

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SMILAX EXCELSA EKSTRAKLARININ

AMES/SALMONELLA/MİKROZOM TEST SİSTEMİ İLE

ANTİMUTAJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ELVAN AZAP

AĞUSTOS 2016

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı

Prof. Dr. M. Serkan SOYLU

.../.../2016

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İhsan AKYURT

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans Tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Emine YALÇIN

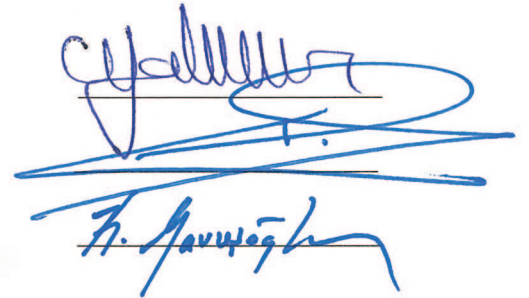
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emine YALÇIN

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU

Doç. Dr. Kürşat ÇAVUŞOĞLU



ÖZET

SMILAX EXCELSA L. EKSTRAKLARININ

AMES/SALMONELLA MİKROZOM TEST SİSTEMİ İLE ANTİMUTAJENİK

ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

AZAP, Elvan

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Emine YALÇIN

AĞUSTOS 2016, 39 sayfa

Bu çalışmada, *Smilax excelsa* yaprak ve meyve ekstraktlarının antimutajenik aktiviteleri Ames/Salmonella/mikrozom test yöntemi ile incelenmiştir. 10-100 mg/ml dozlarında yaprak ve meyve ekstraktlarının sitotoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Antimutajenite çalışmaları S9 (+) ve S9 (-) olmak üzere *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum antimutajenik etki yaprak ekstraktı ile 100 mg/ml dozunda TA98 suşu üzerine S9 karışımı yokluğunda %88 olarak elde edilmiştir. Ayrıca, *Smilax excelsa* bitkisinin tüm ekstraktlarının güçlü antimutajenik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Smilax excelsa*, Ames/Salmonella/mikrozom test sistemi, Antimutajenik aktivite

ABSTRACT

INVESTIGATION THE ANTI-MUTAGENIC EFFECTS OF
SMILAX EXCELSA L. EXTRACTS BY
AMES/SALMONELLA/MICROSOME TEST SYSTEM

AZAP, Elvan

Giresun University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emine YALÇIN

AUGUST 2016, 39 pages

In this study, leaf and fruit extracts of *Smilax excelsa*, were investigated for antimutagenic activity by Ames/Salmonella / microsome test method. Fruit and leaf extracts was not observed the cytotoxic effect with 10-100 mg/ml doses. Antimutagenity analysis were studies with S9(+) and S9 (-) on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains. Maximum antimutagenic activity was observed with leaf extracts at 100 mg/ml dose on TA 98 strain in the absence of S9 as 88%. And also all the extracts of *Smilax excelsa* showed strong antimutagenic activity.

Keywords: *Smilax excelsa*, Ames/Salmonella/microsome test system, antimutagenic activity

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın tım aőamalarında her turlü bilimsel desteği sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Emine YALÇIN'a, bilgi birikimleri ve değerli gürüőleriyle katkı sağlayan değerli hocalarım Doç. Dr. Kultiğin AVUŐOęLU ve Öğr. Gör. Figen ÇİÇEK'e teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Smilax excelsa</i> L	2
1.2. Mutajenik ve Antimutajenik aktivite	4
1.2.1.Des-mutajenler.....	5
1.2.2. Biyo-antimutajenler.....	6
1.3. Doğal Antimutajenik Bileşikler.....	8
1.4. Ames / Salmonella / Mikrozom test yöntemi.....	10
1.4.1. Metabolik Aktivasyon (Biyotransformasyon).....	12
2. MATERYAL VE METOT.....	14
2.1. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon çalışmaları.....	14
2.2. Ekstraksiyon verimliliği.....	14
2.3. Sitotoksik dozların belirlenmesi.....	14
2.4. Antimutajenite testi (AMES/ Salmonella mikrozom testi).....	15
2.5. Pozitif kontrol	16
2.6. Negatif kontrol	17
2.7.Sonuçların Değerlendirilmesi.....	17
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	18

3.1. Ekstraksiyon verimlilikleri.....	18
3.2. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi	19
3.3. Antimutajenik aktivite tayini.....	21
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	25
KAYNAKLAR.....	29
ÖZGEÇMİŞ.....	30



ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

Şekil 1.1. <i>Smilax excelsa</i> 'nın genel görünümü	2
Şekil 1.2. Mutajenik ve Antimutajenik aktivite	4
Şekil 1.3. Des-mutajen ve biyo-antimutajenlerin etki mekanizması	7
Şekil 1.4. <i>Smilax</i> türlerinde bulunan aktif bileşenler.....	9
Şekil 3.1. <i>S. excelsa</i> yaprak ve meyve örneklerinde ekstraksiyon verimlilikleri.....	19
Şekil 3.2. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarının kontrolü	19
Şekil 3.3. <i>Smilax excelsa</i> yaprak ekstraktlarının TA98 üzerine antimutajenik aktiviteleri	22
Şekil 3.4. <i>Smilax excelsa</i> yaprak ekstraktlarının TA 100 üzerine antimutajenik aktiviteleri	23
Şekil 3.5. <i>Smilax excelsa</i> meyve ekstraktlarının TA 98 üzerine antimutajenik aktiviteleri	23
Şekil 3.6. <i>Smilax excelsa</i> meyve ekstraktlarının TA 100 üzerine antimutajenik aktiviteleri	24

TABLULAR DİZİNİ

TABLO

Tablo 1.1. <i>Smilax excelsa</i> 'nın sistematik hiyerarşisi ve morfolojik özellikleri	3
Tablo 1.2. Antimutajen maddeler ve etki mekanizmaları	7
Tablo 1.3. Faz I ve Faz II enzimleri	13
Tablo 2.1. Antimutajenite hesaplama eşitliği	15
Tablo 2.2. Antimutajenite değerlendirme kriterleri.....	16
Tablo 3.1. Yaprak ve meyve ekstraktlarında sitotoksik doz tayini	20



KISALTMALAR DİZİNİ

PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil
MNNG	N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidin
S9	Memeli Karaciğer Süpernatantı
DMSO	Dimetilsülfoksit
2-AF	2-aminofluren
4-NFD	4-nitro-o-fenilendiamin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
gr	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı

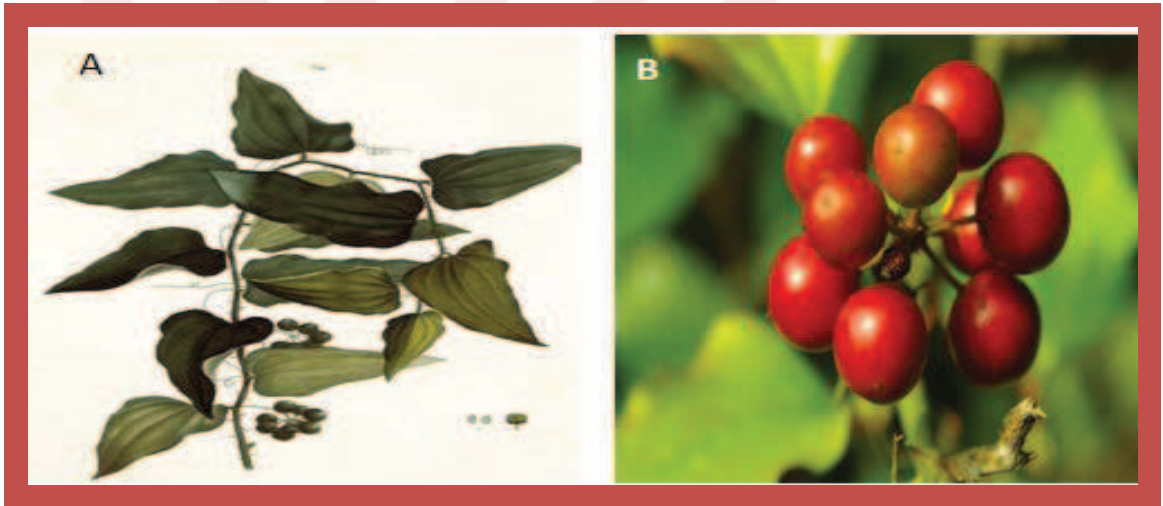
1. GİRİŞ

Artan endüstrileşme ile birlikte çeşitli sektörlerde kimyasal maddelerin ve antibiyotiklerin kullanımının artması ve bu ajanların yan etkilerinin fazla olması, olumsuz etkileri giderebilecek doğal bileşenlere karşı ilgiyi her geçen gün arttırmaktadır. Kimyasalların olumsuz etkilerini ya da yan etkilerini önleyen bileşikler, ilaç halinde ya da diyet içerisinde tabii orijinli bileşikler halinde tüketilebilmektedir. Bitkiler geleneksel ve modern ilaçların hammaddesi olarak tıbbi amaçlı kullanılmaktadır (1-2). Klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda, bitkilerin çeşitli dokularında bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri sayesinde akut/kronik hastalıkları ve çeşitli dejeneratif kusurlar sonucu oluşan rahatsızlıkları giderdiğine dair veriler saptanmıştır. Çeşitli hastalıkların ortaya çıkışı ya da seyri aşamasında koruyucu, inhibe edici ve azaltıcı özelliği olan bitkisel aktif bileşenler hakkında pek çok deneysel çalışmalar yapılmakta, antimutajenik ve antikanserojenik etkileri aydınlatılmaktadır. Günlük yaşamda antimutajen ve antikarsinojen etkili bileşiklerin düzenli kullanımının kanser ve genetik hastalıkları önlemede etkili olabileceği öne sürülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, yeşil sebze ve taze meyve içeren bileşiklerin tüketiminin insanları pek çok hastalığa karşı koruduğunu göstermektedir. İnsanlar, günlük yaşamlarında çok sayıda kimyasal karsinojen ve mutajenlere maruz kalabilmektedirler. Bunlar arasında antineoplastik ilaçlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aromatik aminler, nitrozaminler, metaller, radyasyon bulunur. İnsan vücudu bu tip kimyasal bileşiklere karşı çok çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmesine rağmen bu kimyasal bileşiklere karşı giderek artan maruziyet nedeniyle, mutajenik ve/veya karsinojenik özelliklerini baskılayabilecek nitelikte diğer bileşiklerin belirlenmesine ve kullanılmasına gerek vardır (3-5). Bileşiklerin mutajenik ve antimutajenik etkilerini belirlemek için en güvenilir yöntem deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Fakat indüksiyon testinin uzun zaman alması, tekrarlanabilirliğinin zor olması ve maliyetinin yüksek olması bu testin kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Bu nedenle mutajenite ve antimutajenite araştırmaları için kısa zamanda sonuç verebilen, tekrarlanabilirliği kolay, maliyeti düşük test sistemleri geliştirilmiştir. Kısa zamanlı ve maliyeti düşük test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanlardan bazıları Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi, S.O.S kromotest gibi bakteriyel test

