Ames testi ile araştırıldığı bir çalışmada, *M. communis* yapraklarından hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol ekstraktları elde edilmiştir. Yapılan testler sonucunda, ekstraktların hiçbirinde mutajenik etki gözlenmemiştir. Bununla birlikte, bütün ekstraktların antimutajenik aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiş olup en yüksek koruyucu etkinin etil asetat ve metanol ekstraktlarına ait olduğu belirtilmiştir (Hayder ve ark., 2008).

Brezilya'da çay olarak tüketilen *Vitex montevidensis*, *Gochnatia cordata* ve *G. polymorpha* bitkilerinin mutajenik ve antimutajenik aktivitelerinin Ames testi ile değerlendirildiği bir çalışma sonunda bu bitkilerin mutajenik aktiviteye sahip olmadıkları bildirilmiştir. *V. montevidensis* ekstraktının sodyum azid (NaN₃) ile indüklenen mutajeniteye karşı düşük bir antimutajenik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, üç bitki ekstraktının da S9 içermeyen ortamda 4-nitroquinolin-1-oksit mutajenin etkisini arttırdıkları görülmüştür. Ayrıca, S9 varlığında bütün ekstraktların 2-aminofloren (2AF) ile indüklenmiş mutajeniteye karşı önemli antimutajenik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Horn ve Vargas, 2008).

Ames testinde buğday kabuğu, karabuğday ve yulaf ekstraktlarının potansiyel mutajenik ve antimutajenik etkileri saptanmaya çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, buğday kabuğu ve karabuğday ekstraktlarının mutajenik aktivite göstermediği tespit edilmiş olup yulaf ekstraktının ise *S. typhimurium* TA102 suşunda zayıf mutajenik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Antimutajenite testinde direkt mutajen olarak 3-(5-nitro-2-füril) akrilik asit, 2-nitrofloren, hidrojen peroksit ve indirekt mutajen olarak aflatoksin B1 kullanılmıştır. Bu mutajenlere karşı bütün ekstraktların konsantrasyona bağlı olarak koruyucu etki gösterdikleri belirlenmiştir (Brindzová ve ark., 2009).

Çeşitli rahatsızlıkların (astım, bronşit ve göz nezlesi) tedavisinde kullanılan *Euphorbia hirta* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri Ames testi ile araştırılmıştır. Sonuçta, her iki ekstraktın da mutajenik etki göstermediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, su ekstraktının (100 µg/ml) ve metanol ekstraktlarının (10 ve 100 µg/ml) 2-aminoantrasen (2AA) mutajenine karşı S9 varlığında güçlü antimutajenik etki gösterdikleri saptanmıştır (Loh ve ark., 2009).

Nitraria retusa yapraklarının mutajenik, antimutajenik ve antioksidan potansiyellerinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin farklı ekstraktları (metanol, etil asetat, kloroform ve hekzan) test edilmiştir. *S. typhimurium*'un TA102 ve TA104 suşları kullanılarak yapılan mutajenite testleri negatif olarak sonuçlanmıştır. Ayrıca, metil metansülfonat (MMS) mutajenine karşı en yüksek koruma kloroform ve metanol ekstraktlarında gözlenmiştir. Kloroform ekstraktının %44.93, metanol ekstraktının da %38 oranında MMS'nin mutajenik etkisini ortadan kaldırdığı hesaplanmıştır. 2-Aminoantrasen ile indüklenen mutajeniteyi hekzan ekstraktının %83.4, kloroform ekstraktının ise %65.3 oranında azalttığı belirlenmiştir. (Boubaker ve ark., 2010).

Ames test sistemi ile *Amaranthus* sp., *Sorghum bicolor* ve *Echinochloa frumentacea* ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri araştırılmıştır. Ekstraktların antimutajenik özelliklerinin belirlenmesinde direkt mutajen olarak TA98 suşu için 2-nitrofloren (2NF), TA100 suşu için 3-(5-nitro-2-füril) akrilik asit (5NFAA), TA102 suşu için hidrojen peroksit (H₂O₂) ve indirekt mutajen olarak da aflatoksin B1 (AFB1) kullanılmıştır. Çalışma sonunda, test edilen bitki ekstraktlarının mutajenik aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, bütün ekstraktların 5NFAA mutajenine karşı antimutajenik aktiviteye sahip oldukları; ancak 2NF mutajenine karşı antimutajenik etki göstermedikleri tespit edilmiştir. H₂O₂ tarafından indüklenen mutajeniteyi en iyi engelleyen *Amaranthus* sp. olurken, en az engelleyen *Sorghum bicolor* olmuştur. Ayrıca, bütün ekstraktlar AFB1'e karşı antimutajenik etki göstermişlerdir (Mošovská ve ark., 2010).

Tayland'a özgü bazı bitkilerin (*Antigonon leptopus*, *Curcuma sessilis*, *Hibiscus rosasinensis*, *Ixora coccinea*, *Millingtonia hortensis*, *Nelumbo nucifera*, *Plumeria obtusa*, *Punica granatum*, *Rhinacanthus nasutus* ve *Syzygium malaccense*) çeşitli ekstraktlarının Ames testinde mutajenik ve antimutajenik potansiyelleri araştırılmıştır. Sonuçta, test edilen

bitkilerin mutajenik aktiviteye sahip olmadığı anlaşılmıştır. Bütün diklorometan ekstraktları antimutajenik etki göstermiş olup *Curcuma sessilis* ve *Punica granatum*'un metanol ekstraktlarının en yüksek antimutajenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Wongwattanasathien ve ark., 2010).

Baharat olarak kullanılan ve Hindistan'da tedavi amacıyla da yararlanılan *Carum copticum* bitkisinin meyve ekstraktlarının antioksidan, mutajenik ve antimutajenik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. En yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan metanol ekstraktı olmuştur. Bu sonuca bağlı olarak, antimutajenik potansiyelin test edilmesinde metanol ekstraktı seçilmiştir. Test için *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşları kullanılmıştır. Test sonuçlarına göre, *C. copticum* meyvesinin metanol ekstraktının (25-100 µg/plak) mutajenik etkiye sahip olmadığı anlaşılmıştır. Antimutajenik aktivite testinde ise, uygulanan doza bağlı olarak çeşitli oranlarda (%10.8-83.1) mutasyon oluşumunu engelleyici etkiler gözlenmiştir (Zahin ve ark., 2010b).

Acanthopanax divaricatus var. *albeofructus* bitkisinin mutajenik ve antimutajenik özellikleri Ames testi ile araştırılmıştır. Çalışma sonunda, bu bitkiden elde edilen ekstraktların hiçbirinde mutajenik etki görülmemiştir. Bununla birlikte, *A. divaricatus* var. *albeofructus*'un güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Hong ve ark., 2011).

Teucrium ramosissimum bitkisinin toprak üstü kısmından elde edilen ekstraktların mutajenik ve antimutajenik etkilerini değerlendirmek için Ames ile SOS kromotesti uygulanmıştır. Ames testi sonucunda, test edilen ekstraktların hiçbirinde mutajenite gözlenmezken çeşitli mutajenlere karşı (sodyum azid, aflatoksin B1, benzo(a)piren ve 4-nitro-*o*-fenilendiamin) antimutajenik aktivite gösterdikleri kanıtlanmıştır. SOS testi sonuçları da Ames testi sonuçlarını doğrular niteliktedir (Sghaier ve ark., 2011b).

Güney Afrika'da sıkça kullanılan tıbbi bitkilerden *Podocarpus* cinsine ait bazı türlerin mutajenik, antimutajenik ve sitotoksik potansiyellerinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkilerin yaprak ve kök ekstraktları test edilmiştir. Mutajenite ve antimutajenite deneyleri Ames testi ile yürütülmüştür. Sonuçta, ekstraktların hiçbirinde mutajenik aktivite gözlenmemiştir. Bununla birlikte, bütün ekstraktların doza bağlı olarak önemli derecede antimutajenik etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (Abdillahi ve ark., 2012).

Brezilya'ya özgü olan ve alternatif tıpta kullanılan *Baccharis dracunculifolia* bitkisinin mutajenik ve antimutajenik özellikleri Ames test sistemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla, *B. dracunculifolia* yapraklarının etil asetat ekstraktı ile ana bileşeni olan artepilin C fitokimyasalı test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, *B. dracunculifolia* ekstraktının ve artepilin C kimyasalının mutajenik olmadığı belirlenmiş olup antimutajenik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Resende ve ark., 2012).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Test edilen bitkiler

Bu çalışmada, potansiyel mutajenik ve antimutajenik özelliklerini belirlemek üzere *Sideritis trojana* Bornm. ve *Sideritis athoa* Papanikolaou & Kokkini bitkileri (Lamiaceae) kullanılmıştır (Şekil 4).

Kazdağları endemik türü *S. trojana* ile sadece belirli bir alanda yayılış gösteren nadir bitki türü *S. athoa*, çiçeklenme dönemlerinde (Ağustos 2011) Çanakkale semt pazarında köylülerden temin edilmiştir. Elde edilen bitki örnekleri Yrd. Doç. Dr. Ersin KARABACAK (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından teşhis edilmiştir. Bu çalışmada test edilen türlere ait örnekler, Vasküler Bitki Sistematiği ve Filogenisi Laboratuvarı'nda (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) muhafaza edilmektedir.



Şekil 4. (a) *S. trojana* Bornm. (kazdağı veya sarıkız çayı) ve (b) *S. athoa* Papanikolaou & Kokkini (kedikuyruğu veya kandil çayı) bitkileri.

3.1.2. Test suşları

Bu çalışmada, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar sonucu elde edilen TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar, Prof. Dr. Hülya SİVAS (Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından hediye edilmiştir. *S. typhimurium* TA98 suşu çerçeve kaymasına, TA100 suşu ise baz çifti değişimine neden olan mutasyonların belirlenmesinde kullanılmıştır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000) (Çizelge 1).

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* suşlarının genetik özellikleri

Suşlar	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	R Faktörü	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	pKM101	CG yanından – 1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	pKM101	AT→GC transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler

*LPS: Lipopolisakkarit, Δ : Delesyon

3.1.3. Kimyasal maddeler

Ekstraktların elde edilmesinde çözücü olarak kloroform (CHCl₃), aseton (CH₃COCH₃) ve metanol (CH₃OH) ROC kullanılmıştır. Pozitif kontrollerde ve antimutajenite deneylerinde kullanılan standart mutajenlerden 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) Sigma-Aldrich'den, sodyum azid (SA, NaN₃) ve 2-aminofloren (2AF) Merck'den satın alınmıştır. Bu kimyasalların haricinde, çalışmada magnezyum sülfat (MgSO₄.7H₂O), sitrik asit monohidrat, potasyum fosfat (K₂HPO₄), sodyum hidroksit (NaOH), dimetilsülfoksit (DMSO), sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), magnezyum klorür (MgCl₂.6H₂O), sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄.H₂O) ve disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄.2H₂O) (Merck); sodyum amonyum fosfat (NaH₂NH₄(PO₄.4H₂O)), glukoz, L-histidin, D-biyotin, glukoz-6-fosfat ve sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu Sigma-Aldrich; nutrient broth Oxoid ve agar Difco kullanılmıştır.

3.1.4. Stok çözeltiler ve besiyeleri

Vogel-Bonner E ortamı (50X VB tuz çözeltisi): Minimal glukoz agar (MGA), histidin/biyotin (HB) ve histidin/biyotin/ampisilin (HBA) agar plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

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

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde ılık distile suya yukarıdaki kimyasallar sırasıyla ilave edildi. Kimyasallardan biri tamamen çözünmeden diğerinin eklenmemesine dikkat edildi. Bütün kimyasallar suda çözüldükten sonra çözelti 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121 °C'de 20 dk sonunda steril hale getirildi. Steril tuz çözeltisi, oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edildi.

%20 Glukoz çözeltisi: MGA, HB ve HBA agar plaklarının hazırlanmasında karbon kaynağı olarak kullanıldı.

	<u>100 ml için</u>
Glukoz	20 g
Distile su	100 ml

Glukoz distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldü. 121 °C'de 20 dk otoklavda steril edildikten sonra 4 °C'de saklandı.

%0,5 Histidin çözeltisi: HB ve HBA agar plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

	<u>100 ml için</u>
L-Histidin	0.5 g
Distile su	100 ml

Histidin distile suda çözüldükten sonra 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi. Steril histidin çözeltisi 4 °C’de saklandı.

0,5 mM Biotin çözeltisi: HB ve HBA agar plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

100 ml için

D-Biotin (MA 244,3 g/mol) 0,01 g
Distile su 100 ml

Biotin, manyetik karıştırıcı üzerinde kaynama noktasına kadar ısıtılan suya ilave edildi. Tamamen çözüne kadar karıştırıldı. 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildikten sonra 4 °C’de muhafaza edildi.

0,02 N NaOH çözeltisi: Ampisilin çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

100 ml için

Sodyum hidroksit (NaOH) (MA 40 g/mol) 0,08 g
Distile su 100 ml

NaOH bir miktar su içerisinde çözünür ve son hacim 100 ml’ye tamamlanır.

(%0,8/0,02 N NaOH) Ampisilin çözeltisi: Test suşlarında pKM101 plazmidi varlığının kontrolünde ve bu plazmidi taşıyan suşların master plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

100 ml için

Ampisilin trihidrat 0,8 g
0,02 N NaOH 100 ml

Ampisilin trihidrat 0,02 N NaOH içinde çözüldü. 0,2 µm çaplı membran filtreden geçirilerek steril edildi ve cam şişe içinde 4 °C’de saklandı.

Histidin/biyotin/ampisilin (HBA) agar: Çalışmada kullanılan test suşlarının ampisiline dirençlilik özelliklerinin kontrolünde ve master plakların hazırlanmasında kullanıldı.

	<u>500 ml için</u>
Agar	7,5 g
Distile su	450 ml
50X VB tuz çözeltisi	10 ml
%20 Glukoz çözeltisi	50 ml
%0,5 Histidin çözeltisi	5 ml
0,5 mM Biyotin çözeltisi	3 ml
(%0,8/0,02 N NaOH) Ampisilin çözeltisi	1,575 ml

Bir litrelik temiz bir erlen içerisine aktarılan agar ve su otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkarılan agarlı su karışımının yaklaşık 65 °C'ye kadar soğuması beklendi. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan solüsyona steril 50X VB tuz, glukoz ve histidin çözeltilerinden belirtilen miktarlarda yavaşça ilave edildi. Yaklaşık 45 °C sıcaklıktaki karışıma steril biyotin ve ampisilin çözeltilerinden sırasıyla eklendi. 500 ml'ye tamamlanan karışım 25 ml/plak olacak şekilde paylaştırıldı. Test suşları bu plaklarda 4 °C'de yaklaşık 2 ay süre ile saklanabilmektedir.

Nutrient broth (NB): Test suşlarının gecelik kültürde üretilmeleri için kullanıldı.

	<u>200 ml için</u>
Nutrient broth (Oxoid, No:2)	5 g
Distile su	200 ml

Toz halindeki nutrient broth distile suya ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözünmesi sağlandı. Karışım, 50 ml erlenlere 20'şer ml olacak şekilde dağıtıldı. Otoklavda 121 °C'de 20 dk sonunda steril hale getirilen sıvı besiyerleri, oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

Nutrient agar (NA): Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısının bulunması ve genotip kontrolü (UV ve kristal viyole hassasiyeti) için kullanıldı.

<u>500 ml için</u>	
Nutrient broth (Oxoid, No:2)	12,5 g
Agar	7,5 g
Distile su	500 ml

Nutrient broth ve agar distile suya ilave edilip karıştırıldı. Karışım otoklavda 121 °C'de 20 dk sonunda steril hale getirildi. Eşit miktarda olacak şekilde (yaklaşık 25 ml) steril petrilere döküldü. Ortamın katılaşması beklendikten sonra, plaklar buzdolabına (4 °C) kaldırıldı.

Minimal glukoz agar (MGA): Test suşlarının histidin gereksinimi kontrolünde, mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanıldı.

<u>1000 ml için</u>	
Agar	15 g
Distile su	830 ml
50X VB tuz çözeltisi	20 ml
%20 Glukoz çözeltisi	100 ml

Agar ve distile su karıştırılıp otoklavda steril edildi. Biraz soğuduktan sonra, steril 50X VB tuz çözeltisinden ilave edilip karıştırıldı. Daha sonra, steril glukoz çözeltisinden de yeterli miktarda eklendi ve karışım 1000 ml'ye tamamlandı. Uygun sıcaklığa (40-45 °C) ulaşan besiyeri petrilere döküldü. Ortam katılaştıktan sonra, buzdolabında (4 °C) muhafaza edildi.

Histidin/biyotin (HB) agar: Test suşlarının histidin gereksinimi kontrolünde kullanıldı.

500 ml için

Agar	7,5 g
Distile su	420 ml
50X VB tuz çözeltisi	10 ml
%20 Glukoz çözeltisi	50 ml
%0,5 Histidin çözeltisi	5 ml
0,5 mM Biyotin çözeltisi	3 ml

Agar ve distile su karıştırılıp otoklavda 121 °C’de 20 dk steril edildi. Yaklaşık 50 °C’ye kadar soğuması beklendikten sonra, steril VB tuz, glukoz ve histidin çözeltileri yavaşça eklendi. Son olarak biyotin çözeltisi ilave edilen karışımın son hacmi, distile su ile 500 ml’ye tamamlandı. Her petride 25 ml olacak şekilde paylaştırıldı.

0,5 mM Histidin/biyotin çözeltisi: Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında top agara ilave edilerek kullanıldı.

500 ml için

L-Histidin.HCl (MA 191,7 g/mol)	0,048 g
D-Biyotin (MA 244,3 g/mol)	0,062 g
Distile su	500 ml

Kaynama noktasına kadar ısıtılan suya biyotin ilave edildi ve tamamen eridikten sonra histidin eklendi. Çözeltinin sterilizasyonu 0,2 µm çaplı membran filtre ile yapıldıktan sonra cam şişede 4 °C’de saklandı.

Top (üst) agar: Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında kullanıldı.

1000 ml için

Agar (Difco)	6 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g

Distile su 1000 ml

Agar ve NaCl, distile suya ilave edildi ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla agarın iyice çözünmesi sağlandı. 2 ml olarak cam tüplere aktarılan ortam, otoklavlanarak steril edildi. Otoklavdan çıkarılan tüpler su banyosuna (43 °C) alındı.

%0,1 Kristal viyole çözeltisi: Test suşlarında *rfa* mutasyonu varlığının kontrolü için kullanıldı.

100 ml için

Kristal viyole 0,1 g

Distile su 100 ml

Kristal viyole ve distile su iyice karıştırılıp ışık geçirmeyen koyu renkli bir cam şişede 4 °C'de saklandı.

%0,9 Tuz çözeltisi (serum fizyolojik) : Bakteri kültürlerinin seyreltilmesinde kullanıldı.

500 ml için

NaCl 4,5 g

Distile su 500 ml

Hazırlanan çözelti otoklavda steril edildi.

0,1 µg/µl 4-Nitro-*o*-fenilendiamin (NPD): S9 yokluğunda TA98 suşu için pozitif kontrol ve antimutajenite deneylerinde direkt mutajen olarak kullanıldı.

10 ml için

NPD 1 mg

Dimetilsülfoksit (DMSO) 10 ml

NPD, DMSO'da çözülüp 0,2 µm'lik membran filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi. Deneylerde 10 µg/plak olacak şekilde kullanıldı.

0,01 µg/µl Sodyum azid (SA): S9 yokluğunda TA100 suşu için pozitif kontrol ve antimutajenite deneylerinde direkt mutajen olarak kullanıldı.

10 ml için

SA (NaN ₃)	0,1 mg
Distile su	10 ml

NaN₃, distile suda çözülüp 0,2 µm'lik membran filtreden geçirildi. 4 °C'de muhafaza edildi. Deneylerde 1 µg/plak olacak şekilde kullanıldı.

0,05 µg/µl 2-Aminofloren (2AF): S9 varlığında her iki suş için pozitif kontrol amacıyla ve antimutajenite deneylerinde indirekt mutajen olarak kullanıldı.

10 ml için

2AF	0,5 mg
DMSO	10 ml

2AF, DMSO'da çözülüp 0,2 µm'lik membran filtreden geçirildi. 4 °C'de muhafaza edildi. Deneylerde 5 µg/plak olacak şekilde kullanıldı.

0,2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH=7,4): S9 karışımında kullanılmak üzere hazırlandı.

250 ml için

0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	30 ml
(6,9 g/250 ml) (MA 137,99 g/mol)	
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	220 ml
(8,9 g/250 ml) (MA 177,99 g/mol)	

Ayrı ayrı hazırlanan 0,2 M'lık iki solüsyon, yukarıda belirtilen miktarlarda kapaklı cam bir şişede karıştırıldı. pH'ı 7,4'e ayarlandıktan sonra, otoklavda 121 °C'de 20 dk sonunda steril hale getirildi.

0,1 M β -NADP çözeltisi: S9 karışımında kullanılmak üzere hazırlandı.

5 ml için

β -NADP (MA 765,4 g/mol)	0,383 g
Steril distile su	5 ml

Suda çözülen β -NADP 0,2 μ m por çaplı membran filtre ile steril edildi.

1 M Glukoz-6-fosfat çözeltisi: S9 karışımında kullanılmak üzere hazırlandı.

5 ml için

Glukoz-6-fosfat (MA 260,13 g/mol)	1,3 g
Steril distile su	5 ml

Suda çözülen glukoz-6-fosfat 0,2 μ m por çaplı membran filtre ile steril edildi.

Tuz çözeltisi (0,4 M $MgCl_2$ +1,65 M KCl): S9 karışımında kullanılmak üzere hazırlandı.

50 ml için

Magnezyum klorür ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (MA 203,3 g/mol)	4,07 g
Potasyum klorür (KCl) (MA 74,55 g/mol)	6,15 g
Distile su	50 ml

$MgCl_2$ ve KCl tuzları suda çözüldükten sonra 121 °C'de 20 dk sonunda otoklavda steril edildi. Cam şişeye alınan çözelti 4 °C'de muhafaza edildi.

S9 Karışımı (sıçan karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörleri): Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde metabolik aktivasyon amacıyla kullanıldı.

50 ml için

Steril distile su	19,75 ml
0,2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH=7,4)	25 ml
0,1 M β -NADP çözeltisi	2 ml

1 M Glukoz-6-fosfat çözeltisi	0,25 ml
MgCl ₂ -KCl tuz çözeltisi	1 ml
Sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml

Öncelikle distile su, tampon ve çözeltiler yazıldıkları sıraya göre ilave edildi. S9 fraksiyonu, karışıma en son eklendi. S9 karışımı çalışmalara başlamadan hemen önce taze olarak hazırlandı ve deney boyunca buz içinde tutuldu.

3.2. Yöntem

Bu çalışma için temin edilen suşların genetik özelliklerinin kontrolü, master plaklarının ve stok kültürlerinin hazırlanması, mutajenite ve antimutajenite çalışmaları Maron ve Ames (1983)'in geliştirdiği standart plak inkorporasyon yöntemine uygun olarak yapıldı.