sistemleridir. Bakteriler; basit ortamlarda hızlı üremeleri ve maliyetlerinin düşük olması nedeni ile tercih edilmektedirler (6-7). Bu çalışmada Karadeniz bölgesinde sıkça tüketilen *Smilax excelsa* ekstraktlarının ve antimutajenik aktivitesi Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi (*Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100) yöntemi ile belirlenmiştir.

1.1. *Smilax excelsa* L.

Smilax excelsa (Merulcan) Karadeniz dışında bazı bölgelerde merucen; merulcan, merucen, marucan, melocan, melvocan, silcan, diken gözü, diken gıcırı olarak da geçmektedir. Dikenli bir bitki olan ve ilkbahar aylarında bitki genç sürgünlerini vermeye başlayan *Smilax excelsa*'nın sürgünleri sebze olarak tüketilmektedir (Şekil 1.1) (8-10).



Şekil 1.1. *Smilax excelsa*'nın genel görünümü (a), meyve görünümü (b)

Smilax türlerine ait rizomların çeşitli immunomodülatör, antibakteriyal, antifungal, antioksidan gibi çeşitli farmakolojik özellikleri olduğu bilinmektedir (11-13). *Smilax china* kök ekstraktlarının yüksek oranda 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) radikal süpürücü etkiye sahip olduğu, lipid peroksidasyonunu öneler ve antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı belirtilmektedir (14). Terletme ve kanı temizleme gibi pek çok özelliği bilinen *Smilax excelsa*'nın frengide de tedavi amaçlı kullanıldığı rapor edilmektedir (9).

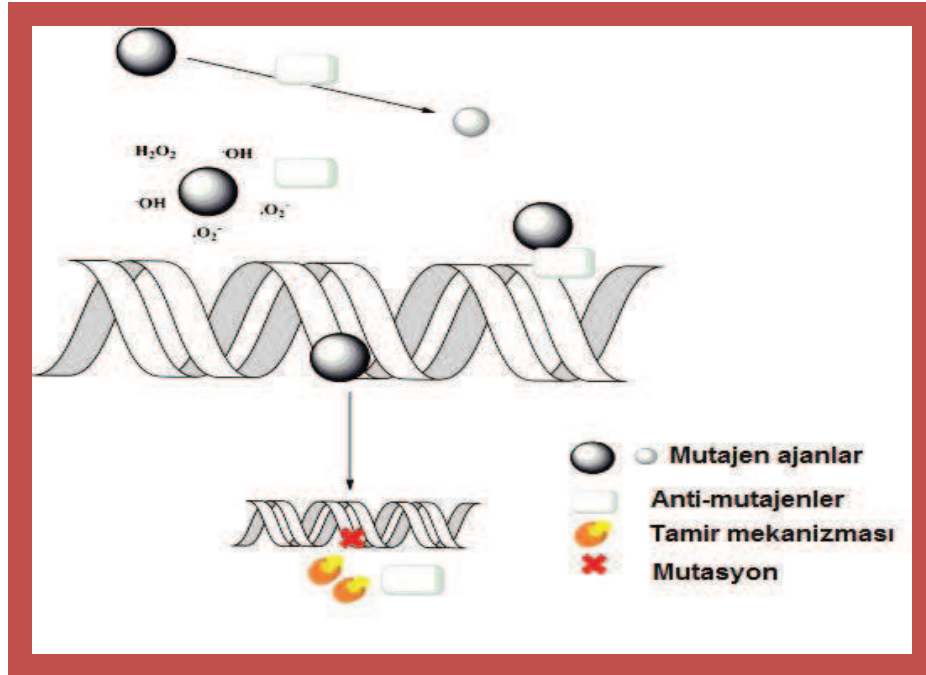
Tablo 1.1. <i>Smilax excelsa</i> 'nın sistematik hiyerarşisi ve morfolojik özellikleri			
Sistematik Hiyerarşi		Morfolojik Özellik	
Alem	Plantae	Ortalama Boy	>3m
Bölüm	Angiosperms	Genel Özellik	Tırmanıcı ve çok yıllık
Sınıf	Liliopsida	Gövde	Odunsu ve alt kısmı dikenli
Takım	Liliales	Çiçek	Şemsiye durumlu
Familya	Smilacaceae	Dal formu	20 metreye kadar boylanabilme
Cins	Smilax	Yaprak	Kalp şeklinde
Tür	<i>Smilax excelsa</i>	Çiçek Rengi	Beyaz-sarımsı yeşil

Smilax excelsa'nın da dahil olduğu Smilacaceae familyası üyeleri, ortalama boyu 3 m'den büyük olan 15 m'ye kadar boylanabilen, odunsu, dikenli, çok yıllık bir bitkilerdir. Yapraklar alternan dizilişli, yaprak sapları kısa kalp şeklinde morfolojiye sahip, meyveleri ilk oluşumunda yeşil daha sonra kırmızı renk alan, denize kıyısı olan bölgelerimizde 800 m kadar yükseklerde görülebilen türlerdir (Tablo 1.1.).

Stipulalar sülük şeklini alan *Smilax* türlerinde çiçekler, yaprakların koltuğunda, basit umbella veya panikula durumundadır. Bakka tipi meyveye sahip olan türün uzun, dar, silindrik kökleri mevcuttur. Orta Amerika'da daha çok tıbbi özelliğe sahip olan *S. utilis*, *S. medica*, *S. ornata*, *S. officinalis*, *S. syphilitica*, *S. papyracea* türleri yetişirken Anadolu'da *S. aspera* ve *S. excelsa* türleri yetişmektedir. *S. aspera* Batı ve Güney Anadolu'da, *S. excelsa* ise daha çok Kuzey Anadolu boyunca yaygındır (8-10). *Smilax* türlerinde çeşitli aktif bileşenlerin olduğu pek çok çalışma ile ortaya konmuştur. Özellikle rizomlarda flavonoidleri, fenil praponoidler, fenolik asitler aktif bileşen olarak yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Bu aktif bileşenler *Smilax* türlerinin antitümör, anti-mutajenik, antibakteriyel, antifungal, antiosidan, antiinflamatuvar özellik sergilemesinden sorumludur (9).

1.2.Mutajenik ve Antimutajenik aktivite

Mutajenik etki genomda kendiliğinden meydana gelen ya da vücuda dışardan alınan kimyasal maddelerin oluşturduğu kalıtsal baz değişimleridir. Kimyasal maddelerin etkisi sonucu oluşan mutasyonların kanser ile ilişkili olduğu pek çok çalışmada ortaya konmaktadır. Direkt ya da vücuda alındıktan sonra biyotransformasyon ile aktif hale dönüşüp kansere neden olan pek çok bileşiğin aynı zamanda mutajenik etki gösterdiği de kabul edilmektedir. Bu durum yaklaşık 300 kimyasalın kullanıldığı Ames test sistemi ile araştırılmış ve test edilen karsinojen etkili 175 maddeden 157'sinin mutajenik etkiye sahip olduğu, karsinojenik etkiye sahip olmayan test edilen 108 maddeden, 94'ünün mutajenik etkili olmadığı saptanmıştır. Kısaca karsinojen etki gösteren kimyasal ajanların % 90'ı mutajenik, karsinojen etki göstermeyen kimyasal maddelerin % 87'sinin de mutajenik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Mutasyona neden olan her madde kanser oluşturmasada mutajenite ve kanser oluşumu arasındaki paralellik antimutajenik bileşiklerin araştırmalarını öncül çalışmalar haline getirmektedir. Antimutajenik etki, mutajen etki gösteren toksik ajanların etkisini azaltma/yok etme ya da genomda oluşturduğu mutasyonu etkisizleştirme/önleyebilme etkisidir. Antimutajenler etki mekanizmalarına göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır (15-16).



Şekil 1.2. Mutajenik ve Antimutajenik aktivite (16)

1.2.1. Des-mutajenler

Desmutajenler; hücreye mutajen girişini çeşitli yollarla önleyerek ajanların DNA'ya ulaşmasını engelleyerek mutajeniteyi ortadan kaldırmaktadır (17). Desmutajenler, mutajenlere kimyasal olarak bağlanarak ya da enzimatik etki göstererek antimutajenik aktivite sergilemektedirler. 4-nitroquinolin-1-oksit gibi sentetik antimutajenlerin aktivitesinin kimyasal olarak bağlanma yolu ile mutajen maddeleri inhibe ettiği bildirilmektedir. Moriya ve arkadaşları, Captan pestisitinin hücrede sistein tarafından bloke edilerek antimutajenik aktivitenin oluştuğunu rapor etmişlerdir (18). Namiki ve Osawa ise sorbik asit ve sodyum nitrit gıda katkı maddelerinin vitamin C tarafından kimyasal bağlanma yolu ile inhibe edildiğini bildirmişlerdir (19). Vitamin E, ürik asit, vitamin C gibi bileşiklerin benzer mekanizma ile hidrojen peroksit ve oksijen radikallerinin mutajenik aktivitesini durdurdukları belirlenmiştir. Bu verilerden hareketle genel olarak antioksidanların desmutajen olarak sınıflandırılabilceği belirtilmiştir (20).