3.2.1. Ekstraktların elde edilmesi

Bu çalışmada, mutajenik ve antimutajenik potansiyelleri belirlenmek üzere *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen ekstraktlar kullanıldı. Bunun için, farklı polariteye sahip çözücülerden yararlanıldı. Ekstraktlar elde edilmeden önce, bitkilerin toprak üstü kısımları gölgede, devamlı hava akımı olan, serin bir ortamda kurutuldu. 1-3 mm'lik küçük parçalara ayrılan kuru bitkiler, soksilet cihazında (Wisd, Wise Therm) (Şekil 5a) ekstrakte edildi. 20 g bitki için 200 ml çözücü kullanıldı. 8 saat süren ekstraksiyon sonunda, filtre kağıdı ile sarılı bitki parçaları cihazdan çıkartılıp etüvde kurumaya bırakıldı. Bu şekilde çözücüsünden arındırılan bitki örneği, polaritesi daha yüksek olan ikinci çözücü ile ekstrakte edilmeye hazır hale getirildi. Ekstraksiyon sırasıyla kloroform (CHCl₃, kaynama noktası (KN) 61,2 °C), aseton (CH₃COCH₃, KN 56 °C) ve metanol (CH₃OH, KN 64,7 °C) ile yapıldı. Bitkilerin tüketim şekli dikkate alınarak, su ekstraktlarının eldesi için ayrı örnekler hazırlandı. Daha sonra, evaporatör (Spektral, Heidolph, Laborota 4001) (Şekil 5b) yardımıyla ekstraktların yaklaşık 50 °C'de çözücüleri uçuruldu. Etüve (50 °C) konulan ekstraktlar çözücülerinden tamamen arındırıldı. Elde edilen ham ekstraktlar buzdolabında (0-4 °C) muhafaza edildi. Test edilmeden önce DMSO'da (su ekstraktları hariç) ve suda çözümlenerek farklı konsantrasyonları hazırlanan ekstraktlar, membran filtre (0,2 µm) ile steril edildi (Kaur ve ark., 2002; Boubaker ve ark., 2010).



Şekil 5. Ekstraktların elde edilmesinde kullanılan cihazlar. (a) Soksilet ve (b) Evaporatör.

3.2.2. Ekstraktların verimlilik oranlarının belirlenmesi

Çalışmada mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri test edilen *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen farklı ekstraktların verimlilik oranları % olarak belirlendi (Çizelge 2). Bunun için, ekstraksiyona başlamadan önce bitki parçalarının konulduğu filtre kağıdının ağırlığı tespit edildi. 20 g bitki filtre kağıdı ile sarılarak soksilet cihazına yerleştirildi. Ekstraksiyon sonrası etüvde kurutulan bitki örneği, hassas terazide tartıldı. Aradaki fark % cinsinden hesaplandı.

3.2.3. Test suşlarının genetik özelliklerinin kontrol edilmesi

Çalışmanın güvenilirliği bakımından, deneylerde istenilen genetik özelliklere sahip suşların kullanıldığıının kanıtlanması gerekmektedir. Bu amaçla test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olup olmadıkları aşağıda yer alan testler ile sürekli kontrol edilmiştir.

3.2.3.1. Histidin gereksinimi

Ames testinde kullanılacak olan *Salmonella* suşlarının öncelikle histidin oksotrofu (*his⁻*) olduklarının doğrulanması gerekmektedir. Histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş

mutant test suşları, bu aminoasidi içermeyen minimal glukoz agar (MGA) plaklarında üreyemezken histidin/biyotin (HB) agar plaklarında üreyebilmektedirler. Bu amaçla, HB agar ve bir miktar biyotin içeren MGA plakları kullanıldı. Bir gece nutrient broth (NB)'da üretilen taze kültürden HB agar ve MGA plaklarına çizgi ekim yapıldı. Plaklar, 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.2. *rfa* mutasyonu

Test suşlarının *rfa* taşıyıp taşımadıkları kristal viyole hassasiyeti testi ile belirlendi. Bu test için nutrient agar (NA) plakları kullanıldı. Gecelik kültürleri (12-16 saat) hazırlanan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 test suşları, mikropipet yardımıyla 100 µl olarak plaklara ekildi. Filtre kağıdından elde edilen 0,5 cm çaplı steril disklerden biri plağın ortasına yerleştirildi. %0,1'lik kristal viyole çözeltisinden 10 µl alınıp diske emdirildi. Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, disklerin etrafında şeffaf olarak gözlenen yaklaşık 14 mm'lik bir inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Üremenin olmadığı bu şeffaf alan, normalde hücre duvarından geçemeyecek büyüklükteki kristal viyole boya moleküllerinin *rfa* taşıyan bakteri hücrelerine girmesi sonucu oluşmaktadır (Ames ve ark., 1973).

3.2.3.3. *uvrB* mutasyonu

Test suşlarının *uvrB* taşıyıp taşımadıkları UV hassasiyeti testi ile belirlendi. Bu test için de NA plakları kullanıldı. Gecelik kültürden eküvyonla NA plağına paralel çizgiler şeklinde ekim yapıldı. Petrinin kapağı açılıp yarısı bu çizgileri kesecek şekilde plastik bir tabaka ile kapatıldı. Plaklar, 30 watt'lık germisidal UV lambası ile 33 cm yükseklikten 8 sn ışınlar maruz bırakıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sadece plağın yarısında (UV ışını alması önlenen kısımda) üreme olduğu görüldüğünde, bu suşların *uvrB* delesyonu taşıdıkları anlaşılmaktadır (Ames ve ark., 1973).

3.2.3.4. R faktörü

Ampisilin direnç faktörünü (R faktörü) içeren pKM101 varlığının kontrolü için, test suşları histidin/biyotin/ampisilin (HBA) plaklarına ekildi. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonucunda HBA plaklarında üremeyi başaranlar, pKM101 plazmidini taşıyan suşlardır.

3.2.4. Test suşlarının master plaklarının hazırlanması

Bakteri kültürlerinden HBA plaklarına çizgi ekim yapıldı. Plaklar, 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, iyi izole olmuş ve normal büyüklüğe sahip bir koloni seçildi. Bu koloni öze ile alınarak ampisilin çözeltisi (6,3 µl) içeren 2 ml NB ortamına ekildi ve 37 °C’de 12 saat inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan taze gecelik kültürden tekrar HBA plaklarına ekim yapıldı ve 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elde edilen master plaklar buzdolabında (4 °C) muhafaza edildi.

3.2.5. Test suşlarının uzun süre saklanması ve stok kültürlerinin açılması

Test suşları, canlılıklarının ve sahip oldukları genetik özelliklerin uzun süre korunabilmesi amacıyla -80 °C’de saklandı. Bunun için, genetik kontrolleri yapılarak HBA plaklarına ekilen suşlardan iyi izole olmuş, normal büyüklüğe sahip bir koloni seçilip 2 ml NB’da gecelik kültür hazırlandı. Suşların ampisiline direnç özelliklerinin kaybolmaması için, NB içerisine ampisilin çözeltisinden (6,3 µl) ilave edildi. 37 °C’de 12 saatlik inkübasyondan sonra, 0,1 ml DMSO içeren steril ependorf tüplerine bakteri kültüründen 0,9 ml eklendi. Sıvı azota daldırılan tüpler, daha sonra derin dondurucuya (-80 °C) kaldırıldı.

Test suşlarının stok kültürlerinin açılması için, öncelikle -80 °C’de tutulan bakteri kültürünün oda sıcaklığında erimesi sağlandı. Hemen bir öze yardımıyla ampisilin içeren NB ortamına ekilen bakteriler, 37 °C’de 12 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda, HBA plaklarına paralel ekimleri yapıp 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. Bu plaklarda üreyen test suşlarından iyi izole olmuş bir koloni ile gecelik kültür hazırlandı. 37 °C’de 12 saat inkübe edilen NB tüplerinden tekrar HBA plaklarına ekim yapıldı.

3.2.6. Test suşlarının gecelik kültürlerinin hazırlanması

Test suşlarının gecelik kültürleri, genetik kontrolleri yapılarak hazırlanan master plaklardan ya da -80 °C’de saklanmış kalıcı kültürlerden elde edildi. Nutrient broth (NB, Oxoid, No:2) ile hazırlanan gecelik kültürlerle, bir miktar (20 ml NB için 63 µl) ampisilin çözeltisi ilave edildi. Bu şekilde hazırlanan ortamda test suşları, 37 °C’de 140 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda, gecelik kültürden 0,5 ml taze ortama aktarılan bakteriler 37 °C’de 110 rpm’de 6 saat inkübe edildi (Akın, 2010). Çalışmada, yaklaşık

1-2x10⁹ koloni oluşturan birim (kob)/ml yoğunluğa sahip bakteri kültürleri kullanıldı.

3.2.7. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında kullanılan gecelik sıvı kültürlerin ml'sinde bulunan bakteri miktarı, spektrofotometre (OD₅₄₀ ~ 0,1-0,2) ve buna paralel olarak yapılan ekimler ile belirlendi. Ekimler için bir dizi seyreltme (10⁻¹-10⁻⁷) yapıldı. Bakteri yoğunluğunun seyreltilmesi için serum fizyolojik (%0,9 NaCl çözeltisi) kullanıldı. Her seyreltmeden 0,1 ml alınıp 43 °C'de tutulan 2 ml top agara ilave edildi. Yavaşça karıştırıldıktan sonra NA plaklarına döküldü. Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda koloniler sayıldı ve aşağıdaki formüle göre ml'deki canlı bakteri sayısı tespit edildi.

1 ml'de bulunan canlı hücre sayısı (kob/ml) = sulandırma faktörü x plaktaki koloni sayısı x 10

3.2.8. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarına başlamadan önce, bitki ekstraktlarının test edilecek dozlarının sitotoksik olup olmadığı belirlendi. Yapılan bu ön çalışma ile iki türe ait kloroform, aseton, metanol ve su ekstraktlarının farklı dozları (100, 50 ve 25 mg/plak) deneylerde kullanılacak mutant suşlar üzerinde test edildi. Ortalama revertant koloni sayıları ile spontan kontroldeki ortalama koloni sayıları karşılaştırılarak test edilen dozların sitotoksik etkiye sahip olup olmadığı değerlendirildi (Dean ve ark., 1985). Sonuçta, bu dozların çalışma için uygun olduğu tespit edildi. Çalışmanın geniş spektrumlu olması gerektiği düşünüldüğünden, mutajenite deneylerinde kullanılacak dozların 100, 20, 4, 0,8 ve 0,16 mg/plak ve antimutajenite deneylerinde kullanılacak dozların 800, 160, 32, 6,4 ve 1,28 µg/plak olmasına karar verildi.

3.2.9. Mutajenite çalışmaları

S. trojana ve *S. athoa* bitkilerinin potansiyel mutajenik aktiviteleri, standart plak inkorporasyon metoduna dayalı Ames test sistemi ile araştırıldı. Mutajenite çalışmasında, iki bitki türüne ait kloroform, aseton, metanol ve su ekstraktlarının 5 dozu (100, 20, 4, 0,8 ve 0,16 mg/plak) kullanıldı. Deneyler, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile yürütüldü. Çalışmalar hem metabolik aktivasyon varlığında (S9 +) hem de yokluğunda

(S9 -) yapıldı.

Mutajenite çalışmasında 43 °C’de tutulan 2 ml top agara (HB çözeltisi ilaveli) sırasıyla 500 µl sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı, 100 µl bitki ekstraktı ve 100 µl bakteri kültürü eklenip yavaşça karıştırılarak MGA plaklarına döküldü. Bu plaklar 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geri dönen bakteri kolonileri (his⁺ revertantlar) sayıldı.

Mutajenik potansiyeli test edilen bitki ekstraktlarının her dozu üç ayrı plağa ekildi ve çalışmalar birbirinden bağımsız iki deney şeklinde uygulandı. Çalışmaya paralel olarak pozitif, negatif ve spontan kontroller yapıldı.

3.2.10. Antimutajenite çalışmaları

S. trojana ve *S. athoa* bitkilerinin potansiyel antimutajenik aktiviteleri, standart plak inkorporasyon metoduna dayalı Ames test sistemi ile araştırıldı. Antimutajenite çalışmasında, iki bitki türüne ait kloroform, aseton, metanol ve su ekstraktlarının 5 dozu (800, 160, 32, 6,4 ve 1,28 µg/plak) kullanıldı. Deneyler, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile yürütüldü. TA98 suşu çerçeve kaymasına, TA100 suşu ise baz çifti değişimine neden olan kimyasallara karşı iki bitki türünün koruyucu/inhibe edici etkilerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Çalışmalar hem metabolik aktivasyon varlığında (S9 +) hem de yokluğunda (S9 -) yapıldı.

Antimutajenite çalışmasında 43 °C’de tutulan 2 ml top agara (HB çözeltisi ilaveli) sırasıyla 500 µl sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı, 100 µl bitki ekstraktı, 100 µl bakteri kültürü ve 100 µl standart mutajen eklenip yavaşça karıştırılarak MGA plaklarına döküldü. Bu plaklar 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geri dönen bakteri kolonileri (his⁺ revertantlar) sayıldı.

Antimutajenik potansiyeli test edilen bitki ekstraktlarının her dozu üç ayrı plağa ekildi ve çalışmalar birbirinden bağımsız iki deney şeklinde uygulandı. Çalışmaya paralel olarak pozitif, negatif ve spontan kontroller yapıldı.

3.2.11. Pozitif kontrol

Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında standart mutajenler olarak, S9 yokluğunda (S9 -) *S. typhimurium* TA98 suşu için 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) ve TA100 suşu için sodyum azid (SA, NaN₃) kullanıldı. S9 varlığında (S9 +) ise, her iki suş için 2-aminofloren (2AF) pozitif kontrol olarak uygulandı. Deneyleerde NPD 10 µg/plak, SA 1 µg/plak ve 2AF 5 µg/plak olacak şekilde kullanıldı.

Pozitif kontrolde 43 °C’de tutulan 2 ml top agara (HB çözeltisi ilaveli) sırasıyla 500 µl sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı, 100 µl standart mutajen ve 100 µl bakteri kültürü eklenip yavaşça karıştırılarak MGA plaklarına döküldü. Bu plaklar 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geri dönen bakteri kolonileri (his⁺ revertantlar) sayıldı.

3.2.12. Negatif kontrol

Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında kullanılan standart mutajenleri ve test edilen bitki ekstraktlarını çözmek amacıyla dimetilsülfoksit (DMSO) ve su kullanılmıştır. Negatif kontrol (solvent kontrol), DMSO ve suyun geriye dönen (his⁺) bakteri sayısı üzerine bir etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Negatif kontrolde 43 °C’de tutulan 2 ml top agara (HB çözeltisi ilaveli) sırasıyla 500 µl sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı, 100 µl DMSO veya su, 100 µl bakteri kültürü eklenip yavaşça karıştırılarak MGA plaklarına döküldü. Bu plaklar 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geri dönen bakteri kolonileri (his⁺ revertantlar) sayıldı.

3.2.13. Spontan kontrol (kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü)

Çalışmada kullanılan his⁻ özellikte *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları, belirli sınırlar içerisinde kendiliğinden (spontan) his⁺ hale gelebilmektedirler. Bu sınırlar TA98 suşu için 20-50 revertant/plak, TA100 suşu için ise 75-200 revertant/plak’tır (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Spontan kontrolde 43 °C’de tutulan 2 ml top agara (HB çözeltisi ilaveli) sırasıyla 500 µl sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı ve 100 µl bakteri kültürü eklenip yavaşça

karıştırılarak MGA plaklarına döküldü. Bu plaklar 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geri dönen bakteri kolonileri (his⁺ revertantlar) sayıldı.

3.2.14. Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan bitkilerin mutajenik aktiviteye sahip olup olmadığını belirleyebilmek için deney grupları negatif kontrolle karşılaştırılmıştır. Mutajenik etkiden söz edebilmek için, test edilen ekstraktların farklı dozlarının uygulanması sonucu elde edilen geri dönen (revertant) koloni sayısının negatif kontrole oranla iki katı olması gerekmektedir. Doza bağlı olarak koloni sayısında bir artış gözlenmesi durumunda ise, zayıf mutajenik aktiviteden bahsedilmektedir (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Antimutajenite çalışmaları sonucunda, test edilen bitki ekstraktlarının mutajenik aktivitesini engelleyici etkisi (inhibisyon oranı) %25’in altında olduğunda antimutajenik olarak kabul edilmemiştir. İnhibisyon oranı %25-40 olan ekstraktlar orta dereceli, %40’tan fazla olanlar ise güçlü antimutajenik olarak tanımlanmıştır (Ikken ve ark., 1999; Negi ve ark., 2003).

Ekstraktların inhibisyon oranları Hong ve Lyu (2011)’nin verdiği formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon Oranı (\%)} = \frac{A-B}{A-C} \times 100$$

A: Pozitif kontrolde (sadece mutajen varlığında) geri dönen koloni sayısı/plak

B: Bitki ekstraktı ve mutajen varlığında geri dönen koloni sayısı/plak

C: Spontan koloni sayısı/plak

Çalışma sonunda elde edilen verilerin ortalamaları alınarak standart sapmaları hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4**ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1. Ekstraktların Verimlilik Oranları**

S. trojana ve *S. athoa* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen kloroform, aseton, metanol ve su ekstraktlarının verimlilik oranları % olarak hesaplandı (Çizelge 2).

Çizelge 2. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinin farklı ekstraktlarının verimlilik oranları

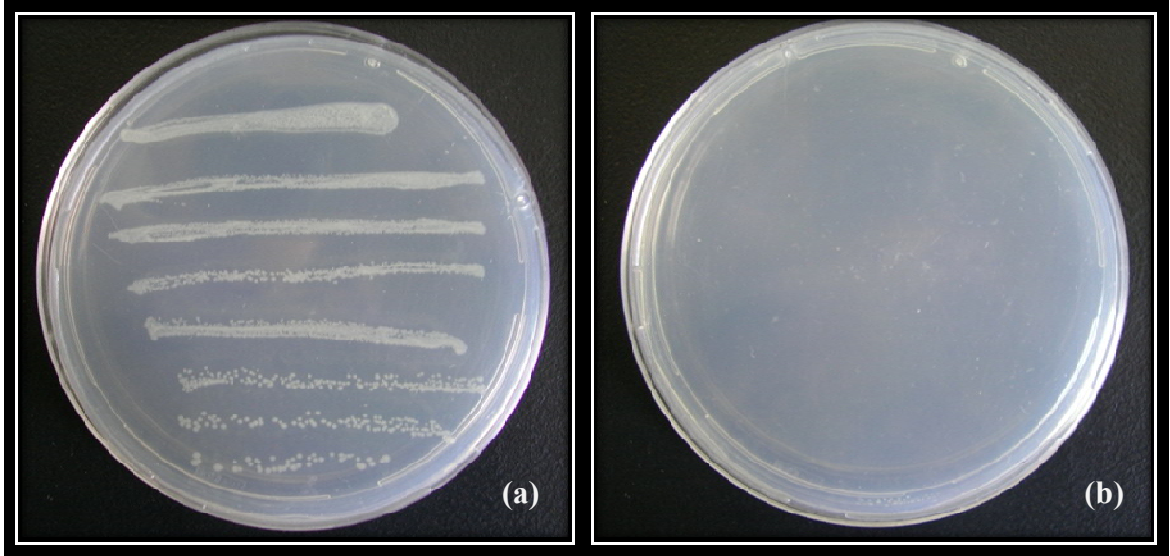
	<i>S. trojana</i>	<i>S. athoa</i>
Kloroform	%1,02	%1,98
Aseton	%7,2	%7,36
Metanol	%19	%18,58
Su	%9,27	%10,75

4.2. Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü

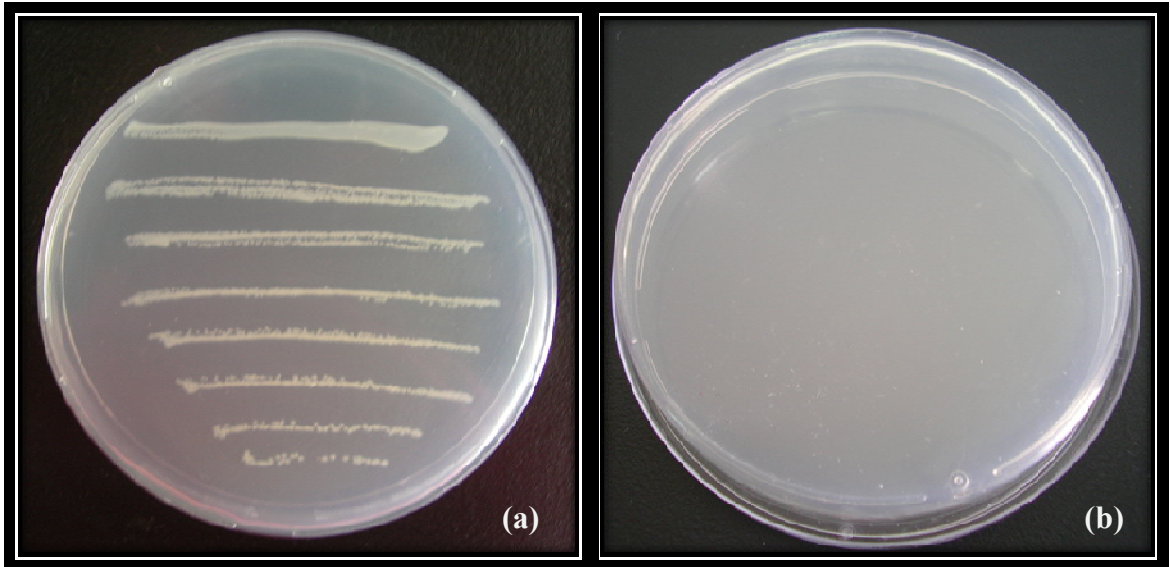
Çalışmada kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının orjinal genetik özelliklere sahip olup olmadıkları her aşamada kontrol edildi. Yapılan genetik kontroller sonucunda, iki test suşunun da mutajenite ve antimutajenite çalışmaları için uygun olduğu gözlemlendi.

4.2.1. Histidin gereksinimi

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşları, histidin/biyotin agar (HB) ve bir miktar biyotin içeren minimal glukoz agar (MGA) plaklarına ekildi. Her iki suş da HB plaklarında üreme gösterirken, histidin içermeyen MGA plaklarında üremedi. Böylece, bu suşların histidin gereksinimi özellikte oldukları doğrulandı (Şekil 6 ve 7).



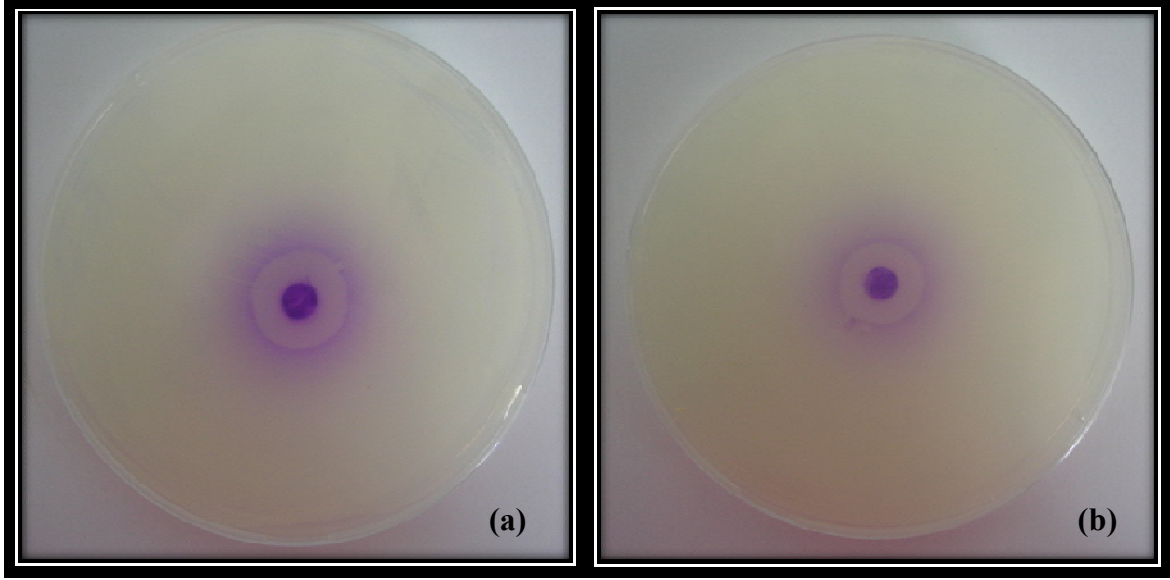
Şekil 6. *S. typhimurium* TA98 suşunun (a) HB ve (b) MGA plaklarında üreme durumları.



Şekil 7. *S. typhimurium* TA100 suşunun (a) HB ve (b) MGA plaklarında üreme durumları.

4.2.2. *rfa* mutasyonu

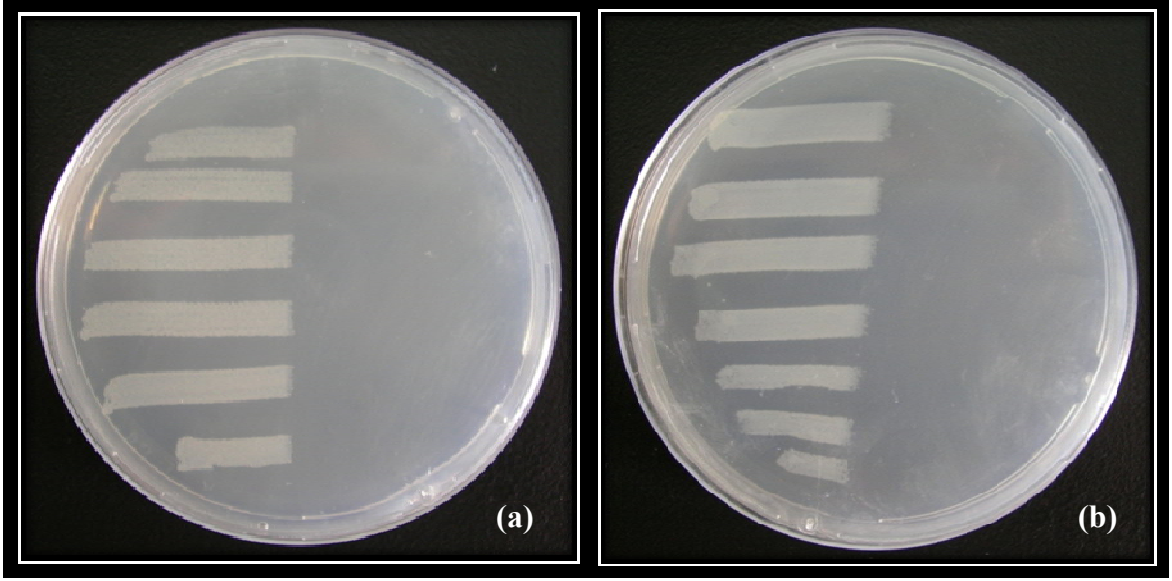
S. typhimurium TA98 ve TA100 suşlarına kristal viyole hassasiyeti testi uygulandı. Test sonucunda, kristal viyole çözeltisi emdirilmiş disklerin etrafında şeffaf bölge (14 mm) görüldü. Böylece, her iki suşun *rfa* taşıdığı doğrulanmış oldu (Şekil 8).



Şekil 8. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarına uygulanan kristal viyole hassasiyeti testi sonuçları.

4.2.3. *uvrB* mutasyonu

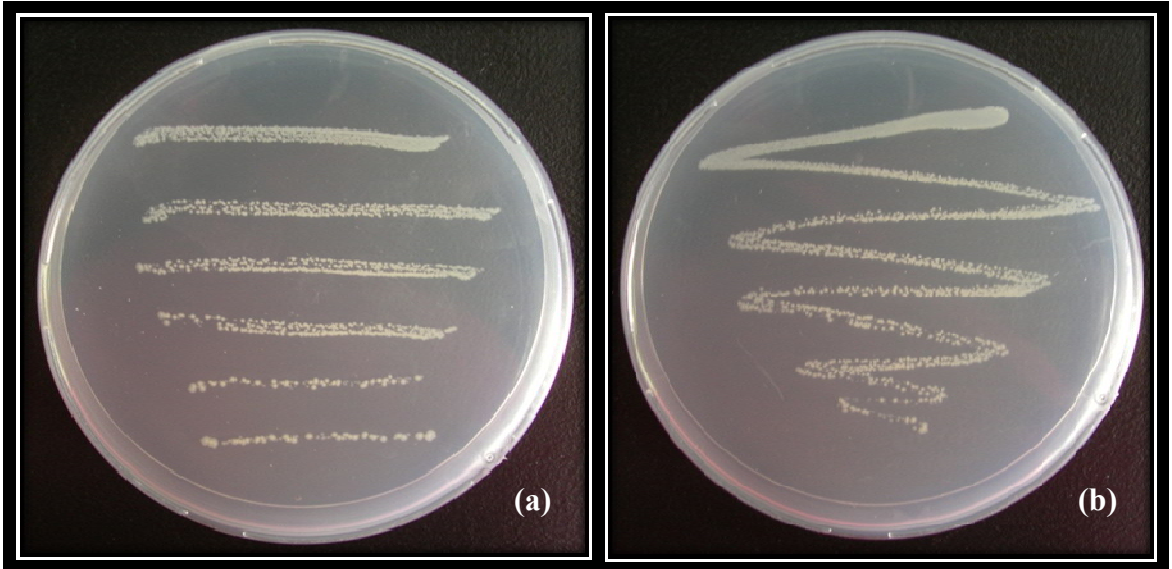
S. typhimurium TA98 ve TA100 suşlarına ultraviyole hassasiyeti testi uygulandı. Test sonucunda suşların petrinin UV'ye maruz bırakılan kısmında üremedikleri, üzeri kapatılan kısmında üredikleri görüldü. Böylece, bu suşların *uvrB* delesyonu taşıdıkları doğrulandı (Şekil 9).



Şekil 9. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarına uygulanan ultraviyole hassasiyeti testi sonuçları.

4.2.4. R faktörü

Test suşlarında ampisilin direnç geni taşıyan pKM101 plazmidlerinin varlığı, bakterilerin histidin/biyotin/ampisilin (HBA) plaklarında üremeleri sonucu kanıtlandı (Şekil 10).



Şekil 10. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarının HBA plaklarında üreme durumu.

4.3. Mutajenik Aktivite Sonuçları

Bu çalışmada, *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinin mutajenik etkiye sahip olup olmadıkları Ames (*Salmonella*/mikrozom) testi ile saptanmaya çalışıldı. Bu amaçla bitkilerden kloroform, aseton, metanol ve su ekstraktları elde edilmiş olup her ekstrakt için 5'er doz (100, 20, 4, 0,8 ve 0,16 mg/plak) test edildi. Her doz üç ayrı plağa ekildi ve çalışmalar birbirinden bağımsız iki deney şeklinde uygulandı. Deneyler, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile hem S9 (+) hem de S9 (-) yapıldı. Çalışmalara paralel olarak pozitif, negatif ve spontan kontroller de uygulandı. Pozitif kontrolde S9 (-) TA98 suşu için 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD), TA100 suşu için ise sodyum azid (SA) ve S9 (+) her iki suş için de 2-aminofloren (2AF) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak NPD 10 µg/plak, SA (NaN₃) 1 µg/plak ve 2AF 5 µg/plak olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrolde ekstraktların çözücülerini (DMSO ve su) kullanıldı. Mutajenite araştırmaları sonunda elde edilen bulgular *S. trojana* için Çizelge 3'te, *S. athoa* için Çizelge 4'te verildi.

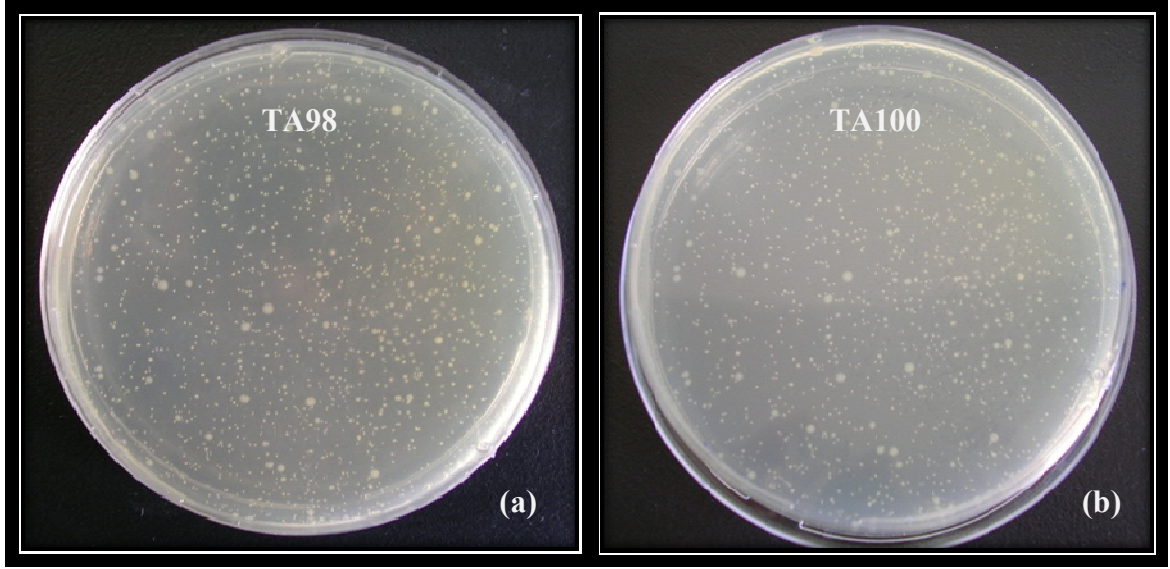
Deneylerde histidin sentezleyemeyen oksotrof suşlar (*S. typhimurium* TA98 ve TA100) kullanılmış olup, bu suşların histidini tekrar sentezleyebilir hale gelmesini sağlayan bitki ekstraktları ve dozları belirlenmeye çalışıldı. Bunun değerlendirilmesi için, histidini yeniden sentezleyebilen (his⁺ revertant) kolonilerin sayısı ile negatif kontrol grubu karşılaştırıldı. Negatif kontrolde gözlenen koloni sayısını 2 katına çıkaran örnek, mutajenik sayıldı. Ayrıca geriye dönen bakteri sayısında doza bağlı bir artış olduğunda ise, bu durum zayıf mutajenik etki olarak kabul edildi (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

S. typhimurium TA98 suşu ile yapılan çalışmalar sonunda elde edilen bulgulara göre, *S. trojana* ve *S. athoa* kloroform ekstraktlarının test edilen dozlarının hiçbirinde mutajenik etki gözlenmedi (Şekil 15). Bununla birlikte, *S. trojana* aseton ekstraktı TA98 suşunun geri dönen (revertant) koloni sayısında doza bağlı olarak artışa neden olduğu için zayıf mutajen olarak kabul edildi. Ancak, S9 içermeyen ortamda görülen bu etki S9 varlığında ortadan kalktı (Şekil 16). Aynı şekilde, *S. athoa* metanol ekstraktının da sadece S9 (-) zayıf mutajenik aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 17). İki bitki türünden elde edilen su ekstraktlarında ise, mutajenik etkiye rastlanmadı (Şekil 18).

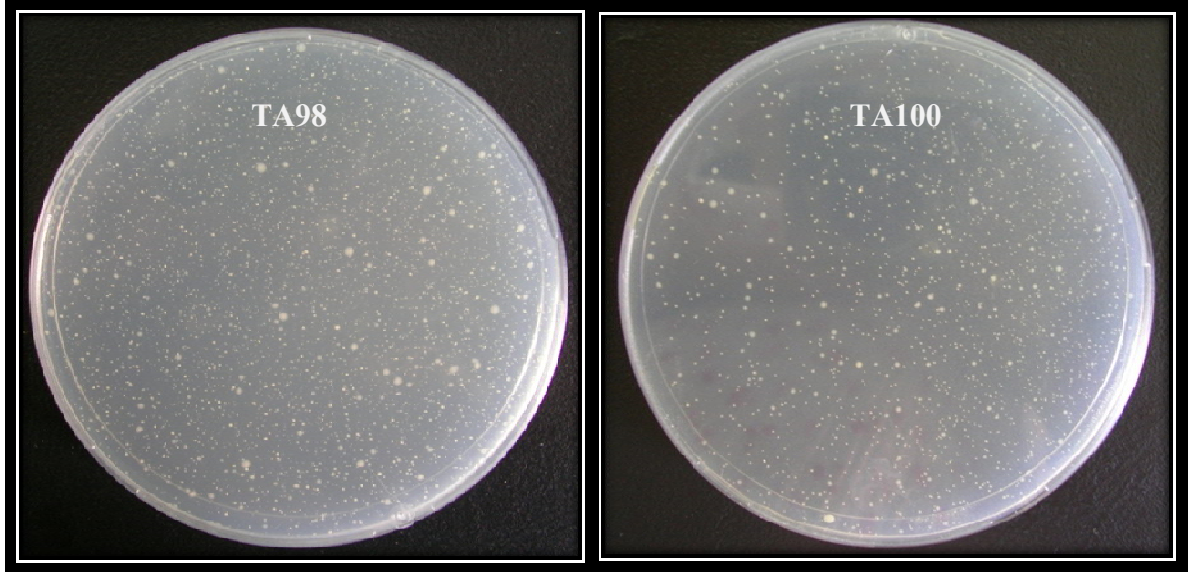
S. typhimurium TA100 suşu ile yapılan çalışmalar sonunda elde edilen bulgulara göre, S9 (-) *S. trojana* kloroform ekstraktının en yüksek dozunun (100 mg/plak) mutajenik aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Aynı çalışmada, *S. athoa* kloroform ekstraktının da

zayıf mutajenik etki gösterdiği saptandı (Şekil 19). Bununla birlikte, *S. trojana* aseton ekstraktının S9 (-) mutajenik etkiye neden olduğu tespit edildi. Ancak, bu etki S9 varlığında gözlenmedi. *S. athoa* aseton ekstraktının S9 (\pm) TA100 suşu ile yapılan çalışmalarında, test edilen herhangi bir dozunun mutajenik aktivite göstermediği belirlendi (Şekil 20). *S. trojana* metanol ekstraktının neredeyse tüm dozlarının S9 (-) mutajenik etkiye neden olduğu saptanmış olup S9 (+) 20 ve 100 mg/plak dozlarının zayıf mutajen özellikte olduğu anlaşıldı. *S. athoa* metanol ekstraktının ise, aynı test suşunda S9 (+) sadece en yüksek dozunun kontroldeki koloni sayısını biraz arttırdığı belirlendi (Şekil 21). Su ekstraktlarının TA100 suşu ile test edildiği çalışmaların sonuçlarına göre, *S. trojana* bitkisinin S9 (\pm) mutajenik potansiyele sahip olduğu bulundu. *S. athoa* su ekstraktının ise S9 (-) zayıf mutajenik etki gösterdiği, fakat S9 (+) mutajenik risk taşımadığı belirlendi (Şekil 22).

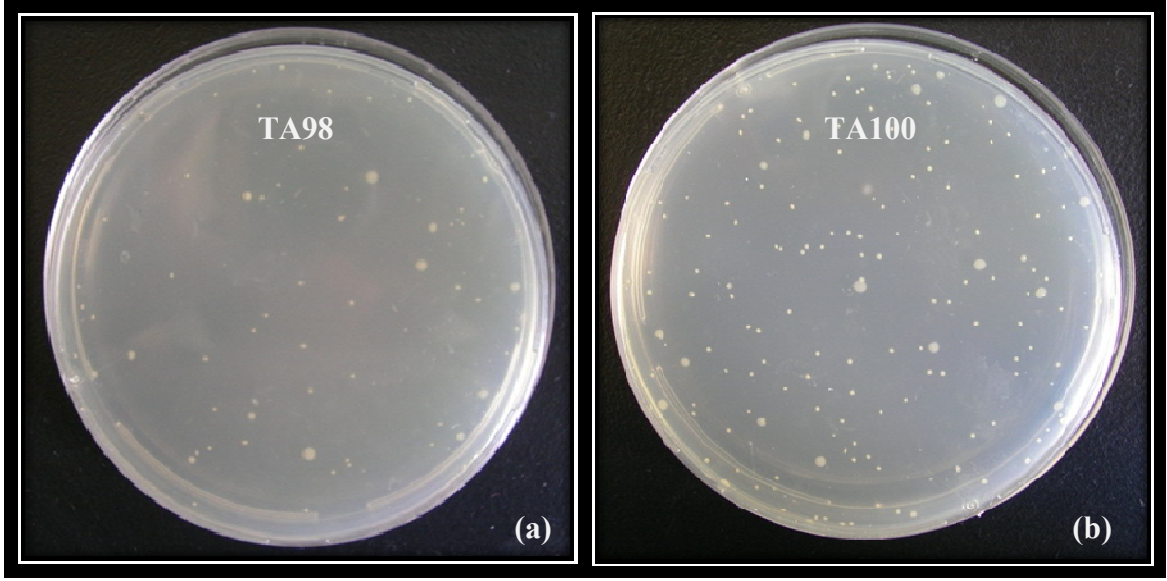
Deneylere paralel olarak yürütülen pozitif, negatif ve spontan kontrollerde gözlenen revertant bakteri sayısı, daha önce yapılan çalışmalara ve literatüre uygunluk gösterdi (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000) (Çizelge 3, 4 ve Şekil 11, 12, 13, 14).



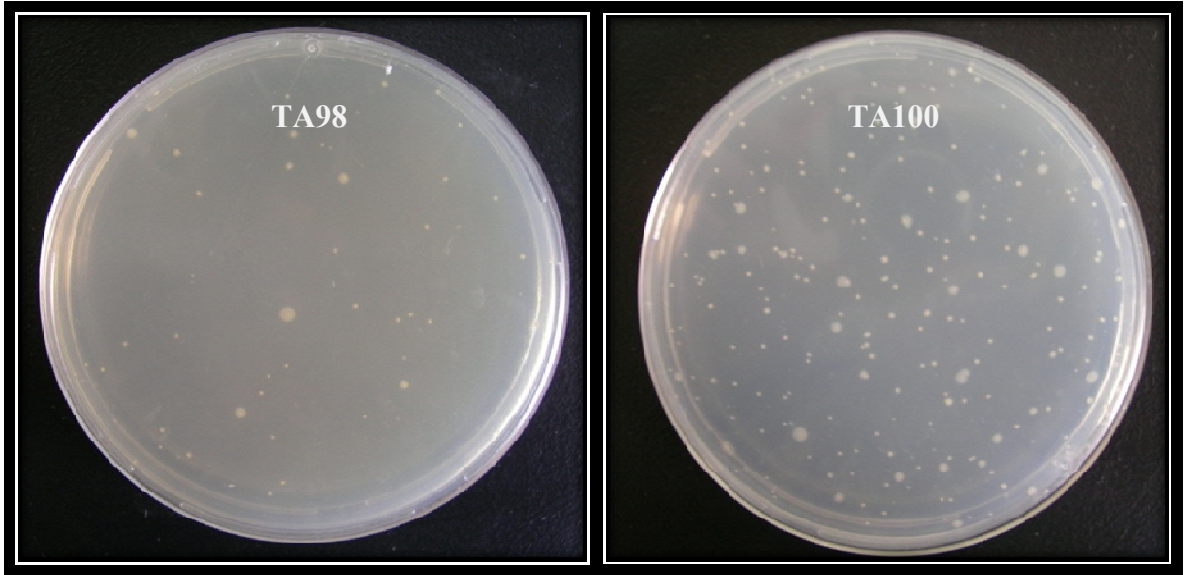
Şekil 11. Pozitif kontrol. (a) NPD (4-nitro-*o*-fenilendiamin) ve (b) SA (NaN₃, sodyum azid) mutajenlerinin etkisi (S9 -).



Şekil 12. Pozitif kontrol. 2AF (2-amino floren) mutajeninin etkisi (S9 +).



Şekil 13. Negatif kontrol. (a) DMSO ve (b) Su.



Şekil 14. Spontan kontrol (kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü).