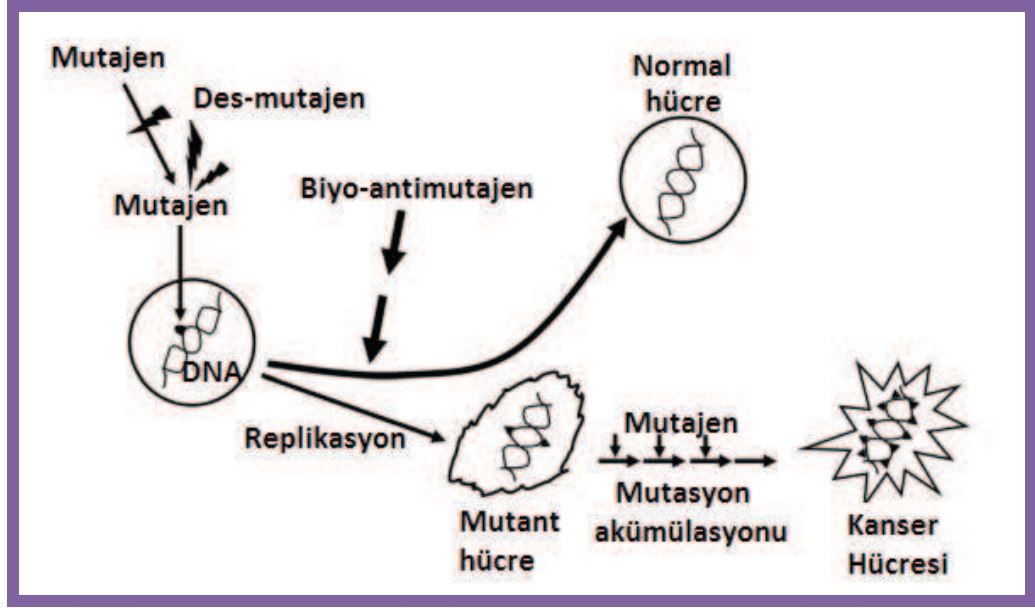
Pek çok protein yapıdaki moleküller mutajenler üzerine enzimatik aktivite göstererek desmutajen özelliği kazanmaktadır. Peroksidaz ve NADP-oksidadz aktivitesi sergileyen metabolitlere sahip pek çok doğal besinlerin, desmutajenik aktivite sergilediği bildirilmektedir. Brokoliden izole edilen bazı bileşiklerin bu tür enzimatik yolla antimutajenik aktivite sergilediği rapor edilmiştir. Peroksidazların, özellikle heterosiklik aminler üzerine desmutajenik aktivite sergilediği bilinmektedir. Detoksifikasyonda görev alan karaciğer enzimlerinin tamamını desmutajen olarak sınıflandırmak mümkündür. Bitkilerde bulunan bazı yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin mutajenleri absorbe ederek antimutajenik aktivite gösterdiği de belirlenmiştir. Yeşil biber ve lahanadan izole edilen bazı lif yapıdaki bileşiklerin mutajenleri geri dönüşümsüz olarak absorbe ettiği rapor edilmektedir. Özellikle lifli gıdalarda görülen bu etki, yüksek moleküler ağırlığa ve geniş yüzey alana sahip lifsi yapıların, yüzeyinde geri dönüşümsüz olarak kimyasal ajanları absorbe etmesi ve hücreye zarar vermesini önlemesi ile açıklanabilir (20).

1.2.2. Biyo-antimutajenler

Biyo-antimutajenler etkilerini daha çok hücre içinde göstermektedirler. Özellikle DNA'da oluşabilecek hasarları azaltma ya da oluşan mutasyonları tamir etme yolu ile antimutajenik aktivite sergilemektedirler. Mutajenin DNA üzerinde oluşturduğu etki sonrasında, DNA replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarını düzenleyerek mutajen maddenin etkisini azaltan bileşikler biyoantimutajenik olarak sınıflandırılmaktadır.

Biyoantimutajenler genel olarak DNA polimeraz I ve DNA polimeraz III sentezini arttırarak, error- prone DNA tamir mekanizmasını engelleyerek, error- free DNA tamir mekanizmasını geliştirerek etki göstermektedirler. Biyoantimutajenik aktiviteye sahip Kobalt klorürün, *E. coli*'de N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)'nin DNA replikasyonu sırasında oluşturduğu spontan mutasyon oranının azalttığı belirtilmiştir (21). Ayrıca *B. subtilis*'de DNA polimeraz III eksikliğine bağlı olarak gerçekleşen mutasyon oranını da azalttığı görülmüştür (22).

Shimoi ve arkadaşları tıbbi tedavide kullanılan 150 bitki türünde bazı bileşenlerin UV, gamma ışınları ve pek çok mutajene karşı biyo-antimutajenik aktivite sergilediğini rapor etmiştir (23). UVC (254nm) ışınları tarafından oluşturulan mutasyona karşı fenolik bileşenlerin antimutajenik aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada kafeik asit, klorojenik asit ve kuarsetinin mutasyon oranı üzerine etkisinin olmadığı gözlenirken, gallo-kateşin, epigallokateşin ve epigallokateşin-3-gallatın, biyoantimutajenik aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir (24).



Şekil 1.3. Des-mutajen ve biyo-antimutajenlerin etki mekanizması (25)

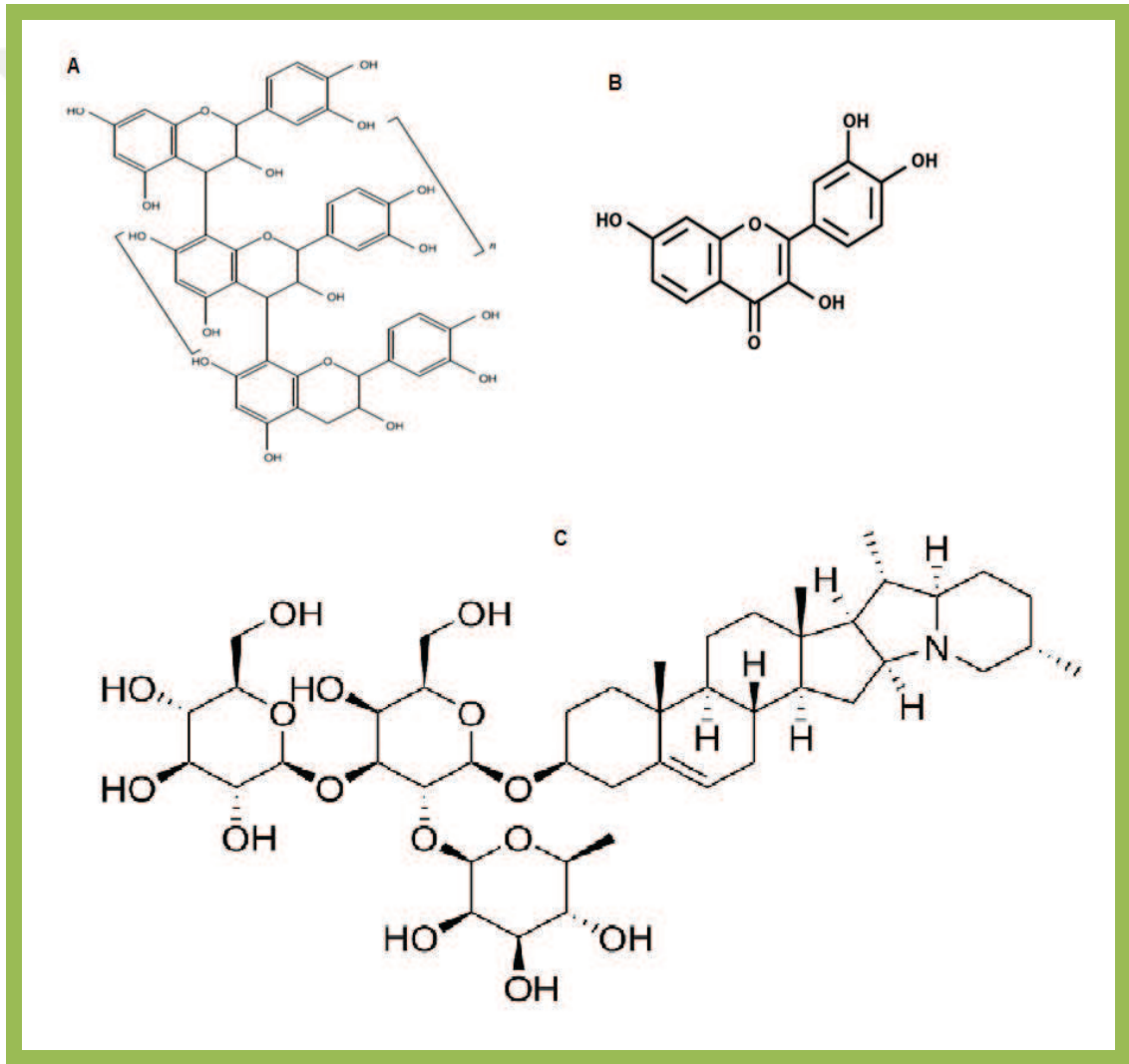
Tablo 1.2. Antimutajen maddeler ve etki mekanizmaları (16)	
Antimutajen madde	Etki mekanizması
Sistein	Mutajenle direkt etkileşim
Gallik asit	Dış membrana bağlanarak mutajenin sitozole geçişini önleme
Fenolikler	Sitokrom p450 aracılığı ile mutajeni inhibe etme
β -aminoketon	Mutajenlerin DNA'ya bağlanmasını önleme
Bikalophen	DNA'ya bağlanarak elektrofilik mutajenlere karşı koruma
Lüteolin türevleri	DNA'yı çift zincir kırıklarına karşı korumak
Buğday kepeği	DNA tamir enzimlerini optimize etmek
<i>Acacia salicina</i>	Detoksifikasyon enzimlerinin optimizasyonu
Lisosan G	Antioksidan aktivite aracılığı ile antimutajenik etki
<i>T. arjuna</i> ekstraktı	Promutajen aktivasyonunu önleme
<i>P. rimosus</i> ekstraktı	Promutajen aktivasyonunu önleme