Çizelge 3. *S. trojana* bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkileri

Uygulama	Doz (mg/plak)	His ⁺ Revertant Koloni Sayısı/Plak				
		TA98		TA100		
		S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	
		Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	
Pozitif Kontrol	NPD	10 ⁻²	912±32,54			
	SA	10 ⁻³		1003±25,42		
	2AF	5x10 ⁻³	869±31,53		901±17,24	
Kloroform Ekstraktı		100	58±2,52	45±6,87	402±15,72	223±10,07
		20	53±7,53	54±4,04	295±13,84	195±8,63
		4	65±5,26	52±6,11	261±12,52	229±2,52
		0,8	51±6,03	58±4,00	197±13,53	185±7,77
		0,16	45±2,65	56±4,04	231±11,18	218±14,21
Aseton Ekstraktı		100	63±6,38	54±4,04	379±6,11	198±13,50
		20	56±6,15	57±5,69	339±15,09	254±7,77
		4	49±5,86	60±1,53	452±26,53	206±6,66
		0,8	51±5,41	59±3,51	317±18,34	207±3,06
		0,16	49±3,56	55±8,51	362±21,16	217±11,53
Metanol Ekstraktı		100	51±7,36	46±2,08	346±16,94	276±6,66
		20	47±6,23	48±3,61	437±24,36	261±18,76
		4	54±5,51	56±3,05	375±21,29	183±16,23
		0,8	49±4,58	55±3,05	363±18,36	213±12,41
		0,16	46±4,83	49±2,52	290±14,42	224±17,62
Su Ekstraktı		100	49±6,84	47±2,30	327±24,15	306±11,53
		20	52±6,76	50±3,53	305±7,55	273±7,02
		4	59±4,16	57±2,52	273±15,50	210±11,50
		0,8	45±4,85	60±3,61	257±19,00	181±12,22
		0,16	53±6,42	54±2,65	278±22,75	204±5,51
Negatif Kontrol	DMSO		47±3,51	51±3,00	181±3,51	190±4,73
	Su		45±2,65	48±3,79	168±8,72	181±2,00
Spontan Kontrol			38±3,51	43±2,52	155±6,00	162±8,51

* NPD (4-nitro-*o*-fenilendiamin): S9 yokluğunda TA98 suşu için, SA (sodyum azid): S9 yokluğunda

TA100 suşu için, 2AF (2-Aminofloren): S9 varlığında her iki suş için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

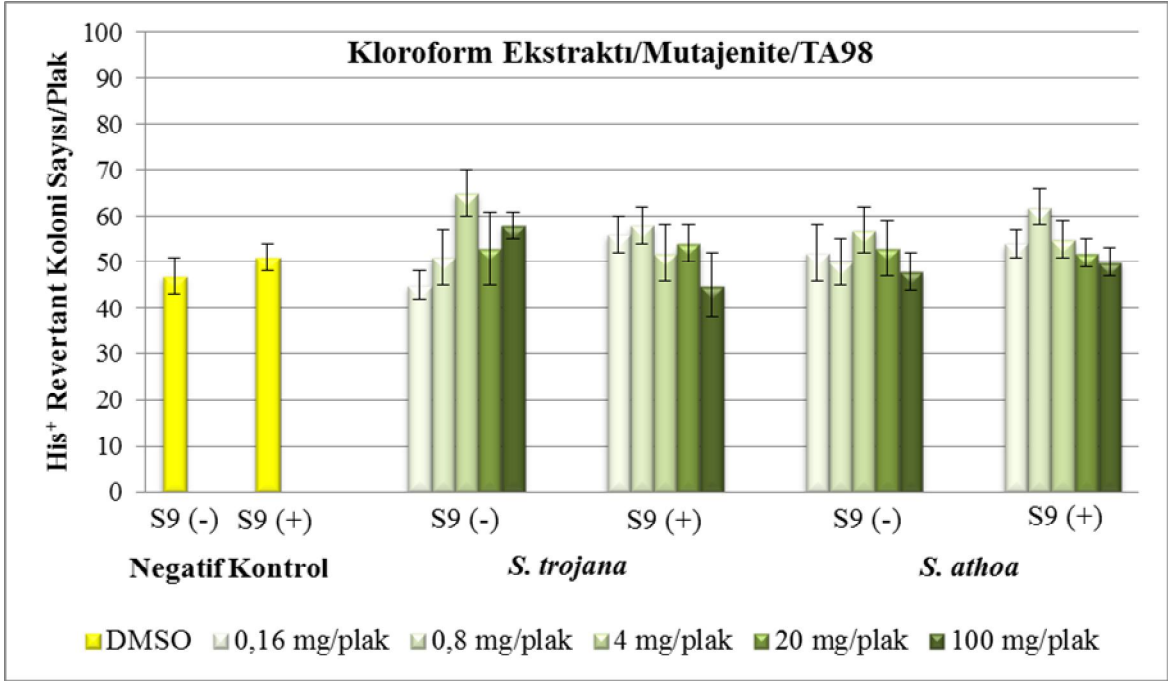
Çizelge 4. *S. athoa* bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkileri

Uygulama	Doz (mg/plak)	His ⁺ Revertant Koloni Sayısı/Plak			
		TA98		TA100	
		S9 (-) Ort±SD	S9 (+) Ort±SD	S9 (-) Ort±SD	S9 (+) Ort±SD
Pozitif Kontrol	NPD	10 ⁻²			
	SA	10 ⁻³			
	2AF	5x10 ⁻³		5x10 ⁻³	
Kloroform Ekstraktı	100	48±4,04	50±2,65	176±10,69	210±8,34
	20	53±5,51	52±3,00	250±15,19	227±11,76
	4	57±5,08	55±4,04	211±12,45	206±8,74
	0,8	50±5,15	62±3,61	202±9,61	190±10,72
	0,16	52±6,09	54±3,22	175±7,13	184±9,54
Aseton Ekstraktı	100	43±2,52	46±2,00	185±6,56	203±10,54
	20	46±5,57	52±6,25	180±14,01	213±11,02
	4	47±5,51	57±2,52	203±17,64	207±9,54
	0,8	56±10,21	54±6,00	191±13,01	199±5,13
	0,16	51±4,04	48±1,53	186±5,57	183±12,22
Metanol Ekstraktı	100	48±3,61	47±2,52	205±23,10	266±7,77
	20	63±2,52	49±4,51	202±13,65	202±24,01
	4	58±6,72	56±4,16	225±22,86	205±8,89
	0,8	71±5,71	61±6,00	222±11,54	212±9,45
	0,16	50±6,33	57±4,57	231±18,63	204±6,00
Su Ekstraktı	100	42±3,61	49±2,65	258±7,77	221±9,07
	20	49±2,52	53±2,00	200±23,48	205±8,89
	4	58±3,06	56±3,61	295±21,71	216±15,57
	0,8	42±3,72	47±4,53	213±20,65	174±6,51
	0,16	49±3,51	51±3,61	194±17,78	176±11,93
Negatif Kontrol	DMSO	47±3,51	51±3,00	181±3,51	190±4,73
	Su	45±2,65	48±3,79	168±8,72	181±2,00
Spontan Kontrol		38±3,51	43±2,52	155±6,00	162±8,51

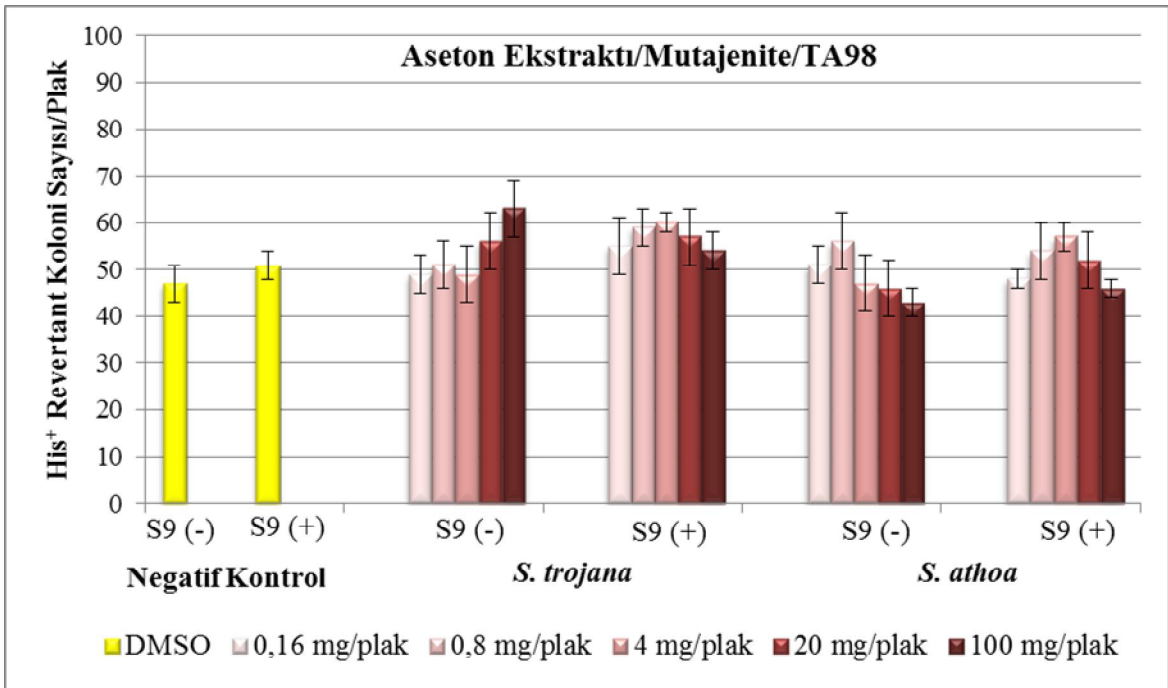
* NPD (4-nitro-*o*-fenilendiamin): S9 yokluğunda TA98 suşu için, SA (sodyum azid): S9 yokluğunda TA100 suşu için, 2AF (2-Aminofloren): S9 varlığında her iki suş için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

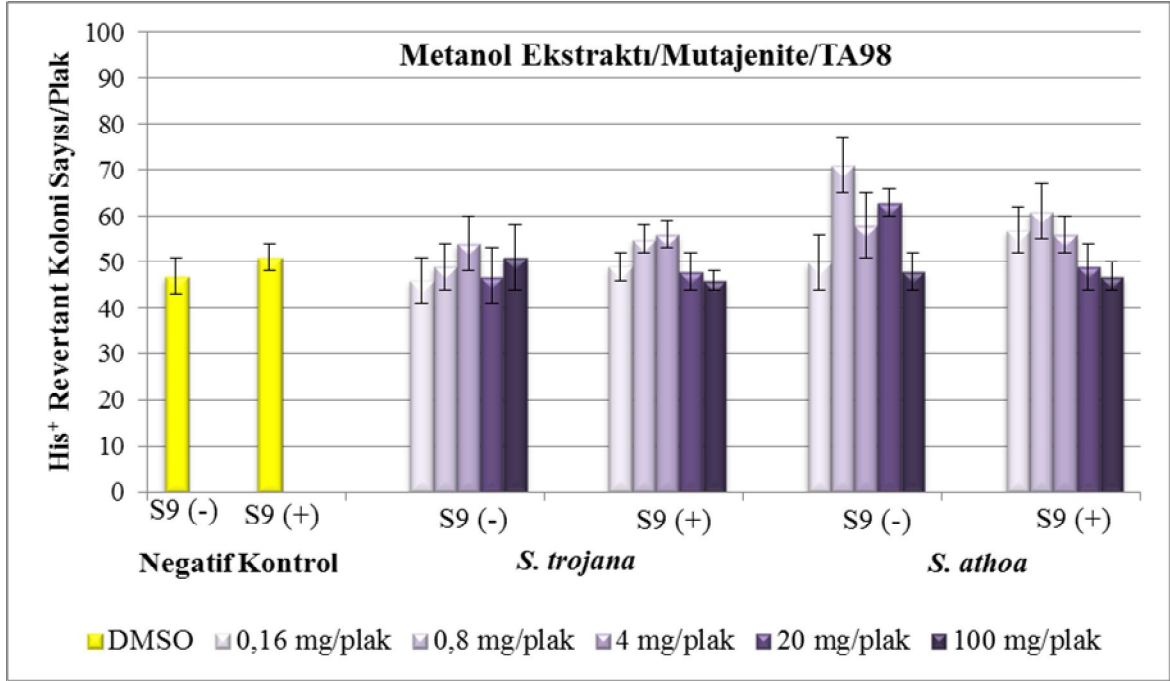
*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma



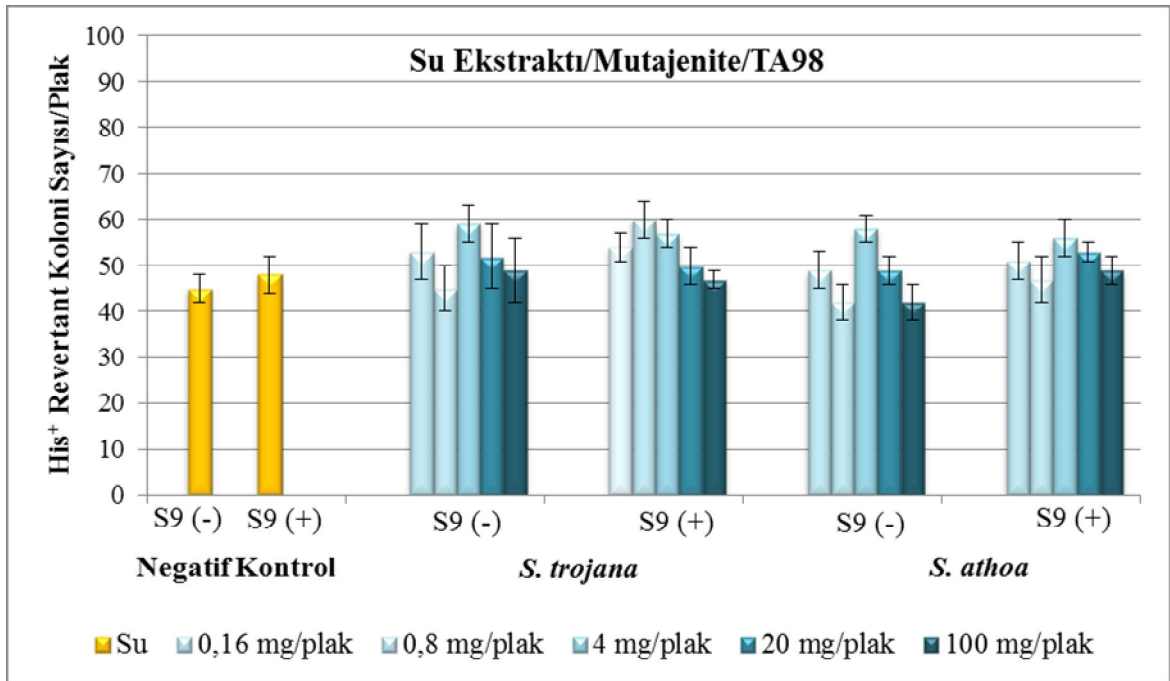
Şekil 15. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki mutajenik etkileri.



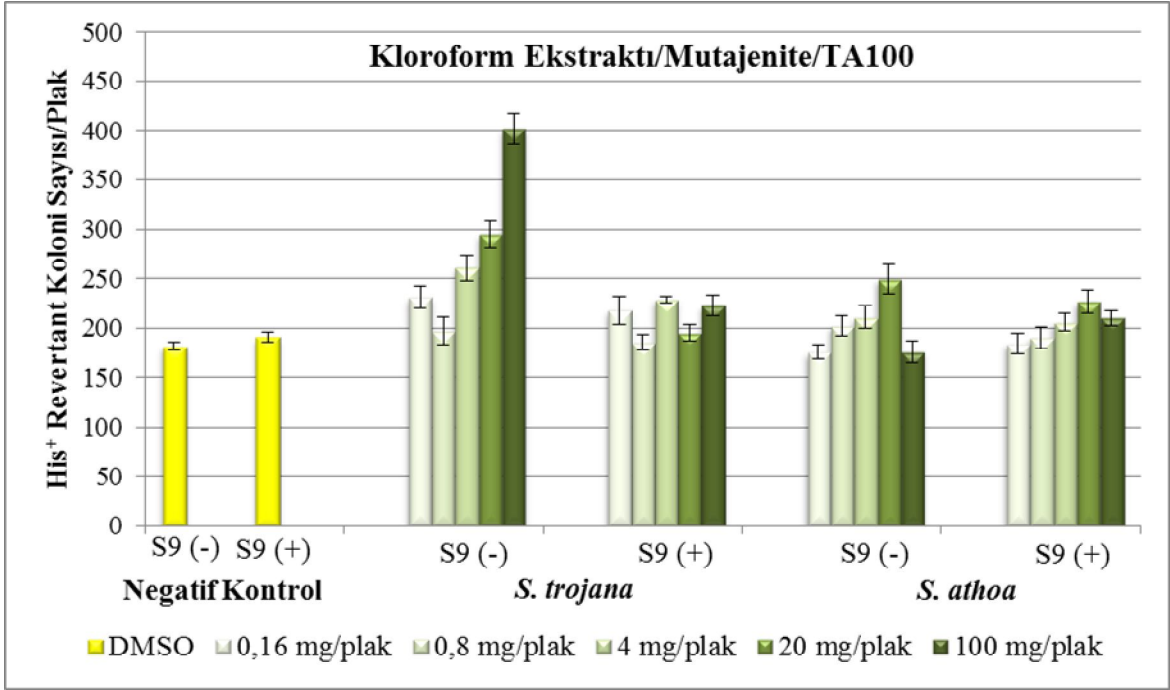
Şekil 16. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen aseton ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki mutajenik etkileri.



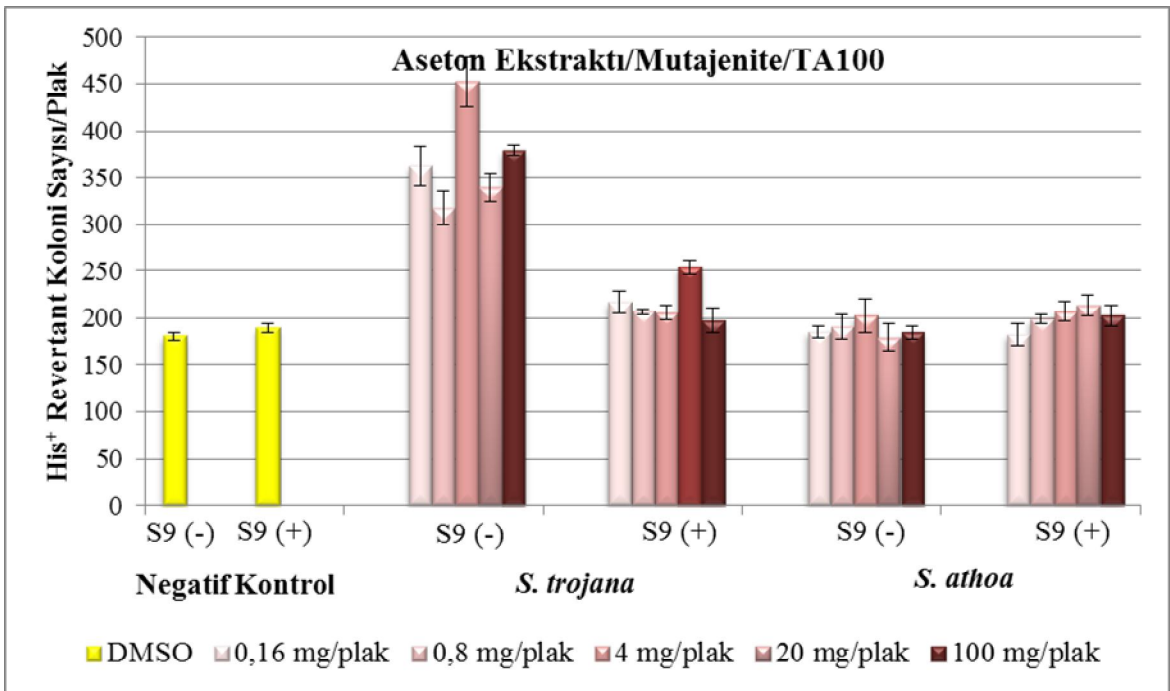
Şekil 17. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki mutajenik etkileri.



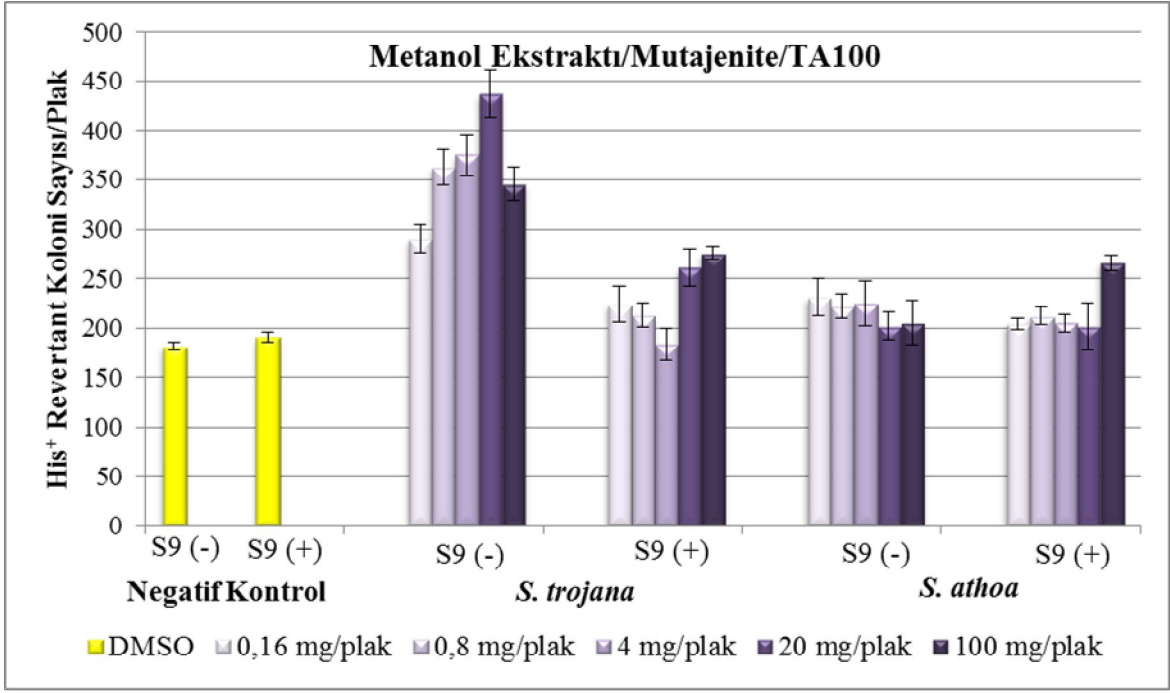
Şekil 18. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen su ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki mutajenik etkileri.



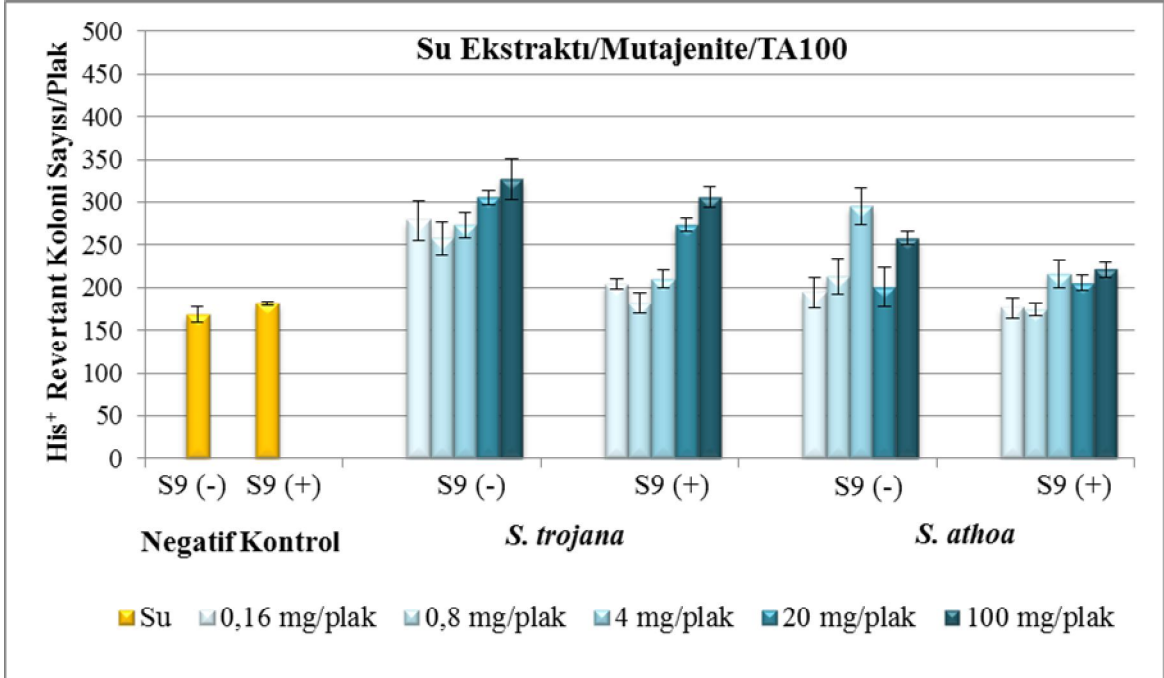
Şekil 19. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki mutajenik etkileri.