1.3.Doğal Antimutajenik Bileşikler

Antimutajenite çalışmaları sonucunda farklı yapılara sahip doğal bileşenlerin antimutajenik aktiviteleri tespit edilmiştir. Bu bileşiklerden bazıları vitaminler, flavonoidler, fenolikler, karetonoidler, ikumarin, antrakinin, tanin, terpenoid, saponin ve bitkiler tarafından üretilen diğer sekonder bileşiklerdir (26). Bazı çalışmalarda, C ve E vitaminlerinin doksorubisin tarafından oluşturulan mutajeniteye karşı koruyucu rolü olduğu belirtilmiştir (27). Vitamin A'nın ise Metil azoksi metahanol tarafından *Salmonella typhimurium* TA100 'de oluşturulan mutasyonu azalttığı rapor edilmektedir (28).

Smilax türlerinin rizom, yaprak ve meyve gibi çeşitli dokularında da bulunan fenolik hidroksil grubu içeren flavanoidlerin de yüksek antimutajenik aktivite sergilediği belirtilmektedir (29). Heo ve arkadaşları (1992) flavon ve flavanol türevlerini de içeren 14 flavanoid türünün benzopiren mutajenitesine karşı koruyucu rolü olduğunu belirtmişlerdir (30). *Psorothamnus fremontii* köklerinden izole edile fremontin ve fremonton flavanoidlerinin etil metan sülfanata karşı antimutajenik özellik sergilediği rapor edilmektedir (31). *Millingtonia hortensis* türünden izole edilen hispidulin ve hortensin flavonoidlerinin ise aflatoksin B1 mutajenitesine karşı antimutajenik aktivite sergilediği gözlenmiştir (32). Ellagic asit, epikateşin, epigallokateşin, epigallokateşin gallat gibi fenolik bileşiklerinde mutajen maddelerin etkisini azalttığı bildirilmiştir (33, 34). Geetha ve arkadaşları (2004) hidrojen peroksit ve bütül hidroksit ajanlarına karşı yeşil çayda bulunan kateşinlerin antimutajenik aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir (35). Benzer bir çalışmada N-metil-N-nitro-nitrosoguanidin mutajenitesine karşı kurkumin ve eugenol fenolik bileşiklerinin yüksek antimutajenik aktivite sergilediği gözlenmiştir (36). Antrokinon grubu bileşiklerden antron, akridon, ksanthonun antimutajenik olduğu, tüm naftakinon türevlerinin ise mutajeniteye karşı yüksek koruyucu rolü olduğu bildirilmektedir (29). Diterpenoidler de antimutajenik aktivite gösteren diğer önemli bileşik grubudur. *Aquillaria agallocha* türünden izole edilen erithroksidiol yüksek anti-tümör ve antimutajenik aktiviteye sahiptir (37). *Caesalpinia pulcherrima* köklerinden izole edilen dibenzoat diterpen, pulcherrimins A ve B bileşiklerinin mayalarda DNA tamir mekanizmasında etkili olduğu gözlenmiştir (38). Smilax türlerinin çeşitli dokularında bulunan tanen ve saponin bileşiklerinin mutajenik

aktiviteyi azalttığı bilinmektedir (Şekil 1.4). Tanenlerin bu özelliği hücreyi oksidatif hasara karşı koruyan antioksidan aktiviteleri ile açıklanabilmektedir (39). Farelerde Mitomisin C ve 4-nitrokinolin-1-oksit tarafından oluşturulan mutajeniteye karşı oral yolla uygulanan tanenlerin antimutajenik aktivite sergilediği belirtilmiştir (40). *C. arvensis* ve *H. helix* türlerinden izole edilen saponin bileşiklerinin benzopiren mutajenesine karşı antimutajenik aktivite sergilediği belirtilmiştir (41). Ginseng saponin metabolitlerinin ise benzopiren tarafından oluşturulan klastojenik etkiye karşı anti-genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (42).



Şekil 1.4. Smilax türlerinde bulunan aktif bileşenler A) Temel tanen yapısı B) Temel flavonoid karbon yapısı C) Temel saponin yapısı (43-44)

1.4. Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi

1975 yılında Prof. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanılan bir mutajenite testidir (45). Ames/Salmonella/mikrozom mutajenite testi, mutajenik etkileri belirgin şekilde ortaya koyan yaygın bir şekilde kullanımı olan güvenilir bir testtir. Bununla birlikte düşük maliyetli olması, hızlı sonuç vermesi, uygulanabilirliğinin basit olması nedeniyle mutajenite testlerinden en sık kullanılan testlerdendir. Ames/Salmonella/mikrozom mutajenite testi organizmalarda tümör oluşumu, genlerde meydana gelen nokta mutasyonların tayini, mutajenik kimyasalların ve antimutajenik ajanların tespitinde de kullanılmaktadır (46,47)

Ames/Salmonella/mikrozom test sistemi özellikle kimyasal maddeler tarafından oluşturulan mutasyonları saptamak için geliştirilmiştir. Yıllardır birçok bilimsel topluluk, devlet kurumları ve şirket tarafından kabul edilmiş olup, kemirgen karsinogenitesinde yüksek öngörü potansiyeli taşıdığından, yeni kimyasalların ve ilaçların mutajenik potansiyellerini belirlemek için ön tarama testi olarak dünya çapında kullanılmaktadır (48).

Ames/Salmonella/mikrozom testinde, mutant *Salmonella typhimurium*'un suşları kullanılmaktadır. Bu testin temeli, histidin sentezleme geninde mutasyon içeren ve histidin sentezleme özelliğini kaybeden *S. typhimurium* suşlarının, memeli karaciğer süpernatantı (S9) varlığında veya yokluğunda, hedef kimyasal ajan ile etkileştirildikten sonra ikinci bir mutasyona uğrayarak histidini sentezleme özelliğini yeniden kazanması (revertant koloni) ve histidin içermeyen ortamlarda çoğalması prensibine dayanmaktadır. Revertant kolonilerin sayıları ile elde edilen istatistiksel veriler mutajenite değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (46-47). Normal koşullarda da mutajen maddelere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen koloniler olmaktadır. Bir maddenin mutajenik etkisinden bahsedebilmek için spontan revertant sayısından daha fazla sayıda revertant koloni oluşturması gerekmektedir (47-49). Bu test ile birçok mutajenik madde teşhis edilebilmektedir (47). Testte kullanılan Salmonella mutant suşları, histidin operonunun çeşitli genlerinde farklı mutasyonlar içermektedir. Bu mutasyonlar, her biri çeşitli mekanizmalar üzerinden etki eden mutajenlere duyarlı olacak şekilde tasarlanmıştır.

Bu suşlar *S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA97, TA98, TA100, TA102, TA104 suşlarıdır (45).

Mutant *S. typhimurium* suşları elde etmek için çeşitli mutasyonlar uygulanmaktadır. Histidin mutasyonu (çerçeve kayması mutasyonları), HisG46 mutasyonu (histidin biyosentezinde ilk enzimi kodlayan gen bölgesindeki mutasyon), HisD3052 mutasyonu (histidin biyosentezindeki son enzimi kodlayan his D geninde mutasyon), HisC3076 mutasyonu (çerçeve kayması mutasyonu), HisG428 mutasyonu (hisG428 gen bölgesinde meydana gelen mutasyon) mutant *S. typhimurium* elde etmek için kullanılan mutasyon türlerinden bazılarıdır (47). Bu mutasyon tipleri direkt genler üzerinde meydana getirilirken bazı mutasyon tipleri DNA tamir mekanizması ve hücre geçirgenliği üzerine etki etmektedir Rfa mutasyonu, bakterilerde hücre zarının lipopolisakkarit tabakası ile ilgili genlerde meydana gelmektedir. Lipopolisakkarit tabakasında meydana gelen bu hasar, hücre duvarının geçirgenliğinin artmasına neden olarak büyük moleküllerin geçmesine izin vermektedir (50).

uvrB mutasyonu ise DNA onarım sisteminde, nükleotid kesme çıkarma onarımında görev alan ekzonükleaz enziminin uvrB geninde meydana gelen delesyon sonucunda olmaktadır. uvrB geninin kesilerek uzaklaştırılması esnasında “bio” geni de çıkarılmıştır. Bio geni H vitamini olarak adlandırılan biyotin sentezinden sorumludur. Dolayısıyla mutant bakteriler üreyebilmek için histidin amino asidine ek olarak biyotine de gereksinim duyarlar (45). uvrB delesyonu nedeniyle nükleotid kesip çıkarma onarım mekanizması inaktive olacağından hata oranı yüksek SOS onarım sistemi tarafından daha fazla DNA lezyonunun onarılması mümkün olacaktır (47).

R faktörü, ampisilin dirençlilik geni olup bu geni taşıyan bakterilerde normalde hücrelerde bulunan ve hata frekansı yüksek olan “error-prone” DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve pozitif sonuçların artmasına neden olur. R faktörüne sahip olmayan suşlar zayıf mutajenik sonuçlar verirken R faktörü genini taşıyan pKM 101 plazmidine sahip yeni suşlar oldukça kuvvetli sonuçlar vermiştir. Bu test sisteminde genellikle kullanılan bakteri suşları TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1538 suşlarıdır (51-52).