Şekil 20. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen aseton ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki mutajenik etkileri.



Şekil 21. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki mutajenik etkileri.



Şekil 22. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen su ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki mutajenik etkileri.

4.4. Antimutajenik Aktivite Sonuçları

Bu çalışmada, *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinin antimutajenik etkiye sahip olup olmadıkları Ames (*Salmonella*/mikrozom) testi ile saptanmaya çalışıldı. Bu amaçla, bitkilerden kloroform, aseton, metanol ve su ekstraktları elde edilmiş olup her ekstrakt için 5'er doz (800, 160, 32, 6,4 ve 1,28 µg/plak) test edildi. Her doz üç ayrı plağa ekildi ve çalışmalar birbirinden bağımsız iki deney şeklinde uygulandı. Deneyler, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile hem S9 (+) hem de S9 (-) yapıldı. Çalışmalara paralel olarak pozitif, negatif ve spontan kontroller de uygulandı. Pozitif kontrolde S9 (-) TA98 suşu için 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD), TA100 suşu için ise sodyum azid (SA) ve S9 (+) her iki suş için de 2-aminofloren (2AF) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak NPD 10 µg/plak, SA (NaN₃) 1 µg/plak ve 2AF 5 µg/plak olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrolde ekstraktların çözücülerini (DMSO ve su) kullanıldı. Antimutajenite araştırmaları sonunda elde edilen bulgular *S. trojana* için Çizelge 5 ve 6'da, *S. athoa* için Çizelge 7 ve 8'de verildi.

Antimutajenik potansiyeli test edilen kloroform ekstraktlarının (800 µg/plak) S9 (+) çerçeve kayması tipindeki mutasyonu, %65 (*S. trojana*) ve %52 (*S. athoa*) oranlarında engelleyebildiği tespit edildi (Şekil 23). *S. trojana* ve *S. athoa* aseton ekstraktlarının da test edilen en yüksek dozlarının S9 (+), güçlü antimutajenik etkilere (sırasıyla %63 ve %57) sahip oldukları saptandı (Şekil 24). *S. athoa* metanol ekstraktının S9 (+) ve S9 (-) TA98 suşu üzerinde doza bağlı olarak antimutajenik etkisinin arttığı gözlemlendi (Şekil 25). S9 (+) *S. trojana* su ekstraktının antimutajenik aktiviteye sahip olmadığı ve *S. athoa* su ekstraktının doza bağlı güçlü antimutajenik etkisinin olduğu belirlendi (Şekil 26).

Kloroform ekstraktlarının S9 (+) ve S9 (-) baz çifti değişimi mutasyonuna karşı yüksek oranlarda koruyucu etkiye sahip oldukları saptandı (Şekil 27). *S. trojana* aseton ekstraktının TA100 suşu üzerinde S9 (-) doza bağlı olmaksızın yüksek antimutajenik etki (%58-68) gösterdiği belirlenmiş olup, S9 (+) antimutajenik potansiyelinin doza bağlı olduğu saptandı. *S. athoa* aseton ekstraktının da doza bağlı olarak güçlü antimutajen özelliğe sahip olduğu belirlendi (Şekil 28). Metanol ekstraktlarının TA100 suşu ile yapılan antimutajenite çalışmalarında, S9 (-) doza bağlı olmaksızın oldukça yüksek koruyucu etkiye sahip oldukları gözlemlendi. Bununla beraber, *S. trojana* metanol ekstraktının S9 (+) doza bağlı olarak antimutajenik etkisinin azaldığı, *S. athoa* metanol ekstraktının da

antimutajenik aktivitesinin doz arttıkça arttığı saptandı (Şekil 29). *S. trojana* su ekstraktlarının baz çifti değişimi şeklindeki mutasyonları S9 (-) %66-77 oranında engellediği ve S9 (+) koruyucu etkisinin en fazla %51 (32 µg/plak) olduğu gözlemlendi (Şekil 30).

Deneylere paralel olarak yürütülen pozitif, negatif ve spontan kontrollerde gözlenen revertant bakteri sayısı, daha önce yapılan çalışmalara ve literatüre uygunluk gösterdi (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000) (Çizelge 5, 6, 7, 8 ve Şekil 11, 12, 13, 14).

Çizelge 5. *S. trojana* bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

Uygulama		Doz (µg/plak)	His ⁺ Revertant Koloni Sayısı/Plak			
			TA98			
			S9 (-)	%	S9 (+)	%
			İnhibisyon	Ort±SD	İnhibisyon	
Pozitif Kontrol	NPD	10	912±32,54			
	2AF	5	869±31,53			
Kloroform Ekstraktı		1,28	703±19,29	24	737±11,93	16
		6,4	660±17,77	29	680±22,03	23
		32	634±14,51	32	450±16,50	51
		160	607±16,66	35	474±12,90	48
		800	616±16,11	34	335±10,60	65
Aseton Ekstraktı		1,28	790±14,16	13	746±9,54	15
		6,4	790±13,00	13	631±8,19	29
		32	729±16,81	21	622±13,58	30
		160	712±14,58	23	565±11,59	37
		800	764±16,11	17	351±10,69	63
Metanol Ekstraktı		1,28	721±11,50	22	507±18,15	44
		6,4	686±6,56	26	606±5,29	32
		32	660±6,56	29	450±4,58	51
		160	686±5,57	26	647±5,57	27
		800	694±6,66	25	655±6,66	26
Su Ekstraktı		1,28	686±9,17	26	758±13,01	14
		6,4	634±7,55	32	737±18,04	16
		32	599±11,00	36	680±6,25	23
		160	668±13,50	28	655±14,22	26
		800	573±9,17	39	721±4,51	18
Negatif Kontrol	DMSO		47±3,51		51±3,00	
	Su		45±2,65		48±3,79	
Spontan Kontrol			38±3,51		43±2,52	

* NPD (4-nitro-*o*-fenilendiamin) S9 yokluğunda, 2AF (2-Aminofloren) S9 varlığında TA98 suşu için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

Çizelge 6. *S. trojana* bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

Uygulama		Doz (µg/plak)	His ⁺ Revertant Koloni Sayısı/Plak			
			TA100			
			S9 (-)	%	S9 (+)	%
			İnhibisyon	Ort±SD	İnhibisyon	
Pozitif	SA	1	1003±25,42			
Kontrol	2AF	5	901±17,24			
Kloroform Ekstraktı		1,28	672±13,53	63	736±7,81	22
		6,4	543±8,15	65	556±13,89	46
		32	504±15,51	75	392±4,04	68
		160	462±10,69	78	414±6,00	65
		800	402±12,49	82	467±9,45	58
Aseton Ekstraktı		1,28	735±9,61	58	744±11,14	21
		6,4	710±7,51	60	661±16,50	32
		32	665±9,71	63	586±10,60	42
		160	593±6,25	68	504±9,07	53
		800	678±7,55	62	399±16,09	67
Metanol Ekstraktı		1,28	685±8,33	62	474±15,37	57
		6,4	643±3,61	65	497±7,00	54
		32	683±7,55	62	736±10,02	22
		160	718±5,86	59	691±15,95	28
		800	660±8,72	63	796±9,61	14
Su Ekstraktı		1,28	630±9,54	66	624±15,54	37
		6,4	560±6,51	71	564±9,61	45
		32	495±5,51	75	519±7,02	51
		160	473±8,15	77	534±11,59	49
		800	563±7,94	70	729±9,71	23
Negatif	DMSO		181±3,51		190±4,73	
Kontrol	Su		168±8,72		181±2,00	
Spontan Kontrol			155±6,00		162±8,51	

* SA (sodyum azid) S9 yokluğunda, 2AF (2-Aminofloren) S9 varlığında TA100 suşu için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

Çizelge 7. *S. athoa* bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

Uygulama	Doz (µg/plak)	His ⁺ Revertant Koloni Sayısı/Plak			
		TA98			
		S9 (-)	%	S9 (+)	%
		Ort±SD	İnhibisyon	Ort±SD	İnhibisyon
Pozitif Kontrol	NPD	10	912±32,54		
	2AF	5		869±31,53	
Kloroform Ekstraktı	1,28	738±27,51	20	762±9,71	13
	6,4	651±18,03	30	721±11,00	18
	32	642±16,92	31	573±5,51	36
	160	529±9,61	44	548±21,93	39
	800	581±15,87	38	442±6,25	52
Aseton Ekstraktı	1,28	747±16,86	19	729±10,97	17
	6,4	616±10,07	34	721±10,54	18
	32	712±4,00	23	622±6,11	30
	160	816±21,07	11	524±5,51	42
	800	738±9,71	20	401±7,00	57
Metanol Ekstraktı	1,28	677±8,74	27	754±7,02	14
	6,4	599±7,77	36	721±9,17	18
	32	547±4,73	42	614±9,29	31
	160	590±4,58	37	672±7,77	24
	800	547±4,51	42	515±6,03	43
Su Ekstraktı	1,28	721±10,79	22	713±5,51	19
	6,4	581±8,89	38	622±10,21	30
	32	529±6,66	44	573±7,37	36
	160	660±9,07	29	532±6,11	41
	800	573±9,85	39	441±4,51	52
Negatif Kontrol	DMSO	47±3,51		51±3,00	
	Su	45±2,65		48±3,79	
Spontan Kontrol		38±3,51		43±2,52	

* NPD (4-nitro-*o*-fenilendiamin) S9 yokluğunda, 2AF (2-Aminofloren) S9 varlığında TA98 suşu için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

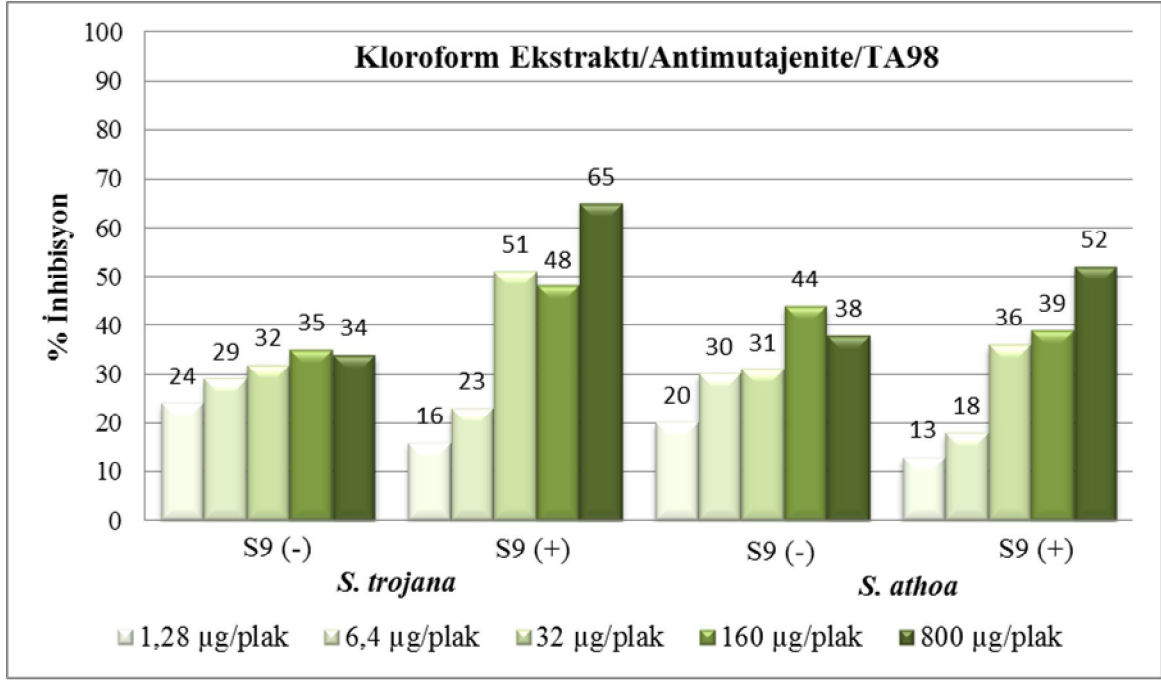
Çizelge 8. *S. athoa* bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

Uygulama	Doz (µg/plak)	His ⁺ Revertant Koloni Sayısı/Plak				
		TA100				
		S9 (-)	%	S9 (+)	%	
		Ort±SD	İnhibisyon	Ort±SD	İnhibisyon	
Pozitif Kontrol	SA	1	1003±25,42			
	2AF	5			901±17,24	
Kloroform Ekstraktı		1,28	570±8,51	51	549±9,17	47
		6,4	511±5,03	58	504±9,54	53
		32	537±7,10	55	541±10,41	48
		160	520±4,04	57	571±9,85	44
		800	469±9,54	63	519±5,51	51
Aseton Ekstraktı		1,28	672±5,57	39	646±10,02	34
		6,4	638±4,16	43	661±5,69	32
		32	681±6,66	38	624±7,00	37
		160	562±5,13	52	571±10,15	44
		800	545±5,03	54	556±9,17	46
Metanol Ekstraktı		1,28	647±9,07	42	751±14,64	20
		6,4	486±9,45	61	646±13,58	34
		32	520±4,51	57	616±7,57	38
		160	477±17,06	62	519±8,62	51
		800	503±12,29	59	534±7,10	49
Su Ekstraktı		1,28	689±8,33	37	759±4,51	19
		6,4	638±4,58	43	646±4,73	34
		32	638±6,11	43	699±8,02	27
		160	545±4,04	54	601±7,10	40
		800	537±2,52	55	579±9,02	43
Negatif Kontrol	DMSO		181±3,51		190±4,73	
	Su		168±8,72		181±2,00	
Spontan Kontrol			155±6,00		162±8,51	

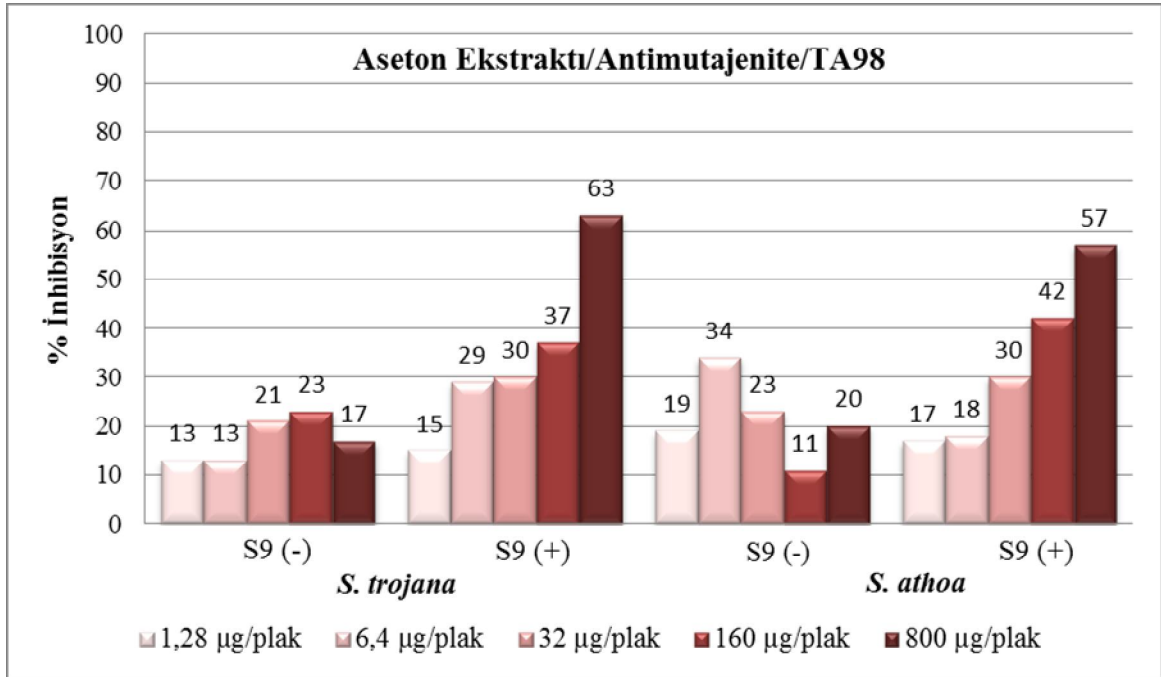
* SA (sodyum azid): S9 yokluğunda, 2AF (2-Aminofloren) S9 varlığında TA100 suşu için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

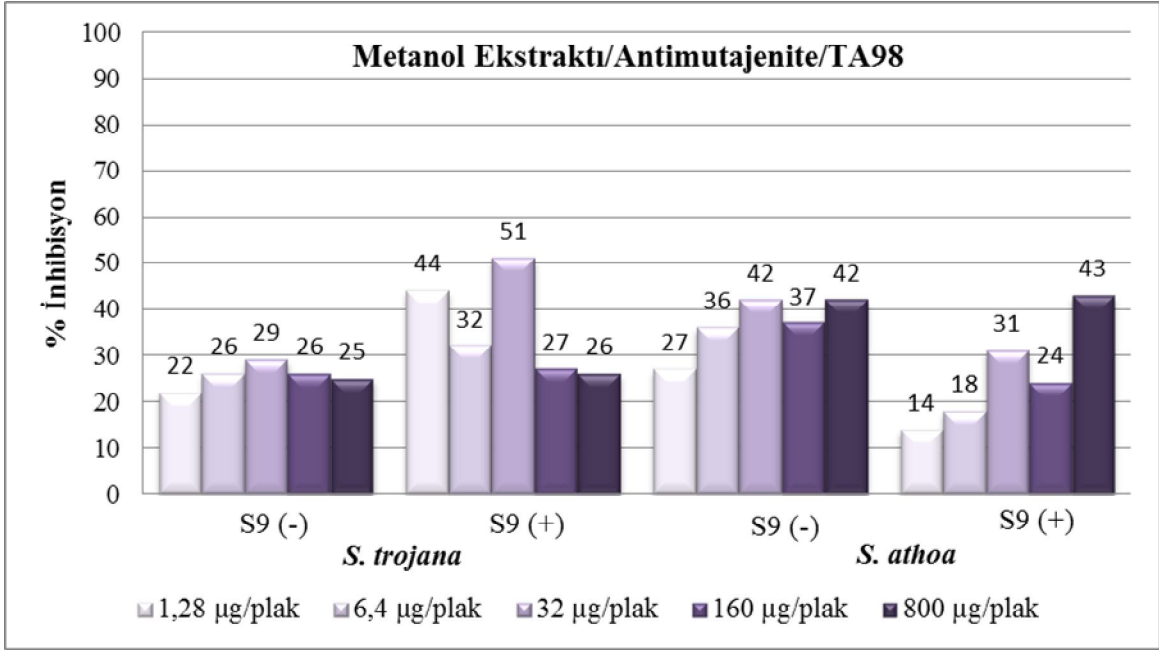
*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma



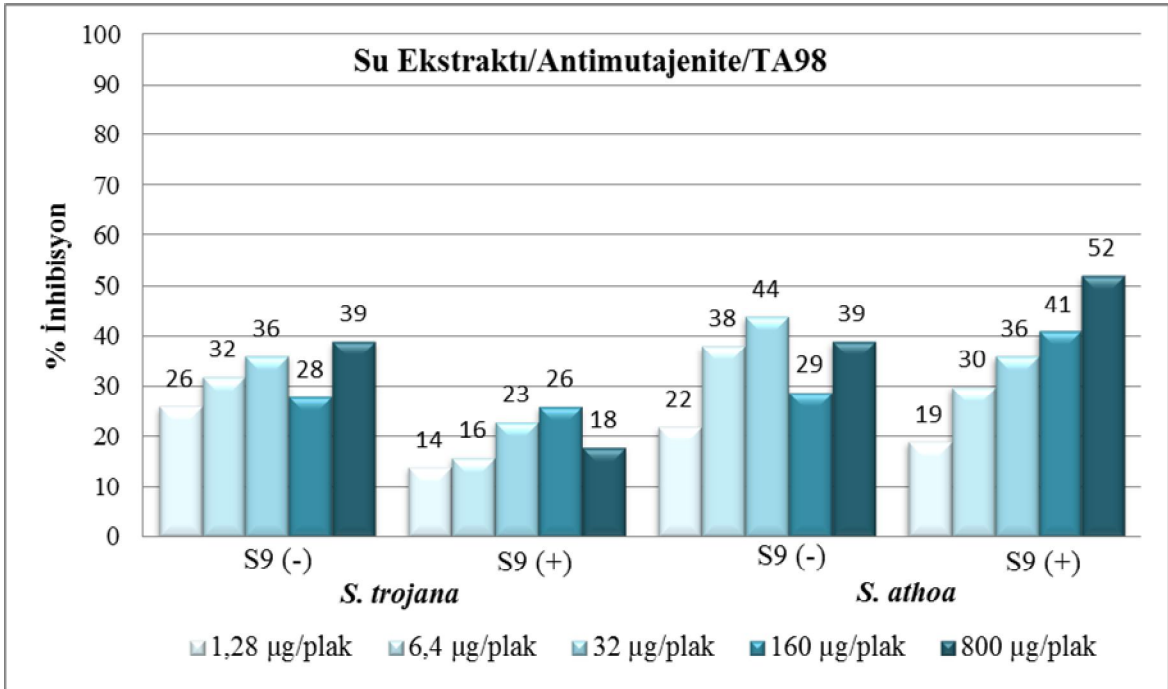
Şekil 23. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri.