1.4.1. Metabolik Aktivasyon (Biyotransformasyon)

1973 yılında Ames ve arkadaşları tarafından geliştirilen standart plak inkorporasyon test sistemi, zaman ile testin duyarlılığını artırmak amacıyla farklı araştırmacılar tarafından modifiye edilerek geliştirilmiştir. Böylece birçok kimyasal maddenin mutajenik potansiyelini belirlemek mümkün hale gelmiştir (47). Memelilerde biyotransformasyon olayı pek çok ksenobiyotiğin mutajenitesini de değiştirmektedir. Memelilerde detoksifikasyonda görev alan enzim sistemlerinin bakterilerde olmaması, Ames test sistemi için sorun yaratan bir unsur olarak ortaya çıkmaktadır. Fakat memeli hayvanlardan izole edilen detoksifikasyon enzimlerinin bakteriyal sisteme ilave edilmesiyle bu sorun ortadan kalkmış olmaktadır (53). Yaygın olarak kullanılan enzim sistemi, sıçanların enzim aktivasyonu olan karaciğer dokularından elde edilen mikrozomal enzim fraksiyonlarıdır. Sit. P450-monooksijenazlar, sit. P450 bağımsız oksidazlar, esterazlar ve transferazlar, azo ve nitroredüktazlar bulunan enzim özütü ile kofaktörler içeren tampon sistemi S9 karışımı adını almaktadır. Bir ksenobiyotiğin toksisitesinin ayrıntılı olarak aydınlatılabilmesi için biyotransformasyon öncesi ve sonrasındaki mutajenitesi belirlenmelidir. Bu amaçla günümüzde Ames testi S9(+) ve S9(-) olmak üzere iki şekilde yürütülmektedir. S9(+) Ames testi ile bir molekülün vücuda alınıp biyotransformasyona uğradıktan sonraki mutajenitesi de test edilmiş olmaktadır. Farmakolojik yönden etkin olan bir molekül organizmada biyotransformasyon tepkimeleri sonucu daha etkin metabolitlere dönüştürülebilir. Molekülün daha etkin ya da toksik olan metabolitlerinin şekillenmesiyle sonuçlanan biyotransformasyon tepkimeleri metabolik aktivasyon adını almaktadır. Bazı durumlarda inert bir molekül biyotransformasyon tepkimeleri sonucu etkin olan metabolitlere, daha sonra da inaktif ya da vücuttan atılabilir formlara dönüştürülür. Normalde farmakolojik yönden etkisiz olan fakat biyotransformasyon sonucu etkin metabolitlere dönüşen moleküllere prekürsör adı verilir. İnhalasyon anesteziği gibi az sayıda da olsa organizmada hiçbir değişikliğe uğramadan vücuttan atılan moleküllerde mevcuttur (54).

Biyotransformasyon sistemi varlığında, biyolojik olarak aktif bir madde inaktif bir metabolite dönüşebileceği gibi, inaktif bir madde aktif bir metabolite de

dönüşebilmektedir (55-57). Çoğu biyotransformasyon tepkimesi sonucunda ilacın farmakodinamik etkinliğin azalması ve eliminasyonun kolaylaşması detoksifikasyon (inaktivasyon) tepkimeleri olarak adlandırılmaktadır. Organizmada ilaçların biyotransformasyonda görevli enzimler başta karaciğer olmak üzere plazma, sindirim kanalı, akciğer böbrek, plasenta ve sinir sisteminde lokalize olmuşlardır. Biyotransformasyon tepkimeleri degradasyon (I. Faz) ve konjugasyon (II. Faz) fazları olarak ikiye ayrılmaktadır. Moleküller genel olarak önce degradasyon, bu tepkimeler sonucu oluşan metabolitler de konjugasyon tepkimelerine uğrarlar. Konjugasyon (birleştirme) tepkimeleri sistematik olarak biyolojik yönden inaktif, hidrosolübl ve böbrekle kolay elimine edilebilir bileşiklerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (54,58-60).

Tablo1.3. Faz I ve Faz II enzimleri

Faz I Enzimleri	Faz II Enzimleri
Sitokrom p450 monooksijenaz	Glukuroniltransferaz1a1
Sitokrom p450 2b10	Sülfotransferaz
Aldehit dehidrogenaz 1a1	Glutatyon-S-transferaz
Aldehit dehidrogenaz 1a7	N-asetiltransferaz
Sitokrom p450 a11	Kinonredüktaz
Alkol dehidrogenaz	Metil transferaz

2. MATERYAL VE METOT

2.1.Örnek hazırlama ve ekstraksiyon çalışmaları

Smilax excelsa (Merulcan) yaprak ve meyve örnekleri laboratuvar ortamında steril koşullar altında kurutulmuş, örnekler laboratuvar tipi diskli değirmende öğütüldükten sonra analizlerde kullanılincaya kadar + 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon için, 0.2 gr öğütülmüş örnek, 10 ml ekstraksiyon solventi (metanol, kloroform ve aseton) ile çalkalamalı inkübatörde 24 saat süre ile oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda katı partikllerin uzaklaştırılması amacıyla ekstrakt Whatman No:1 filtre kağıdından filtre edilmiş ve filtrat 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüjleme sonrasında supernatant sıvı faz evaporatör yardımı ile uçurulmuş ve elde edilen ekstraktlar -18 °C'de analiz edilinceye kadar muhafaza edilmiştir.

2.2.Ekstraksiyon verimliliği

Verimlilik tayininde selülozik kartuşlar kullanılmış ve selülozik kartuşun darası alınarak 20 g bitki örneği kartuşa eklenmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonrasında selülozik kartuş kurutulularak tartılmıştır. Ekstraksiyon öncesi ve sonrasında alınan tartımlar arasındaki fark kullanılarak verimlilik oranı (%) hesaplanmıştır.

2.3. Sitotoksik dozların belirlenmesi

Ekstraksiyon işlemi sonrasında liyofilize halde elde edilen bitki ekstraktlarından DMSO içerisinde 10mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml ve 100 mg/ml olacak şekilde dört farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Meyve ve yaprak ekstraktları için her dozdan üçlü tekrarlar hazırlanmıştır.

Smilax özütlerinin toksik dozlarının belirlenmesi amacı ile Dean ve ark. (61) tarafından belirlenen yöntem kullanılmıştır. 100 µl bakteri kültürü (10^9 /ml), 500 µl S9 karışımından ve 100 µl farklı dozlarda bitki özütlerinden, 2.5 ml top agara ilave edilmiştir. 5 dk hafif çalkalama işlemi sonrasında karışım minimal glukoz agar içeren plaklara aktarılmış ve 37°C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir (62). İnkübasyon sonrasında revertant koloniler sayılarak sitotoksik doz tayini gerçekleştirilmiştir.

2.4. Antimutajenite testi (AMES/ Salmonella mikrozoom testi)

Antimutajenite tayini için mutant *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA 100 test suşları kullanılmıştır. TA98 çerçeve kayması mutasyonlarını tespitinde, TA100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarını belirlemede kullanılmıştır. Ekstraktların mutajenik etkisini değerlendirmek için, her bir doz kontrol plaklardaki maksimum koloni sayısının iki katından fazla veya iki katına yakın değerlerde olması gerekmektedir (63). Antimutajenite deneyinde ise iki test suşu üzerinde mutajen olduğu bilinen maddelerin, mutajenik etkilerinin bitki ekstraktları tarafından inhibe edilme oranları araştırılmıştır. Bu amaçla Maron ve Ames (63) tarafından önerilen ve Zengin ve ark. (64) tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılmıştır. Kısaca; 100 µl bakteri kültürü ($1-2 \times 10^9$ bakteri/ml), 100 µl farklı dozda bitki ekstraktları, 100 µl pozitif mutajen çözeltisi ve 500 µl S9 karışımı ya da fosfat tamponu (S9'suz deney için), 2.5 ml üst agar içerisine ilave edilmiştir. Karışım vorteks ile çalkalanarak minimal glukoz agar plakalarının yüzeyine dökülerek hızlı bir şekilde yayılmıştır. Plaklar 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin ardından revertant koloniler sayılmıştır. İçerisinde bitki özütü olmayan ve sadece bakteri ve mutajenik madde ilave edilen plaklarda mutajenite oranı %100 (yani %0 antimutajenite) olarak kabul edilmiştir. Özütlerin antimutajenite oranları Tablo 2.1'deki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (65).

Tablo 2.1. Antimutajenite hesaplama eşitliği

Antimutajenite (%) = [(A-B)/(A-C)] x 100	
A	Bakteri+mutajen plağındaki revertant koloni sayısını,
B	Bakteri+mutajen+özüt plağındaki revertant koloni sayısını
C	Kendiliğinden geri dönen revertant koloni sayısını (sadece bakteri plağı) ifade etmektedir

Elde edilen yüzdelerden antimutajenite değerlendirilmesinde antimutajenite yüzde aralıkları esas alınmıştır. Antimutajenite değerlendirilmesinde %0-25, %26-40, %40

ve üzeri olmak üzere üç gruptandırılma yapılmış ve her bir yüzde aralığının anlamı Tablo 2.2.'de verilmiştir (66).

Tablo 2.2. Antimutajenite değerlendirme kriterleri

Antimutajenite (%)=[(A-B)/(A-C)]x 100	
<u>Antimutajenite (%)</u>	<u>Sonuç</u>
% 0-25	Zayıf antimutajenite veya aktivite yok;
%26-40	Orta dereceli antimutajenite
%40 ve üzeri	Güçlü antimutajenite

2.5.Pozitif kontrol

Ekstraktların antimutajenik analizlerine paralel olarak standart mutajenik etkisi olduğu bilinen ajanlar pozitif kontrol olarak aynı prosedüre tabii tutulmuştur. 2-aminoflouren (2-AF) S9 karışımı varlığında pozitif kontrol olarak *S. yphimurium* TA 98 suşu denemelerinde; 4-nitro-o-fenilendiamin (4-NFD) S9 karışımı yokluğunda *S. yphimurium* TA 98 suşu denemelerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Farklı bakteri suşları için her bir kimyasalın etkisinde farklıdır. Bu kapsamda *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu ile yapılan çalışmalarda S9 karışımı varlığı ya da yokluğu farketmeksizin pozitif kontrol olarak sodyum azid kullanılmıştır (67-68).

Bakteri kültürü, pozitif kontrol maddesi (2-aminoflouren/4-nitro-o-fenilendiamin/sodyum azid, 0.1 ml), top agar (2 ml) bir tüp içerisinde karıştırılarak minimal glukoz agarlı plaklara aktarılmıştır. 37 °C'de 48 saatlik inkübasyon sonrasında revertant koloni sayıları tespit edilmiştir. S9(+) çalışmaları için; karışım ortamına S9(+) karışımı ilave edilerek deneysel prosedür tekrarlanmıştır (67-68).

2.6.Negatif kontrol

Çalışmada bitki ekstraktarı ve pozitif kontrol amacıyla kullanılan 4-nitro-o-fenilendiamin, 2-aminoflouren Dimetil sülfoksit içerisinde çözülmüştür. Çalışmada kullanılan diğer pozitif mutajen olan sodium azidi çözmek için ise dH₂O kullanılmıştır. Bu kapsamda su ve dimetil sülfoksit çözeltileri negatif kontrol amacıyla test edilmiştir.

Bakteri kültürü, dimetil sülfoksit ya da dH₂O (0.1 ml), top agar (2 ml) bir tüp içerisinde karıştırılarak minimal glukoz agarlı plaklara aktarılmıştır. 37 °C'de 48 saatlik inkübasyon sonrasında revertant koloni sayıları tespit edilmiştir. S9(+) çalışmaları için karışım ortamına S9(+) karışımı ilave edilerek deneysel prosedür tekrarlanmıştır (67-68).

2.7.Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel farklılıkların değerlendirilmesinde One-way ANOVA ve Duncan testleri kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm Standart sapma (SD) değerleri olarak verilmiş ve p değerleri 0.05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

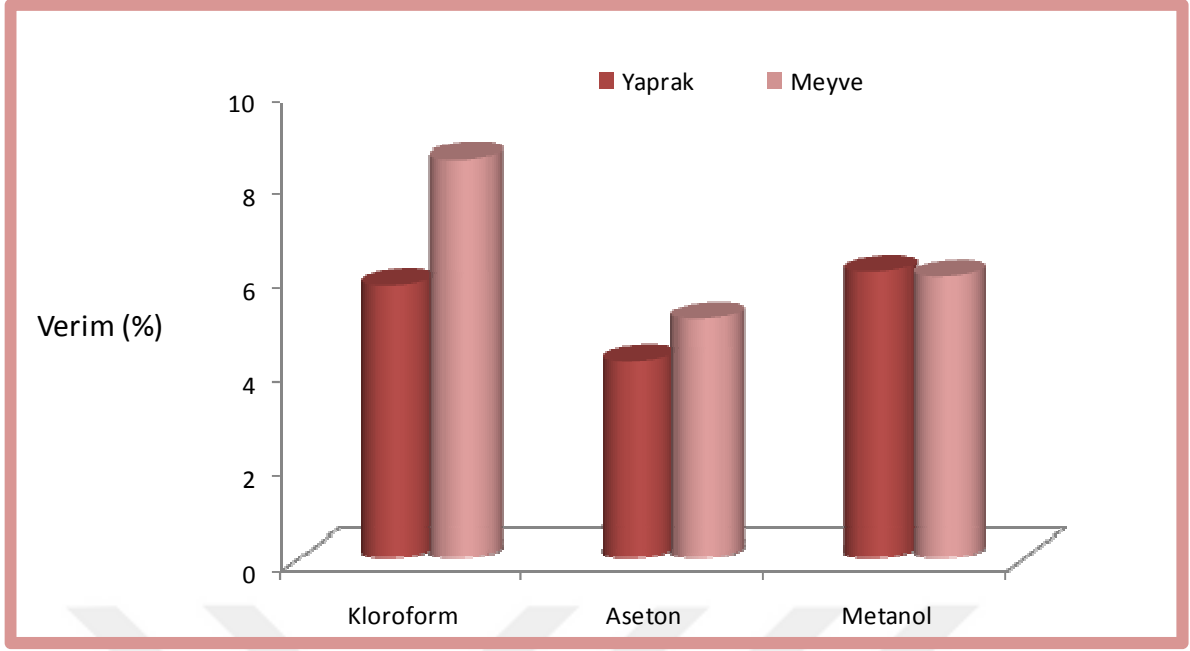
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada *Smilax excelsa* yaprak ve meyve ekstraktının anti- mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları ile araştırılmıştır. Çalışmada öncelikli olarak doku ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş, ekstraksiyon verimlilikleri ve sitotoksik doz hesaplamaları yapılmıştır. Uygulama dozlarının belirlenmesi sonrasında *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılarak Ames/Salmonella/Mikrozom testi ile *Smilax excelsa* yaprak ve meyve dokularının antimutajenik aktiviteleri belirlenmiştir.

3.1. Ekstraksiyon verimlilikleri

Smilax excelsa yaprak ve meyve kısımlarının kloroform, aseton ve metanol çözücülerinde ekstraksiyon verimlilikleri Şekil 3.1'de verilmiştir. *Smilax excelsa* meyve dokularının ekstraksiyonunda en verimli çözücü kloroform iken yaprak dokuları için en uygun çözücü maddenin metanol olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *Smilax excelsa* meyve dokularının ekstraksiyonunda yaprak dokularına kıyasla daha fazla ekstrakt elde edilmiştir. Meyve dokularında gerçekleştirilen ekstraksiyonda yaprak dokularına kıyasla 1.39 kat fazla verim elde edildiği belirlenmiştir. Dokular arasındaki bu farklılık, yaprak dokularındaki hücre zarı yapısının ekstraksiyona karşı dayanıklı olması ile ilişkilendirilmiştir.

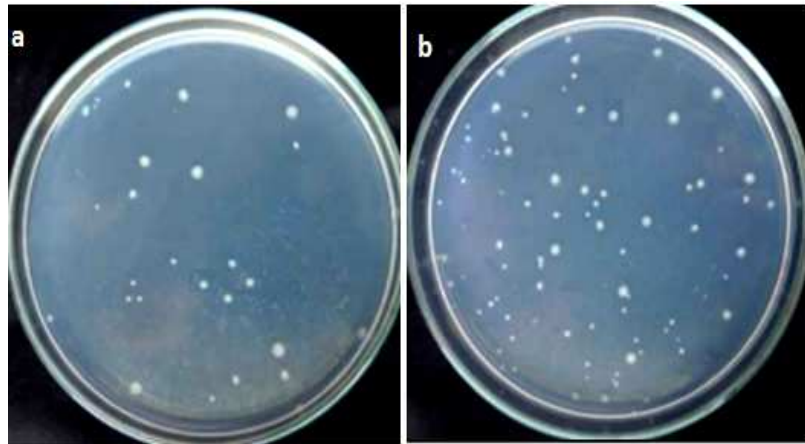
Yaprak dokularının metanol ile ekstraksiyonunda kloroform ekstraksiyonuna kıyasla 1.05 kat, aseton ekstraksiyonuna kıyasla 1.45 kat daha fazla verimlilik oranının elde edildiği belirlenmiştir. Meyve dokularında ise kloroform ile ekstraksiyonda aseton ekstraksiyonuna kıyasla 1.60 kat, metanol ekstraksiyonuna kıyasla 1.41 kat daha fazla verimlilik oranının elde edildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar dokuların çözücülere verdiği farklı cevap/geçirgenlik ilişkisi ile açıklanabilir. Çalışmaların devamında meyve dokularından kloroform ile elde edilen ekstraktlar, yaprak dokularında ise metanol ile elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır.



Şekil 3.1. *Smilax excelsa* yaprak ve meyve örneklerinde ekstraksiyon verimlilikleri

3.2. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi

Antimutajenite denemelerinde kullanılan bitki ekstraktlarının sitotoksik dozları *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde araştırılmıştır (Tablo 3.1) Mutajenite tesinde normal koşullarda kendiliğinden oluşan revertant koloni değerlerinin iki katı düzeyde ya da iki katından fazla bir sayıda revertant koloni elde edilmesi mutajenik etkiye işaret etmektedir.