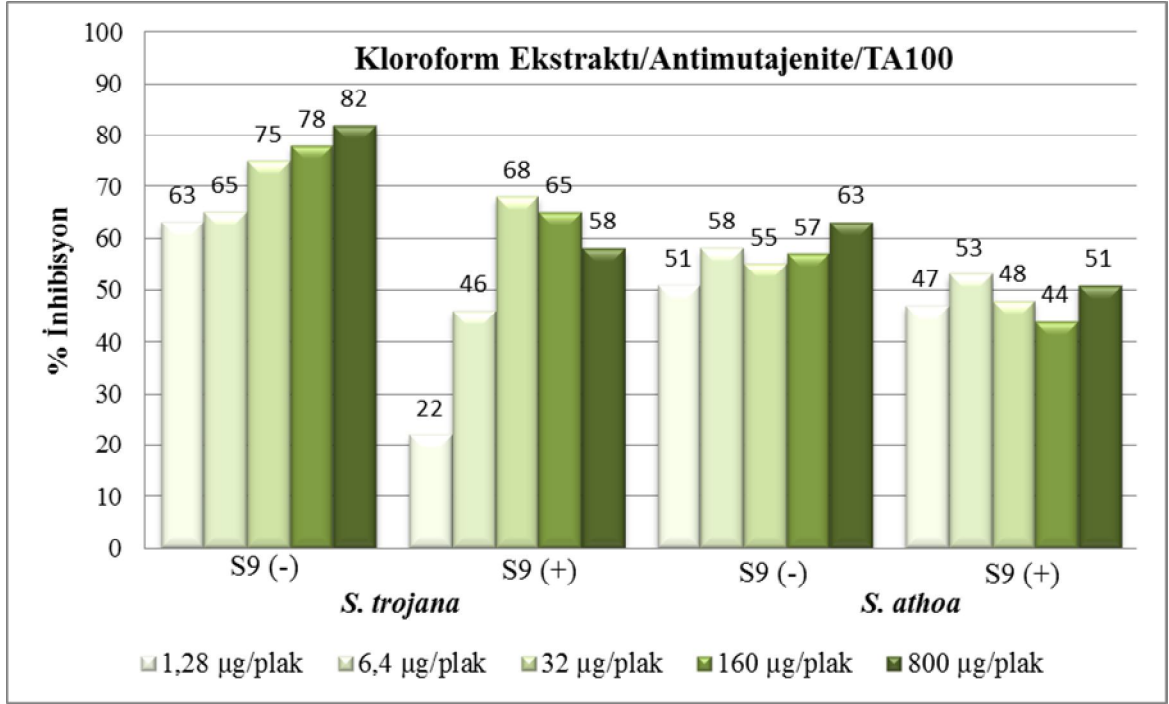
Şekil 24. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen aseton ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri.



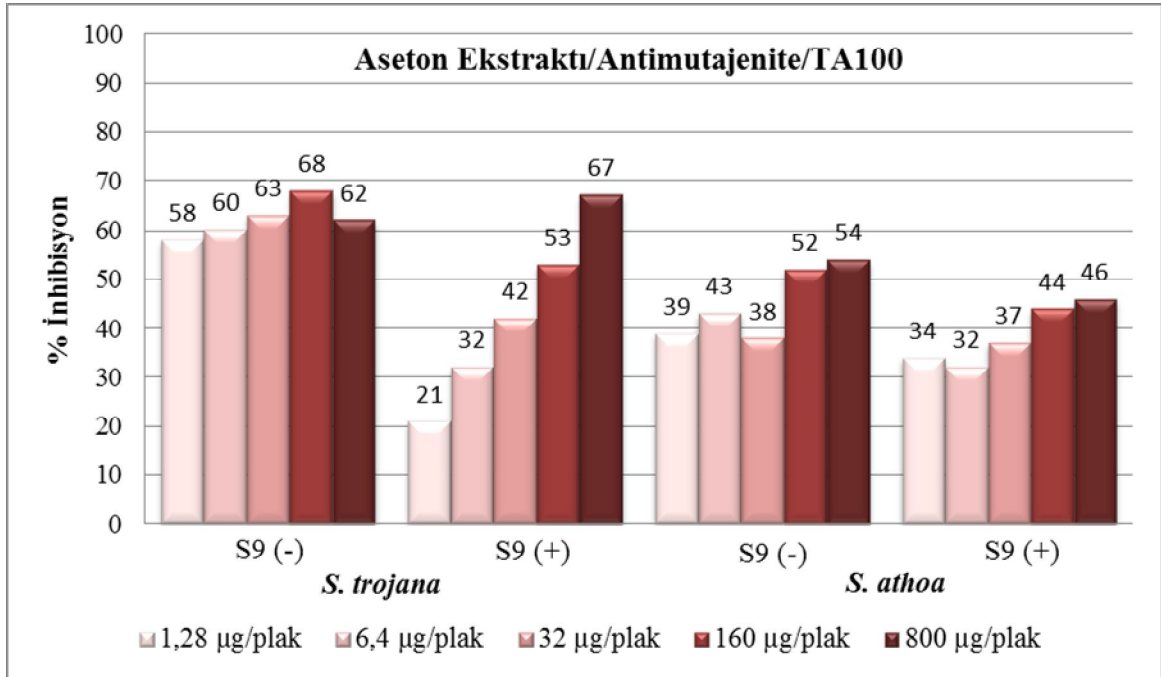
Şekil 25. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri.



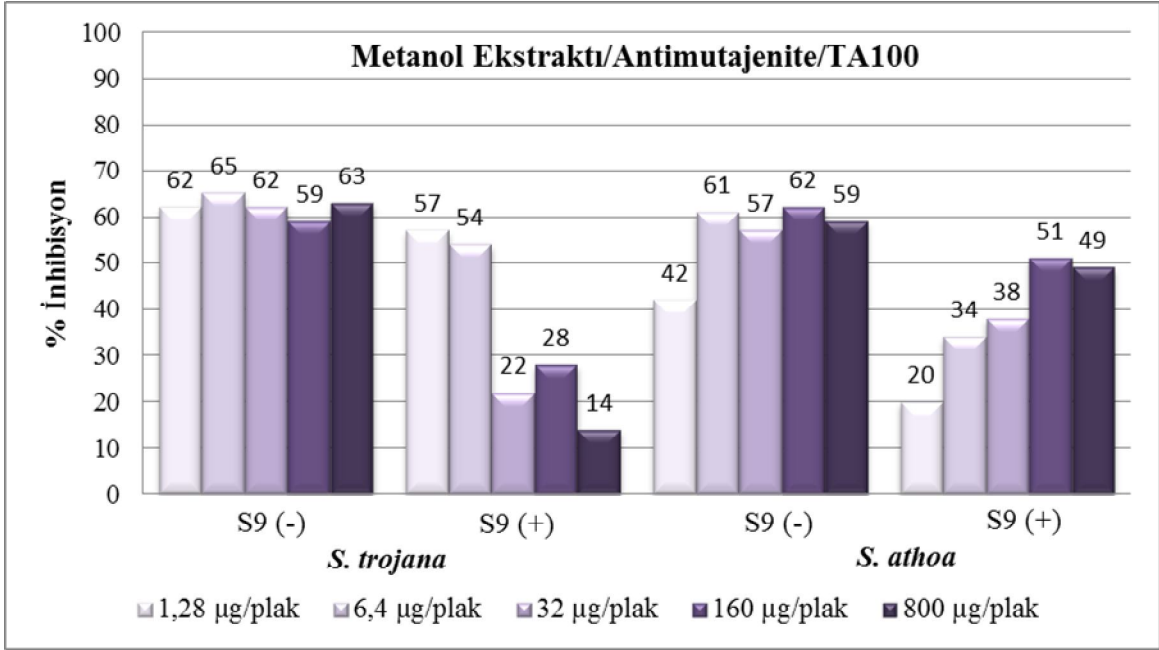
Şekil 26. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen su ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri.



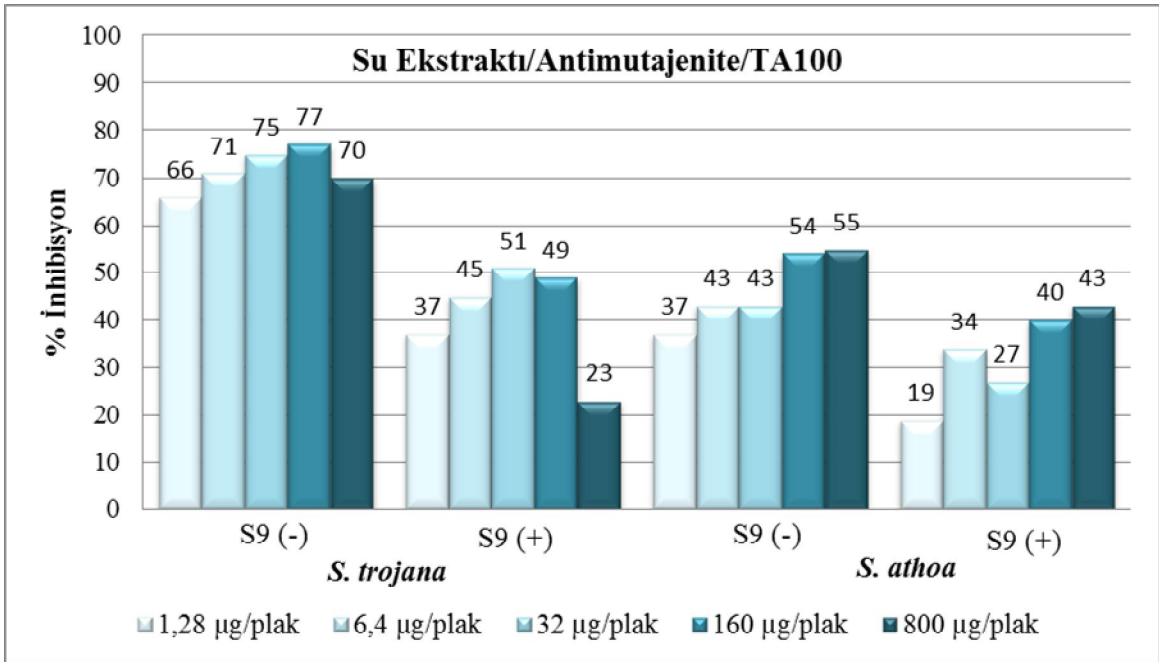
Şekil 27. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri.



Şekil 28. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen aseton ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri.



Şekil 29. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri.



Şekil 30. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkilerinden elde edilen su ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (±) *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri.

Günümüzde, kanserin mutasyonların birikimi sonucu oluştuğu bilinmektedir. Bununla birlikte, Ames (*Salmonella*/mikrozom) testi gibi kısa zamanlı bir genetik test mutajenleri/kanserojenleri ya da antimutajenleri/antikanserojenleri belirlemek için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Rausher ve ark., 1998).

Antimutajenik özelliğe sahip maddeler, çevresel mutajenlerin neden olduğu genetik hasarı önlemeye yardımcı olmaktadır. Bu çevresel mutajenlere yiyecek, içecek ve ilaçlarla aldığımız kimyasallar da dahildir (Lakashmi ve ark., 2003). Bununla birlikte, çoğunlukla tüketilen doğal besin kaynaklarında (meyveler, sebzeler ve çay gibi) antimutajen bileşenlerin varlığının belirlenmesi, her gün kansere karşı korunma anlamına gelmektedir (Wattenberg, 1996). Son 20 yılda yapılan çalışmaların başında, çay (*Camellia sinensis*) tüketimiyle ilgili araştırmalar gelmektedir. Özellikle yeşil çayın insanlarda kanser riskini azalttığı bildirilmiştir (Blot ve ark., 1997; Dreosti ve ark., 1997; Birt ve ark., 2001).

Tüketilen pek çok bitkinin ya da bitkisel ürünün çeşitli antimutajenik maddeleri içerdiği ve aynı zamanda bu kimyasalların çevresel mutajen ya da kanserojenleri aktive edebilen özelliğe sahip oldukları da bilinmektedir. Bu nedenle, aynı bitkiden elde edilen ekstraktların hem mutajenik hem de antimutajenik cevaplarını belirlemek önemlidir (Cortés-Eslava ve ark., 2004). Bunun için çalışmamızda, *Sideritis trojana* ve *Sideritis athoa* bitkilerinden elde edilen farklı polariteye sahip ekstraktların genetik materyal (DNA) üzerindeki potansiyel *in vitro* etkileri Ames testi ile araştırılmıştır.

Bir çalışmada, Lamiaceae familyasına ait *Melissa officinalis* bitkisinden elde edilen ekstraktların genotoksik ve mutajenik etkisi *in vitro* testlerle araştırılmıştır. Bitkinin içerdiği kimyasalların, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açması sonucu mutajenik etki gösterdiği saptanmıştır (Alves ve ark., 2009). Bununla birlikte, şimdiye kadar pek çok *Sideritis* türüyle yapılan farmakolojik çalışmalarda bu türlerin antioksidan (ROS giderici) özelliğe sahip oldukları rapor edilmiştir (Tunalier ve ark., 2004; Sağdıç ve ark., 2008). Bu durumun, yüksek miktarda içerdikleri fenolik bileşenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu özellikleri dikkate alındığında, *Sideritis* türlerinin antimutajenik özelliğe sahip olması beklenebilir. Ancak *in vivo* bir çalışmayla *Sideritis scardica* türünün ROS ürettiği saptanmıştır (Tadic ve ark., 2009). Bu çalışmada test edilen türlerin oksidan ya da antioksidan özelliğe sahip olup olmadığı bilinmemektedir. Böylelikle, *S. trojana* ve *S. athoa* türlerinin serbest oksijen radikalleri üretimine katkıda bulunarak genetik materyali

hasara uğratma riski bulunmaktadır.

Bitkilerin mutajenik ve antimutajenik etkileri, içerdikleri fitokimyasal maddelerle ilişkilidir (Ferreira ve Vargas, 1999). Brezilya’da sindirim rahatsızlıkları tedavisinde kullanılan *Strychnos pseudoquina* bitkisinin nokta mutasyonlarına (*in vitro*) ve kromozom aberasyonlarına (*in vivo*) sebep olan kimyasallar içerdiği bildirilmiştir (Santos ve ark., 2006). *Sideritis* türleriyle yapılan fitokimyasal analiz çalışmalarında bu türlerin diterpenler, flavonoidler ve uçucu yağlar bakımından zengin bir içeriğe sahip oldukları belirlenmiştir (Ezer ve Akçoş, 1995; Ezer ve ark., 1996; Topçu ve ark., 2002). *Sideritis* cinsine ait türlerin içerdiği ana bileşenlerin çoğu izole edilip tanımlanmıştır. Ancak, bu kimyasalların genotoksik/antigenotoksik etkiye sahip olup olmadığına ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, yapmış olduğumuz bu çalışma *Sideritis* cinsinin mutajenik ve antimutajenik potansiyellerinin tespit edilmesi yönünde yapılan ilk çalışma olma niteliğini taşımaktadır.

Önceki çalışmalarda, terpenlerin mutajenik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Lupi ve ark., 2009; Al-Zubairi ve ark., 2010). Örneğin; *Hyssopus officinalis* (Lamiaceae)’den elde edilen yüksek terpen içeriğine sahip hidroalkolik çözeltilinin mutajenik etkisinin Ames testi ile araştırıldığı bir çalışmada, sonucun negatif çıktığı bildirilmiştir (Lupi ve ark., 2009). Başka bir çalışmada, *Salvia cinnabarina* (Lamiaceae) bitkisinden izole edilen bir diterpenoidin Ames test sistemi ile mutajenik ve antimutajenik etkileri araştırılmıştır. Sonuçta, bu fitokimyasalın mutajenik etkiye sahip olmadığı ve güçlü antimutajenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Di Sotto ve ark., 2009). *Scutellaria* (Lamiaceae) cinsinin en fazla içerdiği bileşenlerden diterpen ve flavonoidlerin antitümör ve antioksidan özelliğe sahip oldukları bildirilmiştir (Shang ve ark., 2010). Bu çalışmada test edilen iki *Sideritis* türünün (*S. trojana* ve *S. athena*) içerik analizleri yapılmamış olup daha önce yapılan çalışmalar sonucu bu türlerin çeşitli diterpen ve flavonoidlerce zengin içeriğe sahip oldukları bildirilmiştir. Buna dayanarak, *S. trojana* ve *S. athena* bitkilerinin göstermiş oldukları yüksek antimutajenik özellikler diterpen ve/veya flavonoidleri yüksek miktarda içerebilme potansiyeline sahip olmalarına bağlanabilir.

Yapmış olduğumuz çalışmada, *S. trojana* bitkisinin metanol ekstraktının mutajenik etkiye sahip olmasında ve antimutajenite çalışmasında doza bağlı olarak inhibisyon oranının azalmasında ekstraktın içerdiği kimyasallar etkin rol oynayabilir. Ekstraktların

kimyasal analizi yapılmadığından, içerisinde hangi aktif bileşenlerin olduğu tam olarak bilinmemektedir. Daha önce yapılan fitokimyasal analiz çalışmalarında, *Sideritis* türlerinin içerdiği ana bileşenler arasında flavonoidlerin de bulunduğu tespit edilmiştir. Flavonoidlerin de yer aldığı bir grup kimyasalın, mutajenik etkili olduğu bildirilmiştir (Rietjens ve ark., 2005). *Sambucus australis*, *Bauhnea forficata* ve *Mimosa bimucromata* bitkilerinin su ekstraktlarının Ames testi ile mutajenik potansiyelinin araştırıldığı bir çalışma sonunda, ekstraktların mutajenik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Çıkan pozitif sonuçların, bitkilerin içerdiği tanin ve flavonoid kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür (Bresolin ve Vargas, 1993). Bir çalışmada, *Nitraria retusa* yapraklarından elde edilen çeşitli ekstraktların flavonoid içerikleri belirlenmiştir (Boubaker ve ark., 2010). Kloroform ekstraktında flavonoide rastlanmazken, metanol ekstraktında fazla miktarda tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, mutajenik etkiye sahip *S. trojana* metanol ekstraktının da flavonoidce zengin olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, hem mutajenik aktivitede hem de genetik materyalin korunmasında flavonoidlerin yapısı ve aktivitesi arasında bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Edenharder ve ark., 1993; Beudot ve ark., 1998). Bu nedenle, Kırmızıbekmez ve ark. (2012) tarafından çeşitli flavonoid içeriğine sahip olduğu bildirilen *S. trojana* bitkisinin potansiyel mutajenik etkisinin hangi biyoaktif bileşenden kaynaklandığı, bu kimyasalların izole edilerek ayrı ayrı test edilmesi sonucu anlaşılabilir.

Qualea multiflora ve *Qualea grandiflora* bitkilerinin mutajenik aktivitelerinin Ames test sistemi ile araştırıldığı bir çalışmada, polar ve apolar ekstraktlar elde edilmiştir (Santos ve ark., 2011). Bu ekstraktların eldesinde için de çözücü olarak kloroform, metanol ve su kullanılmıştır. Ekstraktların içerdikleri kimyasallar tespit edildiğinde, metanol ve su ekstraktlarının hemen hemen aynı maddeleri çözdükleri görülmüştür. Dolayısıyla, aynı madde içeriğine sahip iki ekstraktın benzer etkiler göstermesi kaçınılmazdır. Yapmış olduğumuz çalışmada, metanol ve su ekstraktların hem mutajenite hem de antimutajenite sonuçlarının çok benzer çıkması bunu doğrular niteliktedir.

Memeli hücrelerinde, promutajenlerin aktivasyonundan sorumlu enzimler bulunmaktadır. Bu enzimlerin aktivitesi sonucunda, promutajenler mutajenlere dönüşmekte ve bu durum sıklıkla gerçekleşmektedir (Goldstein ve Faletto, 1993). Mutajenik ajanın çok düşük miktarlarına maruz kalmak bile, genotoksik etkinin uyarılması için çoğunlukla yeterli olmaktadır (Abdillahi ve ark., 2012). Bu nedenle, bu enzimlerin

çalışmaya dışarıdan eklenmesiyle, kimyasalların memelilerde göstereceği etki taklit edilmektedir. Çalışmalar, kısaca S9 olarak adlandırılan enzim grubu varlığında tekrarlanmıştır. *S. trojana* ve *S. athoa* bitkileri halk arasında çay olarak tüketildiği için, bu bitkilerin su ekstraktlarının S9 varlığında test edildiği deneylerden alınan sonuçlar daha fazla önem arz etmektedir. Yapılan mutajenite çalışmaları sonucunda, *S. trojana* su ekstraktının test edilen yüksek dozlarının TA100 suşu üzerinde zayıf mutajenik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 22). Aynı ekstraktın antimutajenite çalışmalarında ise, indirekt bir mutajen olan 2AF'nin neden olduğu çerçeve kayması mutasyonunu %26 (160 µg/plak), baz çifti değişimi mutasyonunu %51 (32 µg/plak) oranında engelleyebildiği belirlenmiştir. *S. athoa* su ekstraktının S9 (+) antimutajenesinin araştırıldığı çalışmalar sonucunda ise, test edilen en yüksek dozunun (800 µg/plak) TA98 ve TA100 suşları ile yapılan araştırmalarda sırasıyla %52 ve %43 oranında koruyucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 26 ve 30). Eğer bu etki (inhibisyon oranı) %45'in üzerindeyse, o maddenin güçlü antimutajenik özelliğe sahip olduğu kabul edilmektedir (Negi ve ark., 2003). Ekstraktların antimutajenite çalışmalarında göstermiş oldukları inhibisyon oranları, TA98 suşu için çerçeve kayması tipinde mutasyonu; TA100 suşu için baz çifti değişimi şeklinde oluşan mutasyonu engelleme %'si olarak kabul edilmektedir. Çerçeve kayması mutasyonu diğerine göre daha kararlı olduğundan, genellikle TA98 suşu ile yapılan çalışmalarda % inhibisyon oranları daha düşük çıkmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada ekstraktların genel olarak TA100 suşu üzerinde daha güçlü antimutajenik etki gösterdikleri görülmekle birlikte, bazılarının TA98 suşu üzerinde antimutajenik aktivitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, benzer bir sonuç İpek ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışmada da görülmüştür. *Origanum onites* (Lamiaceae) uçucu yağının genotoksik ve antigenotoksik etkisinin Ames testi ile araştırıldığı çalışmada, TA98 suşunda %50-60, TA100 suşunda ise %40'lık inhibisyon gözlenmiştir.

Çalışmada test edilen ekstraktların sahip olduğu antimutajenik aktivitelerin değişik oranlarda görülmesinin, içerdikleri aktif bileşenlerin ve bunların miktarlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bitkilerle yapılan antimutajenik çalışmalarda, çoğunlukla aktivitenin doza bağlı olarak arttığı gözlenmektedir (Hayder ve ark., 2008). Bu çalışmada da elde edilen inhibisyon değerleri, genellikle doz arttıkça artmaktadır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda; aynı cinse ait türlerin, hatta aynı türün üyelerinin kimyasal içeriklerinin farklı olduğu ve buna bağlı olarak da biyolojik aktivitelerinin değiştiği görülmüştür. Bunun nedenleri arasında genetik farklılıklar, ekstraktın hazırlandığı bitki kısımlarının farklı olması, değişen iklimsel koşullar, yetiştirilen alan, farklı vejetasyon evresi gibi faktörler sayılabilmektedir (Tepe, 2002; Miliauskas ve ark., 2004). Bu nedenle, bu çalışmada elde edilen verilerin iki *Sideritis* türü için farklı olması beklenen bir durumdur. *S. trojana*'nın mutajenik potansiyelinin *S. athoa*'ya göre daha fazla olması ve bazı ekstraktlarının düşük dozlarının *S. athoa*'ya oranla daha güçlü antimutajenik aktivite göstermesi nedeniyle bu türlerin farklı kimyasallar içerdikleri düşünülmektedir.