Şekil 3.2. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarının kontrolü. a) *S. typhimurium* TA 98 suşunda, b) *S. typhimurium* TA 100 suşunda

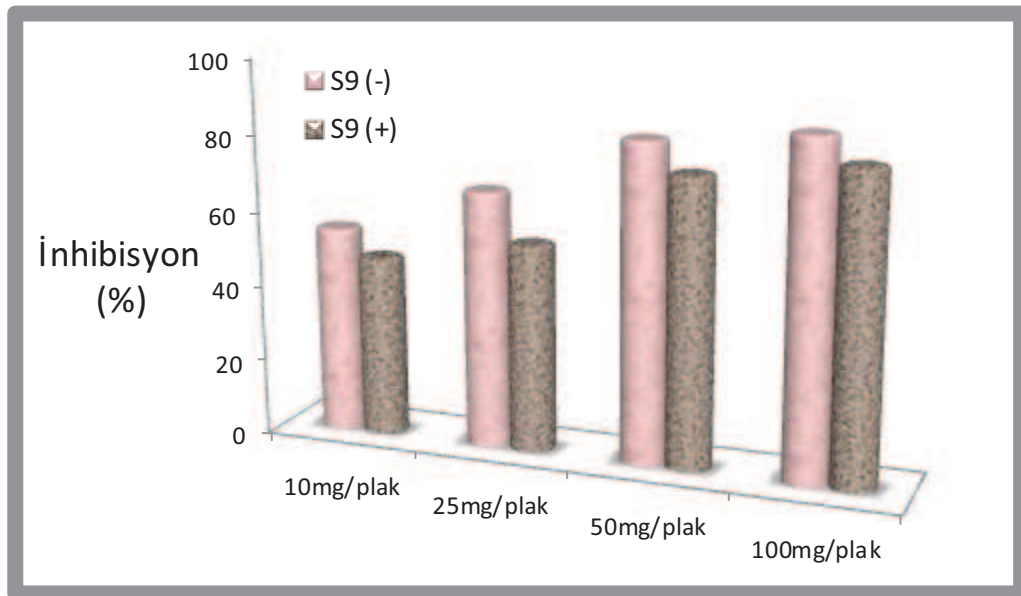
S. excelsa meyve ve yaprak ekstraktları ile elde edilen revertant koloni sayıları normal koşullarda kendiliğinden oluşan revertant koloni sayıları ile parallik göstermiş olup 2 katı düzeyine çıkmamıştır (Şekil 3.2). Bu nedenle çalışmada test edilen dozların sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Revertant koloni sayısı ile test edilen ektrat dozu arasında istatikselsel olarak anlamı bir değişim olmadığı, yani revertant koloni oluşumunun doza bağımlı bir olmadığı belirlenmiştir (Tablo 3.1). Çalışmada gözlenen maksimum revertant koloni sayısı *S. excelsa* meyve ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA 100 suşu ile S9 (+) 'da 127 revertant koloni/plak olarak belirlenmiştir. Minimum revertant koloni sayısı ise *S. excelsa* yaprak ekstraktının 10 mg/plak dozunda TA 98 suşu ile S9 (-) 'da 21 revertant koloni/plak olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarından genel olarak S9 (+) varlığında elde edilen revertant koloni sayısının S9(-)'e kıyasla daha yüksek olduğu fakat bu farkın istatikselsel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Yaprak ve meyve ekstraktlarında sitotoksik doz tayini

	Konsantrasyon (mg/plak)	Revertant koloni/plak			
		TA 98		TA 100	
		S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
<i>S. excelsa</i> yaprak dokusu	10	21±2	25±2	91±5	90±6
	25	29±3	27±3	98±4	103±5
	50	31±2	35±3	90±4	105±5
	100	35±2	41±4	101±6	111±8
<i>S. excelsa</i> meyve dokusu	10	25±2	39±2	115±5	124±10
	25	27±3	26±3	109±7	119±7
	50	36±3	31±3	99±4	121±11
	100	29±2	30±2	115±11	127±9
Pozitif k.	100	495±21	3916±50	4126±38	4218±49
Negatif k.	100	31±3	35±2	109±8	111±7

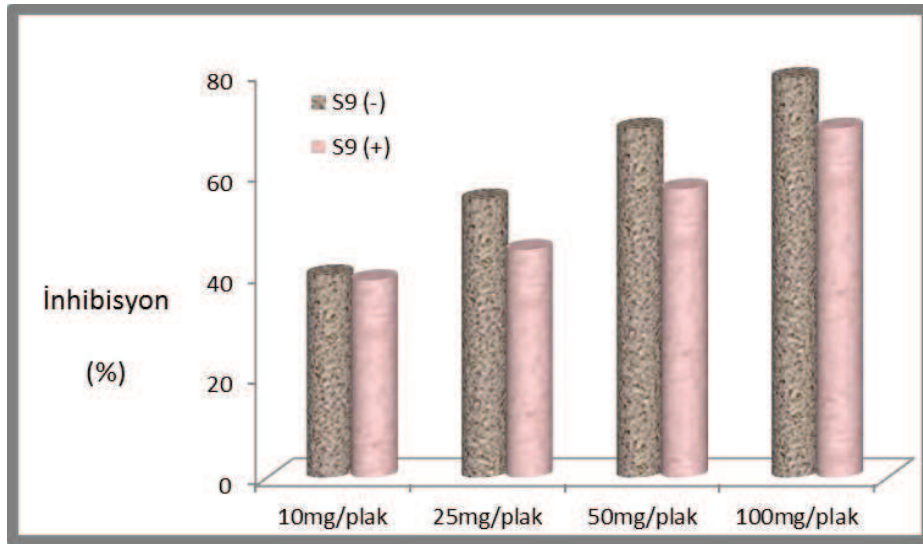
3.3. Antimutajenik aktivite tayini

S. excelsa yaprak ekstraktlarının TA 98 suşu ile gerçekleştirilen antimutajenite test sonuçları Şekil 3.3’de verilmiştir. Yaprak ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA98 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda %88 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/ml ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranınının 10 mg/ml dozunda elde edilen orana kıyasla 1.60 kat fazla olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde 10-100 mg/ml aralığında ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Yaprak ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA98 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında %81 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/ml ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranınının 10 mg/ml dozunda elde edilen orana kıyasla 1.68 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde S9 karışımı varlığında da inhibisyon yüzdeleri oranları baz alındığında 10-100 mg/ml aralığında ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca S9 karışımı varlığında ya da yokluğunda elde edilen veriler kıyaslandığında S9 karışımı kullanıldığında elde edilen inhibisyon sonuçlarınının daha düşük olduğu belirlenmiştir.



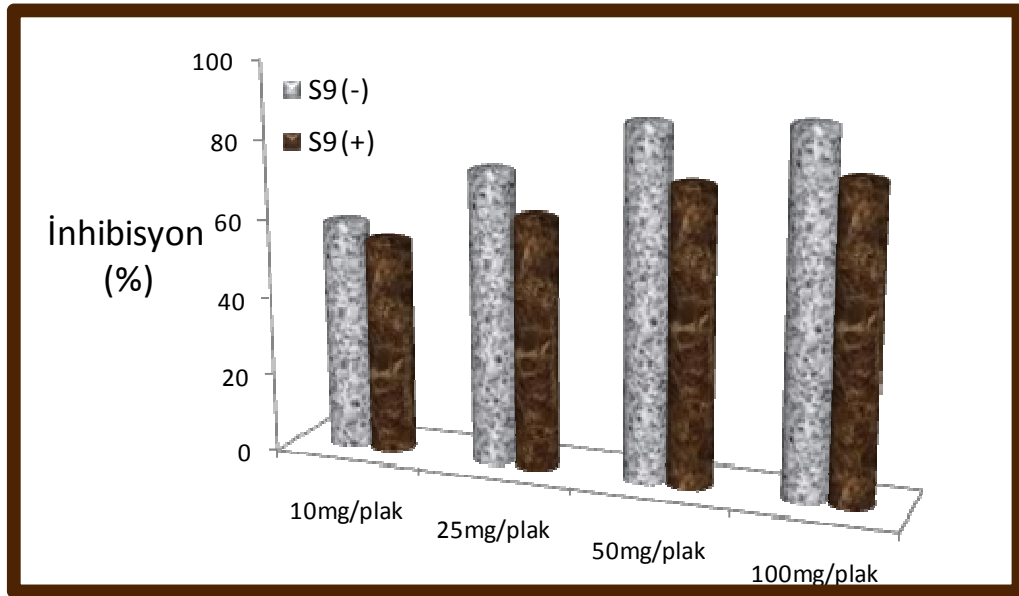
Şekil 3.3. *Smilax excelsa* yaprak ekstraktlarının TA 98 üzerine antimutajenik aktiviteleri

S. excelsa yaprak ekstraktlarının TA 100 suşu ile gerçekleştirilen antimutajenite test sonuçları Şekil 3.4’de verilmiştir. Yaprak ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA100 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda %79 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/ml ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranının 10 mg/ml dozunda elde edilen orana kıyasla 1.97 kat fazla olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde 10mg/ml aralığında ekstraktların orta düzeyde antimutajenik aktivite, 25-100 mg/ml aralığında ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Yaprak ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA100 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında %69 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/ml ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranının 10 mg/ml dozunda elde edilen orana kıyasla 1.76 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Antimutajenik aktivite artışında doz artışının etkisinin, TA 100 suşu denemelerinde TA98 suşuna kıyasla daha etkili olduğu gözlenmiştir. S9 karışımı varlığında da inhibisyon yüzdeleri oranları baz alındığında 10 mg/ml ve 25 mg/ml derişimlerinde ekstraktlar orta düzeyde antimutajenik aktivite sergilerken 50 mg/ml ve 100 mg/ml derişimlerinde güçlü etkiye sahiptir. Ayrıca S9 karışımı varlığında ya da yokluğunda elde edilen veriler kıyaslandığında S9 karışımı kullanıldığında elde edilen inhibisyon sonuçlarının daha düşük olduğu belirlenmiştir.