BÖLÜM 5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan mutajenite çalışmaları sonucunda, *Sideritis trojana* ve *Sideritis athoa* ekstraktlarının test edilen dozlarının çerçeve kayması tipinde bir mutasyona neden olmadıkları saptanmıştır. Bununla birlikte, *S. trojana* metanol ve su ekstraktları ile *S. athoa* metanol ekstraktının yüksek dozlarında S9 (+) baz çifti değişimine yol açabilen zayıf mutajenik etki tespit edilmiştir. Test edilen diğer ekstraktlarda S9 (+) mutajenik aktiviteye rastlanmamıştır.

Yapılan antimutajenite çalışmaları sonucunda, *S. trojana* ve *S. athoa* ekstraktlarının hem baz çifti değişimi hem de çerçeve kayması mutasyonunu S9 (+) ve S9 (-) genelde doza bağlı olarak engellediği gözlenmiştir. Sadece *S. trojana* metanol ekstraktının dozu arttıkça, antimutajenik etkisinin azaldığı saptanmıştır. Ayrıca S9 (+) TA98 suşu ile yapılan çalışmalarda, antimutajenik aktivitesi en yüksek ekstraktın kloroform (%65) ile hazırlanan ekstrakt olduğu belirlenmiştir. S9 (+) TA100 suşu ile yapılan çalışmalarda, genel olarak bütün ekstraktların yüksek oranlarda antimutajenik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir.

S. trojana ve *S. athoa* bitkilerinin mutajenik ve antimutajenik potansiyellerinin araştırıldığı bu çalışma sonunda, çay olarak tüketilen bu bitkilerden *S. trojana*'nın fazla miktarda kullanılması durumunda genetik materyale zarar verme riskinin bulunduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, antimutajenite çalışmaları sonucunda her iki bitkinin test edilen dozlarının genellikle orta ya da güçlü antimutajenik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, bu iki bitkinin kullanımında aşırıya kaçılmadığı sürece zarardan çok yararının olduğu söylenebilir.

S. trojana ve *S. athoa* bitkilerinin mutajenik ve antimutajenik etkilerinden sorumlu aktif bileşenlerin izolasyonu ve karakterizasyonu yapıldıktan sonra, bu kimyasalların farklı test sistemleri kullanılarak genotoksik ya da antigenotoksik potansiyelleri araştırılabilir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilere dayanarak, bitki sekonder metabolitlerinin tedavi edici özelliklerinin yanında hasara uğraticı yönlerinin de bulunduğu bilinmektedir. Dolayısıyla bitkisel ürünleri kullanırken, dozuna ve kullanım süresine dikkat edilmesi gerektiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Abdillahi H.S., Verschaeve L., Finnie J.F. ve Van Staden J., 2012. Mutagenicity, Antimutagenicity and Cytotoxicity Evaluation of South African *Podocarpus* Species. *Journal of Ethnopharmacology*, 139 (3): 728-738.
- Akı C., 2007. Genel Genetik (4. Baskı). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Teksirleri Serisi No:1, Çanakkale. 60-62.
- Akın D., 2010. *Celtis glabrata*'nın Bazı Ekstraktlarının Ames/*Salmonella* Mikrozoom Test Sistemi ile Antimutajenik Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Al-Bataina B.A., Maslat A.O. ve Al-Kofahi M.M., 2003. Element Analysis and Biological Studies on Ten Oriental Spices Using XRF and Ames Test. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 17 (2): 85-90.
- Aleem A. ve Malik A., 2003. Genotoxic Hazards of Long-Term Application of Wastewater on Agricultural Soil. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538: 145-154.
- Alves A.M., Vidal L.S., Kuster R.M., Lage C. ve Leitão A.C., 2009. Genotoxic and Mutagenic Effects of *Melissa officinalis* (Erva Cidreira) Extracts. *The Open Toxicology Journal*, 3: 58-69.
- Al-Zubairi A.S., Abdul A.B. ve Syam M.M., 2010. Evaluation of The Genotoxicity of Zerumbone in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, 24: 707-712.
- Ames B.N., 1971. The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria. In: Hollaender, A., Ed. *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*. Plenum, New York. 267-282.
- Ames B.N., Lee F.D. ve Durston W.E., 1973. An Improved Bacterial Test System for The Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 782-786.

- Ames B.N., McCann J. ve Yamasaki E., 1975. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with The *Salmonella*/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 31: 347-364.
- Ames B.N., 1983. Dietary Carcinogens and Anticarcinogens: Oxygen Radicals and Degenerative Diseases. *Science*, 221: 1256-1264.
- Aslan İ., Kılıç T., Gören A.C. ve G., 2006. Toxicity of Acetone Extract of *Sideritis trojana* and 7-Epicandicandiol, 7-Epicandicandiol Diacetate and 18-Acetylsideroxol against Stored Pests *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Sitophilus granarius* (L.) and *Ephestia kuehniella* (Zell.). *Industrial Crops and Products*, 23: 171-176.
- Balandrin M.F., Kinghorn A.D. ve Farnsworth N.R., 1993. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development: An Overview. In: Kinghorn, A.D. ve Balandrin, M.F., Eds. *Human Medicinal Agents from Plants*. American Chemical Society Books, Washington, DC. 2-12.
- Barber J.C., Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A., Turner K.G. ve Jansen R.K., 2002. Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: Lamiaceae) Inferred from Nuclear and Chloroplast Sequence Datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23: 293-306.
- Başer K.H.C., Honda G. ve Miki W., 1986. *Herb Drugs and Herbalists in Turkey*. Studia Culturae Islamicae 27, Institute for the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, Tokyo. 54.
- Başer K.H.C., Bondi M.L., Bruno M., Kırımer N., Piozzi F., Tümen G. ve Vassallo N., 1996. An Ent-Kaurane from *Sideritis huber morathii*. *Phytochemistry*, 43: 1293-1295.
- Beudot C., De Méo M.P., Dauzonne D., Elias R., Laget M., Guiraud H., Balasard G. ve Duménil G., 1998. Evaluation of The Mutagenicity and Antimutagenicity of Forty-two 3-Substituted Flavones in The Ames Test. *Mutation Research*, 417: 141-153.
- Bhattacharya S., 2011. Natural Antimutagens: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5 (2): 116-126.

- Birt D.F., Hendrich S. ve Wang W., 2001. Dietary Agents in Cancer Prevention: Flavonoids and Isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90: 157-177.
- Blot W.J., McLaughlin J.K. ve Chow W.H., 1997. Cancer Rates among Drinkers of Black Tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37: 739-760.
- Bondi M.L., Bruno M., Piozzi F., Başer K.H.C. ve Simmonds M.S., 2000. Diversity and Antifeedant Activity of Diterpenes from Turkish Species of *Sideritis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28 (4): 299-303.
- Boone C.W., Kelloff G.J. ve Malone W.E., 1990. Identification of Cancer Chemotherapy Agents and their Evaluation in Animal Models and Human Clinical Trials: A Review. *Cancer Research*, 50: 2-9.
- Boubaker J., Skandrani I., Bouhlel I., Ben Sghaier M., Neffati A., Ghedira K. ve Chekir-Ghedira L., 2010. Mutagenic, Antimutagenic and Antioxidant Potency of Leaf Extracts from *Nitraria retusa*. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2283-2290.
- Bouhlel I., Kilani S., Skandrani I., Ben Amar R., Nefatti A., Laporte F., Hininger-Favier I., Ghedira K. ve Chekir-Ghedira L., 2008. *Acacia salicina* Extracts Protect Against DNA Damage and Mutagenesis in Bacteria and Human Lymphoblast Cell K562 Cultures. *Nutrition Research*, 28: 190-197.
- Brankovic S., Kitic D., Radenkovic M., Veljkovic S., Jankovic T., Savikin K. ve Zdunic G., 2011. Spasmolytic Activity of The Ethanol Extract of *Sideritis raeseri* spp. *raeseri* Boiss. & Heldr. on The Isolated Rat Ileum Contractions. *Journal of Medicinal Food*, 14 (5): 495-498.
- Bresolin S. ve Vargas V.M.F., 1993. Mutagenic Potencies of Medicinal Plants Screened in The Ames Test. *Phytotherapy Research*, 7 (3): 260-262.
- Brindzová L., Mikulášová M., Takácsová M., Mošovská S. ve Opattová A., 2009. Evaluation of The Mutagenicity and Antimutagenicity of Extracts from Oat, Buckwheat and Wheat Bran in The *Salmonella*/Microsome Assay. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 87-90.

- Bruno M., Rosselli S., Pibiri I., Kilgore N. ve Lee K.H., 2002. Anti-HIV Agents Derived from The Ent-Kaurene Diterpenoid Linearol. *Journal of Natural Products*, 65: 1594-1597.
- Calvo T.R., Cardoso C.R.P., da Silva Moura A.C., dos Santos L.C., Colus I.M.S., Vilegas W. ve Varanda E.A., 2011. Mutagenic Activity of *Indigofera truxillensis* and *I. suffruticosa* Aerial Parts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
- Campbell N.A. ve Reece J.B., 2010. Biyoloji (3. Baskı). Gündüz, E., Demirsoy, A. ve Türkan, İ., Eds. Palme Yayıncılık, Ankara. 279-325.
- Cardoso C. ve Cólus I., 2006. Mutagenic Activity Promoted by Amentoflavone and Methanolic Extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology*, 225 (1): 55-63.
- Cariño-Cortés R., Hernández-Ceruelos A., Torres-Valencia J.M., González-Avila M., Arriaga-Alba M. ve Madrigal-Bujaidar E., 2007. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* Evaluated with The Ames Test. *Toxicology in Vitro*, 21: 691-697.
- Cerná M., Pastorková A., Smíd J., Bavorová H., Ocadlíková D., Rössner P. ve Zavadil J., 1996. Genotoxicity of Industrial Effluents, River Waters and Their Fractions Using The Ames Test and in Vitro Cytogenetic Assay. *Toxicology Letters*, 88 (1-3): 191-197.
- Cerná M., Pochmanová D., Pastorková A., Benes I., Leníček J., Topinka J. ve Binková B., 2000. Genotoxicity of Urban Air Pollutants in The Czech Republic Part I. Bacterial Mutagenic Potencies of Organic Compounds Absorbed on PM10 Particulates. *Mutation Research*, 469: 71-82.
- Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. ve Espinosa-Aguirre J.J., 2004. Antimutagenicity of Coriander (*Coriandrum sativum*) Juice on The Mutagenesis Produced by Plant Metabolites of Aromatic Amines. *Toxicology Letters*, 153: 283-292.
- Çarıkçı S., Çöl Ç., Kılıç T. ve Azizoğlu A., 2007. Diterpenoids from *Sideritis tmolea* P.H. Davis. *Records of Natural Products*, 1 (4): 44-50.

- Çelik S., Karabacak E. ve Uysal İ., 2008. Plants have been Collected from Mythological Kazdağı (Mt. Ida) National Park, West Turkey by Turkmens and their Folk, Cultural and Social Uses. *European Journal of Scientific Research*, 19 (4): 835-843.
- Davis P.H., 1982. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands* (Vol. 7). Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Davis P.H., Tan K. ve Mill R.R., 1988. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands* (Vol. 10). Edinburgh University Press, Edinburgh.
- De Flora S. ve Ramel C., 1988. Mechanisms of Inhibitors of Mutagenesis and Carcinogenesis. Classification and Overview. *Mutation Research*, 202: 285-306.
- Dean B. J., Brooks T. M., Hodson-Walker G. ve Hutson D.H., 1985, Genetic Toxicology Testing of 41 Industrial Chemicals. *Mutation Research*, 153 (1-2): 57-77.
- Debeleç-Bütüner B. ve Kantarcı G., 2006. Mutasyon, DNA Hasarı ,Onarım Mekanizmaları ve Kanslerle İlişkisi. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 35 (2): 149-170.
- Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral G., Angeles-López G.E., Navarrete A. ve Mata R., 2007. Acute Toxicity and Mutagenic Activity of Mexican Plants Used in Traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 334-342.
- Demirtaş İ., Şahin A., Ayhan B., Tekin S. ve Telci İ., 2009. Antiproliferative Effects of The Methanolic Extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis*. *Records of Natural Products*, 3 (2): 104-109.
- Di Sotto A., Mastrangelo S., Romussi G., Bisio A. ve Mazzanti G., 2009. Antimutagenic Activity of A Secoisopimarane Diterpenoid from *Salvia cinnabarina* M. Martens et Galeotti in The Bacterial Reverse Mutation Assay. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2092–2096.
- Dreosti I.E., Wargovich M.J. ve Yang C.S., 1997. Inhibition of Carcinogenesis by Tea: The Evidence from Experimental Studies. *Critical Reviews in Food Science and*

Nutrition, 37: 761-770.

- Dülger B., Gönüz A. ve Bican T., 2005. Antimicrobial Studies on Three Endemic Species of *Sideritis* from Turkey. *Acta Biologica Cracoviensia*, 47: 153-156.
- Dülger B., Gönüz A. ve Aysel V., 2006. Inhibition of Clotrimazole-Resistant *Candida albicans* by Some Endemic *Sideritis* Species from Turkey. *Fitoterapia*, 77: 404-405.
- Edenharder R., Van Petersdorf I. ve Rauscher V., 1993. Antimutagenic Effects of Flavonoids, Chalcones and Structurally Related Compounds on The Activity of 2-Amino-3-Methylimidazol(4,5-F)Quinoline (IQ) and Other Heterocyclic Amine Mutagens from Cooked Food. *Mutation Research*, 287: 261-274.
- Elgorashi E.E., Taylor J.L.S., Maes A., Van Staden J., De Kimpe N. ve Verschaeve L., 2003. Screening of Medicinal Plants Used in South African Traditional Medicine for Genotoxic Effects. *Toxicology Letters*, 143: 195-207.
- Eren Y., 2011. Bazı *Limonium* Türlerine ait Bitki Ekstrelerinin Mutajenik Etkilerinin Farklı Test Sistemleri ile Belirlenmesi. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Ertuş A., Öztürk M., Boğa M. ve Topçu G., 2009. Antioxidant and Anticholinesterase Activity Evaluation of Ent-Kaurane Diterpenoids from *Sideritis arguta*. *Journal of Natural Products*, 72: 500-502.
- Ezer N., Sakar M.K., Rodriguez B. ve De la Torre M.C., 1992. Flavonoid Glycosides and A Phenylpropanoid Glycoside from *Sideritis perfoliata*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 30: 61-65.
- Ezer N. ve Akcoş Y., 1995. Flavonoids from *Sideritis lycia*. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara*, 15 (2): 81-87.
- Ezer N., Vila R., Canigüeral S. ve Adzet T., 1996. Essential Oil Composition of Four Turkish Species of *Sideritis*. *Phytochemistry*, 41: 203-205.
- Ferguson L.R., 1994. Antimutagens as Cancer Chemopreventive Agents in The Diet. *Mutation Research*, 307: 395-410.

- Fernández C., Fraga B.M. ve Hernández M.G., 1986. Diterpenes from *Sideritis infernalis*. *Phytochemistry*, 25: 2573-2576.
- Fernández C., Fraga B. ve Hernández M., 1988. Flavonoid Aglycones from Some Canary Islands Species of *Sideritis*. *Journal of Natural Products*, 51: 591-593.
- Ferreira I.C.D.F. ve Vargas V.M.F., 1999. Mutagenicity of Medicinal Plant Extracts in *Salmonella*/Microsome Assay. *Phytotherapy Research*, 13: 397-400.
- Font Quer P., 1999. *Plantas Medicinales: El Dioscórides Renovado*. Ediciones Península, Barcelona. 1184 p.
- Forster R., 1986. Mutagenicity Testing and Biomaterials. In: Williams, D.F., Ed. *Techniques of Biocompatibility Testing* (Vol. 2). CRC Press, Baco Raton, Florida.137-149.
- Fraga B.M., Hernández M.G., Fernández C. ve Arteaga J.M., 1987. Diterpenes from *Sideritis dendrochahorra* and *Sideritis cystosiphon*. *Phytochemistry*, 26: 775-777.
- Fraga B., Hernández M. ve Diaz C., 2003. On The *Ent*-kaurene Diterpenes from *Sideritis athoa*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 17 (2): 141-144.
- Fraga B.M., Hernández M.G., Fernández C. ve Santana J.M.H., 2009. A Chemotaxonomic Study of Nine Canarian *Sideritis* Species. *Phytochemistry*, 70: 1038-1048.
- Gadano A.B., Gumi A.A. ve Carballo M.A., 2006. Argentine Folk Medicine: Genotoxic Effects of Chenopodiaceae Family. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 246-251.
- Gatehouse D.G., Rowland I.R., Wilcox P., Callander R.D. ve Foster R., 1990. Basic Mutagenicity Ukems Recommended Procedures. In: Kirkland, D.J., Ed. *Bacterial Mutation Assay*. The Bath Press, Avon, Great Britain, UK.
- Ghazali A.R., Abdullah R., Ramli N., Rajab N.F., Ahmad-Kamal M.S. ve Yahya N.A., 2011. Mutagenic and Antimutagenic Activities of *Mitragyna speciosa* Korth Extract using Ames Test. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (8): 1345-1348.

- Goldstein J.A. ve Faletto M.B., 1993. Advances in Mechanisms of Activation and Deactivation of Environmental Chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 100: 169-176.
- Gomes-Carneiro M.R., Felzenszwalb I. ve Paumgarten F.J.R., 1998. Mutagenicity Testing of (±)-Camphor, 1,8-Cineole, Citral, Citronellal, (-)-Menthol and Terpineol with The *Salmonella*/Microsome Assay. *Mutation Research*, 416: 129-136.
- González A.G., Fraga B.M., Hernández M.G., Larruga F., Luis J.G. ve Ravelo A.G., 1978. Flavones from Some Canary Species of *Sideritis*. *Lloydia*, 41: 279-280.
- González-Burgos E., Carretero M.E. ve Gómez-Serranillos M.P., 2011. *Sideritis* spp.: Uses, Chemical Composition and Pharmacological Activities-A Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 135 (2): 209–225.
- Gören A.C., 1997. *Sideritis athoa* Papanikolau et Kokkini Bitkisinin Diterpen Bileşiklerinin İzolasyonu ve Yapı Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Güllüce M., Karadayı M., Güvenalp Z., Özbek H., Arasoğlu T. ve Barış Ö., 2012. Isolation of Some Active Compounds from *Origanum vulgare* L. ssp *vulgare* and Determination of Their Genotoxic Potentials. *Food Chemistry*, 130 (2): 248-253.
- Güner A., Özhatay N., Ekim T. ve Başer K.H.C. (Eds), 2000. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands* (Vol. 11, Supplement 2). Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Gürbüz İ., Özkan A.M., Yeşilada E. ve Kutsal O., 2005. Anti-Ulcerogenic Activity of Some Plants used in Folk Medicine of Pınarbaşı (Kayseri, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 313-318.
- Güvenç A., Okada Y., Küpeli Akkol E., Duman H., Okuyama T. ve Çalış İ., 2010. Investigations of Anti-Inflammatory, Antinociceptive, Antioxidant and Aldose Reductase Inhibitory Activities of Phenolic Compounds from *Sideritis brevibracteata*. *Food Chemistry*, 118: 686-692.

- Halfon B., Gören A.C., Ertaş A. ve Topçu G., 2011. Complete ^{13}C NMR Assignments for *Ent*-kaurane Diterpenoids from *Sideritis* Species. *Magnetic Resonance in Chemistry Letters*, 49: 291-294.
- Hardison R.C., 2005. Mutation and Repair of DNA. In: *Working with Molecular Genetics*, 21 Mayıs 2012, <http://www.personal.psu.edu/rch8/workmg/RepairDNACH7.pdf>.
- Hayashi Y., 1992. Overview of Genotoxic Carcinogens and Non-genotoxic Carcinogens. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 44: 465-472.
- Hayder N., Skandrani I., Kilani S., Bouhlel I., Abdelwahed A., Ben Ammar R., Mahmoud A., Ghedira K. ve Chekir-Ghedira L., 2008. Antimutagenic Activity of *Myrtus communis* L. Using The *Salmonella* Microsome Assay. *South African Journal of Botany*, 74: 121-125.
- Hernández-Pérez M., Sánchez-Mateo C.C., Montalbetti-Moreno Y. ve Rabanal R.M., 2004. Studies on The Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb Aerial Part. *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 279-284.
- Hong C.E. ve Lyu S.Y., 2011. Genotoxicity Detection of Five Medicinal Plants in Nigeria. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36 (1): 87-93.
- Hong C.E., Cho M.C., Jang H.A. ve Lyu S.Y., 2011. Mutagenicity and Anti-Mutagenicity of *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36 (5): 661-668.
- Horn R.C. ve Vargas V.M.F., 2008. Mutagenicity and Antimutagenicity of Teas Used in Popular Medicine in The *Salmonella*/Microsome Assay. *Toxicology in Vitro*, 22: 1043-1049.
- Ikken Y., Morales P., Martinez A., Marin M.L., Haza A.I. ve Cambero M.I., 1999. Antimutagenic Effect of Fruit and Vegetable Ethanolic Extracts against *N*-Nitrosoamines Evaluated by The Ames Test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3257-3264.

- İpek E., Zeytinođlu H., Okay S., Tüylü B.A., Kürkçüođlu M. ve Başer K.H.C., 2005. Genotoxicity and Antigenotoxicity of Origanum Oil and Carvacrol Evaluated by Ames *Salmonella*/Microsomal Test. *Food Chemistry*, 93: 551-556.
- İşcan G., Kırırner N., Kürkçüođlu M. ve Başer K.H.C., 2005. Composition and Antimicrobial Activity of The Essential Oils of Two Endemic Species from Turkey: *Sideritis cilicica* and *Sideritis bilgerana*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41: 679-682.
- Jayaprakasha G.K., Negi P.S., Jena B.S., Jagan Mohan Rao L., 2007. Antioxidant and Antimutagenic Activities of *Cinnamomum zeylanicum* Fruit Extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 330-336.
- Josephy P.D., Gruz P. ve Nohmi T., 1997. Recent Advances in The Construction of Bacterial Genotoxicity Assays. *Mutation Research*, 386: 1-23.
- Kaur K., Arora S., Kumar S. ve Nagpal A., 2002. Antimutagenic Activities of Acetone and Methanol Fractions of *Terminalia arjuna*. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1475-1482.
- Keeton W.T., Gould J.L. ve Gould C.G., 2003. Genel Biyoloji 1 (2. Baskı). Demirsoy, A., Türkan, İ. ve Gündüz, E., Eds. Palme Yayıncılık, Ankara. 250-252.
- Kılıç T., Yıldız Y.K., Gören A.C., Tümen G. ve Topçu G., 2003. Phytochemical Analysis of Some *Sideritis* Species of Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 39 (5): 453-456.
- Kılıç T., Çarıkçı S., Topçu G., Aslan İ. ve Gören A.C., 2009. Diterpenoids from *Sideritis condensata*. Evaluation of Chemotaxonomy of *Sideritis* Species and Insecticidal Activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 45 (6): 918-920.
- Kırırner N., Tabanca N., Demirci B., Başer K.H.C., Duman H. ve Aytaç Z., 2001. The Essential Oil of A New *Sideritis* Species: *Sideritis ozturkii* Aytac and Aksoy. *Chemistry of Natural Compounds*, 37: 234-237.
- Kırmızıbekmez H., Arıburnu E., Masullo M., Festa M., Capasso A., Yeşilada E. ve Piacente S., 2012. Iridoid, Phenylethanoid and Flavonoid Glycosides from

Sideritis trojana. *Fitoterapia*, 83: 130-136.

- Kilani S., Ben Ammar R., Bouhlef I., Abdelwahed A., Hayder N., Mahmoud A., Ghedira K. ve Chekir-Ghedira L., 2005. Investigation of Extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as Antimutagens and Radical Scavengers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20: 478-484.
- Kool H.J., Van Kreyf C.F. ve Persad S., 1989. Mutagenic Activity in Groundwater in Relation to Mobilization of Organic Mutagens in Soil. *Science of the Total Environment*, 84: 185-199.
- Lakashmi B., Ajith T.A., Jose N. ve Janardhanan K.K., 2003. Antimutagenic Activity of Methanolic Extract of *Ganoderma lucidum* and Its Effect on Hepatic Damage Caused by Benzo[a]Pyrene. *Journal of Ethnopharmacology*, 19: 297-303.
- Lelie D., Regniers L., Borremans B., Provoost A. ve Verschaeve L., 1997. The VITOTOX Test, An SOS Bioluminescence *Salmonella typhimurium* Test to Measure Genotoxicity Kinetics. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 389 (2-3): 279-290.
- Lewtas J., 1988. Genotoxicity of Complex Mixtures: Strategies for The Identification and Comparative Assessment of Airborne Mutagens and Carcinogens from Combustion Sources. *Fundamental and Applied Toxicology*, 10: 571-589.
- Li N., Song Y., Zhang W., Wang W., Chen J., Wong A.W. ve Roberts A., 2007. Evaluation of The *in Vitro* and *in Vivo* Genotoxicity of Magnolia Bark Extract. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 49: 154-159.
- Li B., Jin Y., Xu Y., Wu Y., Xu J. ve Tu Y., 2011. Safety Evaluation of Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Flower Extract: Assessment of Mutagenicity, and Acute and Subchronic Toxicity in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 583-590.
- Liman R., Eren Y., Akyıl D. ve Konuk M., 2011. Determination of Mutagenic Potencies of Aqueous Extracts of *Thermopsis turcica* by Ames Test. *Turkish Journal of Biology*, 35:1-8.

- Loğoğlu E., Arslan S., Öktemer A. ve Şakıyan İ., 2006. Biological Activities of Some Natural Compounds from *Sideritis siphylea* Boiss. *Phytotherapy Research*, 20 (4): 294-297.
- Loh D.S.Y., Er H.M. ve Chen Y.S., 2009. Mutagenic and Antimutagenic Activities of Aqueous and Methanol Extracts of *Euphorbia hirta*. *Journal of Ethnopharmacology*, 126: 406-414.
- Lupi S., Marconi S., Paiaro E., Fochesato A. ve Gregorio P., 2009. Mutagenicity Evaluation with Ames Test of Hydro-Alcoholic Solution of Terpenes. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 50: 170-174.
- Marnewick J.L., Gelderblom W.C.A. ve Joubert E., 2000. An Investigation on The Antimutagenic Properties of South African Herbal Teas. *Mutation Research*, 471: 157-166.
- Maron D.M. ve Ames B.N., 1983. Revised Methods for The *Salmonella* Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 113: 173-215.
- McCann ve Ames, 1976. Detection of Carcinogens as Mutagens in The *Salmonella*/Microsome Test: Assay of 300 Chemicals: Discussion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73 (3): 950-954.
- Merwe J.D., Joubert E., Richards E.S., Manley M., Snijman P.W., Marnewick J.L. ve Gelderblom W.C.A., 2006. A Comparative Study on The Antimutagenic Properties of Aqueous Extracts of *Aspalathus linearis* (Rooibos), Different *Cyclopia* spp. (Honeybush) and *Camellia sinensis* Teas. *Mutation Research*, 611: 42-53.
- Migliore L. ve Coppede F., 2002. Genetic and Environmental Factors in Cancer and Neurodegenerative Diseases. *Mutation Research*, 512: 135-153.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R. ve van Beek T.A., 2004. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237.

- Mitscher L.A., Drake S., Gollapuri S.R., Harris J.A. ve Shankel D.M., 1986. *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*. Plenum Press, New York.
- Mortelmans K. ve Zeiger E., 2000. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 455: 29-60.
- Mošovská S., Mikulášová M., Brindzová L., Valík Ľ ve Mikušová L., 2010. Genotoxic and Antimutagenic Activities of Extracts from Pseudocereals in The *Salmonella* Mutagenicity Assay. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1483-1487.
- Muhammad H., Gomes-Carneiro M.R., Poça K.S., De-Oliveira A.C.A.X., Afzan A., Sulaiman S.A., Ismail Z. ve Paumgartten F.J.R., 2011. Evaluation of The Genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* Aqueous Extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 647-653.
- Negi P.S., Jayaprakasha G.K. ve Jena B.S., 2003. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Pomegranate Peel Extracts. *Food Chemistry*, 80: 393-397.
- Özkan G., Sağdıç O., Özcan M., Özçelik H. ve Ünver A., 2005. Antioxidant and Antibacterial Activities of Turkish Endemic *Sideritis* Extracts. *Grasas y Aceites*, 56 (1): 16-20.
- Özkavalalı Ö., 2010. Antimikrobiyal Aktivitesi Olan Bazı Bitkilerin Gıda Konservelerinin Korunmasında Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Öztürk Y., Aydın S., Öztürk N. ve Başer K.H.C., 1996. Effects of Extracts from Certain *Sideritis* Species on Swimming Performance in Mice. *Phytotherapy Research*, 10 (1): 70-73.
- Paolini M. ve Forti G.C., 1997. On The Metabolizing Systems for Short-Term Genotoxicity Assays A Review. *Mutation Research*, 387: 17-34.
- Pezzuto J.M., 1997. Plant-Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology*, 2: 121-133.
- Piozzi F., Venturella P., Bellino A. ve Mondelli R., 1968. Diterpenes from *Sideritis sicula* Ucria. *Tetrahedron*, 24: 4073-4081.

- Piozzi F., Bruno M., Rosselli S. ve Maggio A., 2006. The Diterpenoids from The Genus *Sideritis*. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33: 493-540.
- Polat R. ve Satıl F., 2012. An Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants in Edremit Gulf (Balıkesir – Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139: 626-641.
- Rajaei A., Barzegar M., Mobarez A.M., Sahari M.A. ve Esfahani Z.H., 2010. Antioxidant, Anti-Microbial and Antimutagenicity Activities of Pistachio (*Pistachia vera*) Green Hull Extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 107-112.
- Ramos A., Edreira A., Vizoso A., Betancourt J., López M. ve Décalo M., 1998. Genotoxicity of An Extract of *Calendula officinalis* L.. *Journal of Ethnopharmacology*, 61: 49-55.
- Rausher R., Edenharder R. ve Platt K.L., 1998. *In Vitro* Antimutagenic and *in Vivo* Anticlastogenic Effects of Carotenoids and Solvent Extracts from Fruits and Vegetables Rich in Carotenoids. *Mutation Research*, 413: 129-142.
- Reid K.A., Maes J., Maes A., van Staden J., De Kimpe N., Mulholland D.A. ve Verschaeve L., 2006. Evaluation of The Mutagenic and Antimutagenic Effects of South African Plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 44-50.
- Resende F.A., Munari C.C., Neto M.D.B.M., Tavares D.C., Bastos J.K., da Silva A.A. ve Varanda E.A., 2012. Comparative Studies of The (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by The Bacterial Reverse Mutation Test. *Molecules*, 17: 2335-2350.
- Reyes M.R., Reyes-Esparza J., Ángeles O.T. ve Rodríguez-Fragoso L., 2010. Mutagenicity and Safety Evaluation of Water Extract of *Coriander sativum* Leaves. *Journal of Food Science*, 75 (1): 6-12.
- Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., Woude H., Jeurissen S.M.F., Schutte M.E. ve Alink G.M., 2005. Flavonoids and Alkenylbenzenes: Mechanisms of Mutagenic Action and Carcinogenic Risk. *Mutation Research*, 574: 124-178.
- Sağdıç O., Aksoy A., Özkan G., Ekici L. ve Albayrak S., 2008. Biological Activities of The Extracts of Two Endemic *Sideritis* Species in Turkey. *Innovative Food*

- Sakura A., Suzuki S. ve Satoh T., 2004. Improvement of The Ames Test Using Human Liver S9 Preparation. In: Yan, Z. ve Caldwell, G., Eds. *Optimization in Drug Discovery: in Vitro Methods*. Humana Press. 325-336.
- Sánchez-Lamar A., Fonseca G., Fuentes J.L., Cozzi R., Cundari E., Fiore M., Ricordy R., Perticone P., Degrassi F. ve De Salvia R., 2008. Assessment of The Genotoxic Risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) Whole Fruit Extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 115 (3): 416-422.
- Sannomiya M., Cardoso C.R.P., Figueiredo M.E., Rodrigues C.M., Santos L.C., Santos F.V., Serpeloni J.M., Cólus I.M.S., Vilegas W. ve Varanda E.A., 2007. Mutagenic Evaluation and Chemical Investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. Leaf Extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 319-326.
- Santos F.V., Colus I.M.S., Silva M.A., Vilegas W. ve Varanda E.A., 2006. Assessment of DNA Damage Induced by Extracts and Fractions of *Strychnos pseudoquina*, A Brazilian Medicinal Plant with Antiülcerogenic Activity. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1585-1589.
- Santos F.V., Tubaldini F., Cólus I.M.S., Andreo M.A., Bauab T.M., Leite C.Q., Vilegas W. ve Varanda E.A., 2008. Mutagenicity of *Mouriri pusa* Gardner and *Mouriri elliptica* Martius. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2721-2727.
- Santos F.V., Nasser A.L.M., Biso F.I., Moreira L.M., Santos V.J.S.V., Vilegas W. ve Varanda E.A., 2011. Genotoxicity of Polar and Apolar Extracts Obtained from *Qualea multiflora* and *Qualea grandiflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 138: 105-110.
- Schippmann U., Leaman D. ve Cunningham A.B., 2006. Cultivation and Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants under Sustainability Aspects. In: Bogers, R.J., Craker, L.E. ve Lange, D., Eds. *Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, Dordrecht, Wageningen UR Frontis. 17.

- Sghaier M.B., Bhourri W., Bouhlel I., Skandrani I., Boubaker J., Chekir-Ghedira L. ve Ghedira K., 2011a. Inhibitory Effect of *Teucrium ramosissimum* Extracts on Aflatoxin B1, Benzo[a]pyrene, 4-Nitro-o-Phenylenediamine and Sodium Azide Induced Mutagenicity: Correlation with Antioxidant Activity. *South African Journal of Botany*, 77: 730-740.
- Sghaier M.B., Boubaker J., Skandrani I., Bouhlel I., Limem I., Ghedira K. ve Chekir-Ghedira L., 2011b. Antimutagenic, Antigenotoxic and Antioxidant Activities of Phenolic-Enriched Extracts from *Teucrium Ramosissimum*: Combination with Their Phytochemical Composition. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31: 220-232.
- Shang X., He X., He X., Li M., Zhang R., Fan P., Zhang Q. ve Jia Z., 2010. The Genus *Scutellaria* An Ethnopharmacological and Phytochemical Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 128 (2): 279-313.
- Singh B.N., Singh B.R., Singh R.L., Prakash D., Singh D.P., Sarma B.K., Upadhyay G. ve Singh H.B., 2009. Polyphenolics from Various Extracts/Fractions of Red Onion (*Allium cepa*) Peel with Potent Antioxidant and Antimutagenic Activities. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1161-1167.
- Şahin F.P., Ezer N. ve Çalış İ., 2004. Three Acylated Flavone Glycosides from *Sideritis ozturkii* Aytac & Aksoy. *Phytochemistry*, 65: 2095-2099.
- Tadić V.M., Jeremic I., Dobric S., Isakovic A., Markovic I., Trajkovic V., Bojovic D. ve Arsic I., 2009. Anti-Inflammatory, Gastroprotective and Cytotoxic Effects of *Sideritis scardica* Extracts. *Planta Medica*, 78 (5): 415-427.
- Tepe B., 2002. Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Bitki Türlerinin [*Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. et Scheng., *Origanum syriacum* (L.) var. *bevanii* (Holmes), *Salvia tomentosa* (Miller), *Thymus eigii* (M. Zohary et P.H. Davis) Jalas] Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tolan V., Toker Z., Özdemir S., Demirci Ö., Otludil B. ve Özen H.Ç., 2009. Mutagenicity of *Hypericum lysimachioides* Extracts. *Pharmaceutical Biology*, 47 (11): 1035-

1041.

- Topçu G., Gören A.C., Yıldız Y.K. ve Tümen G., 1999. *Ent*-kaurene Diterpenes from *Sideritis athoa*. *Natural Product Letters*, 14 (2): 123-129.
- Topçu G., Gören A.C., Kılıç T., Yıldız Y.K. ve Tümen G., 2002. Diterpenes from *Sideritis trojana*. *Natural Product Letters*, 16 (1): 33-37.
- Topçu G. ve Ulubelen A., 2007. Structure Elucidation of Organic Compounds from Natural Sources Using 1D and 2D NMR Techniques. *Journal of Molecular Structure*, 834-836: 57-73.
- Tsuboy M.S., Marcarini J.C., Ferreira D.T., Ferraz E.R.A., Chequer F.M.D., De Oliveira D.P., Ribeiro L.R. ve Mantovani M.S., 2010. Evaluation of Extracts from *Coccoloba mollis* Using The *Salmonella*/Microsome System and *in Vivo* Tests. *Genetics and Molecular Biology*, 33 (3): 542-548.
- Tunalier Z., Koşar M., Öztürk N., Başer K.H.C., Duman H. ve Kırimer N., 2004. Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Sideritis* Species. *Chemistry of Natural Compounds*, 40: 206-210.
- Umbuzeiro G.A., Roubicek D.A., Rech C.M., Sato M.I. ve Claxton L.D., 2004. Investigating The Sources of The Mutagenic Activity Found in A River Using The *Salmonella* Assay and Different Water Extraction Procedures. *Chemosphere*, 54: 1589-1597.
- Varanda E.A., Pozetti G.L., Lourenço M.V., Vilegas W. ve Raddi M.S.G., 2002. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* Measured by The *Salmonella*/Microsome Assay and Chromosomal Aberrations in CHO Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 257-264.
- Venitt S. ve Parry J.M., 1984. Background to Mutagenicity Testing. In: Venitt, S. ve Parry, J.M., Eds. *Mutagenicity Testing*. IRL Press Limited, Oxford. 1-22.
- Venturella P., Bellino A. ve Piozzi F., 1975. Diterpenes from *Sideritis theezans*. *Phytochemistry*, 14: 1451-1452.

- Verschaeve L., Kestens V., Taylor J.L.S., Elgorashi E.E., Maes A., Van Puyvelde L., De Kimpe N. ve Van Staden J., 2004. Investigation of The Antimutagenic Effects of Selected South African Medicinal Plant Extracts. *Toxicology in Vitro*, 18: 29-35.
- Vu B., Alves C.A., Gonçalves C., Pio C., Gonçalves F. ve Pereira R., 2012. Mutagenicity Assessment of Aerosols in Emissions from Wood Combustion in Portugal. *Environmental Pollution*, 166: 172-181.
- Watanabe T., Takahashi K., Konishi E., Hoshino Y., Hasei T., Asanoma M., Hirayama T. ve Wakabayashi K., 2008. Mutagenicity of Surface Soil from Residential Areas in Kyoto City, Japan, and Identification of Major Mutagens. *Mutation Research*, 649: 201-212.
- Wattenberg L.W., 1996. Chemoprevention of Cancer. *Preventive Medicine*, 25 (1): 44-45.
- Weisburger J.H., 2001. Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, from The Past to The Future. *Mutation Research*, 480-481: 23-35.
- Wongwattanasathien O., Kangsadalampai K. ve Tongyonk L., 2010. Antimutagenicity of Some Flowers Grown in Thailand. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1045-1051.
- Zahin M., Aqil F. ve Ahmad I., 2010a. Broad Spectrum Antimutagenic Activity of Antioxidant Active Fraction of *Punica granatum* L. Peel Extracts. *Mutation Research*, 703: 99-107.
- Zahin M., Ahmad I. ve Aqil F., 2010b. Antioxidant and Antimutagenic Activity of *Carum copticum* Fruit Extracts. *Toxicology in Vitro*, 24: 1243-1249.
- Zarzuelo A., Garcia E., Jimenez J., Ocete M.A., Utrilla P. ve Socorro O., 1993. Antiinflammatory and Anti-Ulcerative Activity of Various Species of The Genus *Sideritis* from The Alpujarra Region of Spain. *Fitoterapia*, 64: 26-30.
- Žegura B., Dobnik D., Niderl M.H. ve Filipič M., 2011. Antioxidant and Antigenotoxic Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 Cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32: 296-305.

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan <i>Salmonella typhimurium</i> suşlarının genetik özellikleri	26
Çizelge 2. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinin farklı ekstraktlarının verimlilik oranları	43
Çizelge 3. <i>S. trojana</i> bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkileri	51
Çizelge 4. <i>S. athoa</i> bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkileri	52
Çizelge 5. <i>S. trojana</i> bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	59
Çizelge 6. <i>S. trojana</i> bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	60
Çizelge 7. <i>S. athoa</i> bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	61
Çizelge 8. <i>S. athoa</i> bitkisinden elde edilen ekstraktların farklı dozlarının <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	62

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1. Baz substitisyonları çeşitleri: transisyonlar ve transversiyonlar	3
Şekil 2. Çerçeve kayması mutasyonu	4
Şekil 3. <i>Sideritis</i> L. cinsinin dünya üzerinde yayılışı	9
Şekil 4. (a) <i>S. trojana</i> Bornm. (kazdağı veya sarıkız çayı) ve (b) <i>S. athoa</i> Papanikolaou & Kokkini (kedikuyruğu veya kandil çayı) bitkileri	25
Şekil 5. Ekstraktların elde edilmesinde kullanılan cihazlar. (a) Soksilet ve (b) Evaporatör	36
Şekil 6. <i>S. typhimurium</i> TA98 suşunun (a) HB ve (b) MGA plaklarında üreme durumları	44
Şekil 7. <i>S. typhimurium</i> TA100 suşunun (a) HB ve (b) MGA plaklarında üreme durumları	44
Şekil 8. <i>S. typhimurium</i> (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarına uygulanan kristal viyole hassasiyeti testi sonuçları	45
Şekil 9. <i>S. typhimurium</i> (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarına uygulanan ultraviyole hassasiyeti testi sonuçları	46
Şekil 10. <i>S. typhimurium</i> (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarının HBA plaklarında üreme durumu	46
Şekil 11. Pozitif kontrol. (a) NPD (4-nitro- <i>o</i> -fenilendiamin) ve (b) SA (NaN ₃ , sodyum azid) mutajenlerinin etkisi (S9 -)	49
Şekil 12. Pozitif kontrol. 2AF (2-aminofloren) mutajenin etkisi (S9 +)	49
Şekil 13. Negatif kontrol. (a) DMSO ve (b) Su	50
Şekil 14. Spontan kontrol (kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü)	50

Şekil 15. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki mutajenik etkileri	53
Şekil 16. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen aseton ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki mutajenik etkileri	53
Şekil 17. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki mutajenik etkileri	54
Şekil 18. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen su ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki mutajenik etkileri	54
Şekil 19. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki mutajenik etkileri	55
Şekil 20. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen aseton ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki mutajenik etkileri	55
Şekil 21. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki mutajenik etkileri	56
Şekil 22. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen su ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki mutajenik etkileri	56

Şekil 23. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	63
Şekil 24. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen aseton ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	63
Şekil 25. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	64
Şekil 26. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen su ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	64
Şekil 27. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	65
Şekil 28. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen aseton ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	65
Şekil 29. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	66
Şekil 30. <i>S. trojana</i> ve <i>S. athoa</i> bitkilerinden elde edilen su ekstraktlarının farklı dozlarının S9 (\pm) <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	66

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Merve BALLI

Doğum Yeri : Üsküdar/İSTANBUL

Doğum Tarihi : 21.03.1985

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
(2005-2009)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
(2010-2012)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) **Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan özet metin olarak yayımlanan bildiri ya da poster veya gösteri**

1. Ballı M. ve Demir N., 2012. Sarıçay (Çanakkale) Yüzey Suyunun Sitotoksik ve Genotoksik Potansiyelinin *Allium cepa* Kök Ucu Hücrelerinde Araştırılması. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül, İzmir.
2. Demir N. ve Ballı M., 2012. Indoxacarb İnsektisidinin Sitogenetik Etkisinin Araştırılması. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül, İzmir.
3. Demir N., Ballı M., Çetin M. ve Kaya H., 2011. Çanakkale Boğazı'ndaki Midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) Mikronukleus Testi ile Genotoksik Etkinin Araştırılması. *X.*

Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 4-7 Ekim, Çanakkale, s. 411.

4. Ballı M., 2011. Artıları ve Eksileri ile Nükleer Enerji Santralleri. *X. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 4-7 Ekim, Çanakkale, s. 444.*
5. Ballı M. ve Demir N., 2011. Radyoaktif Kirlenme, Olası Etkileri ve Korunma Yolları. *X. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 4-7 Ekim, Çanakkale, s. 445.*
6. Gezen M.R., Demir N., Çetin M. ve Ballı M., 2011. Çanakkale Boğazı'ndaki Deniz Kestanesi (*Paracentrotus lividus*)'nin Ağır Metal Düzeyleri Üzerine Bir Araştırma. *Ekoloji 2011 Sempozyumu, 5-7 Mayıs, Düzce, s. 176.*
7. Demir N., Gezen M.R. ve Ballı M., 2011. Çanakkale Boğazı'nın Karacaören Kıyısındaki Deniz Suyu ve Bazı Yumuşakçalarda (Bivalvia ve Gastropoda) Ağır Metal Düzeylerinin Araştırılması. *Ekoloji 2011 Sempozyumu, 5-7 Mayıs, Düzce, s. 177.*

b) Katıldığı Projeler

- Umurbey Çayı (Çanakkale) Su ve Sediment Kirliliğinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Testi ile Araştırılması. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), 2011/071.

İŞ DENEYİMİ

- Staj : Çanakkale Devlet Hastanesi
Mikrobiyoloji ve Biyokimya Laboratuvarları
02.07.2007- 24.08.2007

KAZANDIĞI ÖDÜLLER

- 2008-2009 Eğitim-Öğretim Yılı Üniversite Birinciliği

İLETİŞİM

E-posta Adresi : merveballi1985@hotmail.com