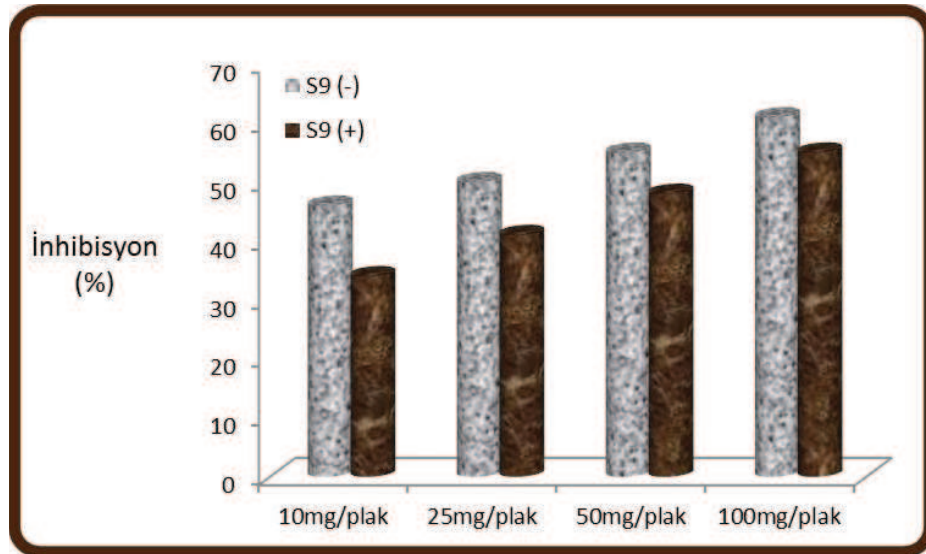
Şekil 3.4. *Smilax excelsa* yaprak ekstraktlarının TA 100 üzerine antimutajenik aktiviteleri

S. excelsa meyve ekstraktlarının TA 98 suşu ile gerçekleştirilen antimutajenite test sonuçları Şekil 3.5'te verilmiştir. Meyve ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA98 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda %91 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/ml ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranınının 10 mg/ml dozunda elde edilen orana kıyasla 1.54 kat fazla olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde 10-100 mg/ml aralığında ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Meyve ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA98 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında %79 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/ml ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranınının 10 mg/ml dozunda elde edilen orana kıyasla 1.43 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde S9 karışımı varlığında da inhibisyon yüzdeleri oranları baz alındığında 10-100 mg/ml aralığında ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca S9 karışımı varlığında ya da yokluğunda elde edilen veriler kıyaslandığında S9 karışımı kullanıldığında elde edilen inhibisyon sonuçlarınının daha düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.5. *Smilax excelsa* meyve ekstraktlarının TA 98 üzerine antimutajenik aktiviteleri

S. excelsa meyve ekstraktlarının TA 100 suşu ile gerçekleştirilen antimutajenite test sonuçları Şekil 3.6'da verilmiştir. Meyve ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA100 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda %61 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/ml ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranının 10 mg/ml dozunda elde edilen orana kıyasla 1.32 kat fazla olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde 10mg/ml aralığında ekstraktların orta düzeyde antimutajenik aktivite, 25-100 mg/ml aralığında ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Meyve ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA100 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında %55 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/ml ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranının 10 mg/ml dozunda elde edilen orana kıyasla 1.61 kat fazla olduğu belirlenmiştir. S9 karışımı varlığında inhibisyon yüzdeleri oranları baz alındığında 10 mg/ml ve 25 mg/ml derişimlerinde ekstraktlar orta düzeyde antimutajenik aktivite sergilerken 50 mg/ml ve 100 mg/ml derişimlerinde güçlü etkiye sahiptir.



Şekil 3.6. *Smilax excelsa* meyve ekstraktlarının TA 100 üzerine antimutajenik aktiviteleri

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Artan sanayileşme ve buna bağlı olarak ortaya çıkan çevre kirliliği göz önünde bulundurulduğunda doğal antimutajenik ve antikanserojenik bileşiklerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Doğal olan bu bileşiklerin en güçlü etkiyi sergileyen türleri tespit edilmeli ve bu konudaki çalışmalar hızla arttırılmalıdır. Bu konuda pek çok çalışma bulunmasına rağmen doğal kaynakların çeşitliliği bu çalışmaları yetersiz kılmaktadır. Bu çalışmada *Smilax excelsa* yaprak ve meyve ekstraktının anti-mutajenik aktivitesi Ames/Salmonella/Mikrozom testi kullanılarak *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları ile araştırılmıştır. Smilax türleri ile ilgili bazı antioksidan çalışmalar gerçekleştirilmiş olmakla birlikte antimutajenik çalışmalar bu türler için oldukça yenidir (69-72). Bu çalışmada ise henüz detaylı bir şekilde araştırılmamış olan *Smilax excelsa* (Merulcan) yaprak ve meyve ekstraktların antimutajenik aktivite açısından incelenmiştir.

Çalışmada öncelikli olarak doku ekstraksiyonu sonrasında ekstraksiyon verimlilikleri ve sitotoksik doz tespiti yapılmıştır. *Smilax excelsa* yaprak dokuları ekstraksiyonunda en uygun çözücünün metanol, meyve dokularının ekstraksiyonunda en verimli çözücünün ise kloroform olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *Smilax excelsa* meyve dokularının ekstraksiyonunda yaprak dokularına kıyasla daha fazla ekstrakt elde edilmiştir. Dokular arasındaki bu farklılık, yaprak dokularındaki hücre zarı/duvarı yapısının ekstraksiyona karşı dayanıklı olması ile ilişkilendirilmiştir. Yaprak dokularının metanol ile ekstraksiyonunda elde edilen yüksek verim ile meyve dokularının kloroform ile ekstraksiyonunda elde edilen yüksek verim dokuların çözümlere verdiği farklı cevap/geçirgenlik ilişkisi ile açıklanabilir. Ekstraksiyonda etken maddelerin dokulardan çıkarılmasında çözücünün rolü oldukça önemlidir. Etken maddelerin farklı kimyasal yapıda olmaları, farklı polariteye sahip olmaları ve bu nedenle farklı çözücülerle farklı reaksiyon vermeleri ekstraksiyon verimliliğini etkileyen önemli bir faktördür (73). Polar çözücüler bitkisel dokulardan polifenollerin uzaklaştırılmasında oldukça etkilidir. Bu çalışmada kullanılan aseton, kloroform ve metanol polar çözücülerdendir. Bu nedenle elde edilen ekstraktlarda polifenollerin yüksek oranda bulunduğu söylenebilir. Metanol küçük moleküler ağırlık bileşiklerin ekstraksiyonunda oldukça etkili iken aseton büyük moleküler ağırlık bileşiklerin

ekstraksiyonunda oldukça kuvvetlidir (74). Çalışmaların devamında meyve dokularından kloroform ile elde edilen ekstraktlar, yaprak dokularında ise metanol ile elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır.

S. excelsa meyve ve yaprak ekstraktlarının farklı dozlarında sitotoksik etkileri araştırılmış ve her bir dozda oluşan revertant koloni sayılarının kendiliğinden oluşan revertant koloni sayıları ile paralellik gösterdiği ve test edilen dozların sitotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu kapsamda çalışma devamında antimutajenik etki her bir doz için test edilmiştir. Yaprak ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA98 ve TA 100 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda sırasıyla %88 ve %79 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. S9 karışımı varlığında ise TA98 ve TA 100 suşları için sırasıyla %81 ve %69 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Yaprak ekstraktlarında maksimum antimutajenik etki S9 yokluğunda TA 98 suşuna karşı 100 mg/ml dozunda elde edilmiştir. Meyve ekstraktının 100 mg/ml dozunda TA98 ve TA 100 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda sırasıyla %91 ve %61 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. S9 karışımı varlığında ise TA98 ve TA 100 suşları için sırasıyla %79 ve %55 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Meyve ekstraktlarında maksimum antimutajenik etki S9 yokluğunda TA 98 suşuna karşı 100 mg/ml dozunda elde edilmiştir. Ayrıca meyve ve yaprak ekstraktlarının her bir dozu için genel olarak S9 yokluğunda, TA 98 suşu ile elde edilen antimutajenik etkinin TA 100 suşuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu da baz değişikliği mutasyonuna sahip mutant TA 100 suşunun antimutajenik etkiye karşı daha dayanıklı olduğuna işaret etmektedir.

Literatürde doğal ürünlerin antimutajenitesi üzerine çalışmalar oldukça fazladır. Pek çok araştırmada orta ya da güçlü düzeyde antimutajenik aktiviteye rastlanırken, bazı doğal maddelerin antimutajenik aktivite sergilemediği de rapor edilmektedir. Martino ve ark., *Origanum vulgare* L.'den ekstrakte edilen uçucu yağların *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde mutajenik aktivite göstermediğini tespit etmişlerdir (75). *Matricaria chamomilla* L. (papatya) ve *Salvia stenophylla* Burch.ex Benth uçucu yağlarının aflatoksin B1'e karşı antimutajenik aktivite sergilediği Ames testi ile belirlenmiştir (76,77). Samant (1997), *Celtis australis*'in Ames testi sonuçlarında antimutajenik etkiye sahip olduğunu rapor etmiş, bu etkinin ekstraktta bulunan azotsuz organik bileşikler ve ham lif maddelerine bağlı olduğunu

rapor etmiştir (78). Jayaprakasha ve ark., *C. zeylanicum* meyve ekstraktlarının *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerindeki sodyum azid mutajenitesine karşı, güçlü antimutajenik aktivite sergilediğini belirlemişlerdir (79).

Smilax türlerine ait yaprak ve meyve özütlerinin pek çok koruyucu etkisi daha önceki çalışmalarda araştırılmıştır. Bu araştırmalar daha çok antimikrobiyal etki ve antioksidan etkiler üzerine olup (80-82), nefrotoksositeye karşı koruyucu etkisi (83), immün sistemi güçlendirici (84) etkileri üzerine de çalışmalar mevcuttur. *Smilax* türlerine ait dokuların içerdiği aktif fenilpropanoid glikozid (85), antosiyanin (86), flavanoid glikozid (87), steroidal saponin (88,89) ve fitokimyasal bileşikler (90) nedeniyle antioksidan etki gösterdiği rapor edilmektedir. Ayrıca *Smilax excelsa* türüne ait meyvelerde renk oluşumundan sorumlu likopen de yüksek koruyucu role sahip bir bileşiktir ve bu çalışmada meyve ekstraktlarının sergilediği antimutajenik etki ile ilişkilendirilebilir. Likopen, güçlü bir antioksidandır ve antikarsinojenik/antimutajenik özellikleri bilinmektedir. Likopen ayrıca, antioksidan özelliği nedeniyle hücreleri serbest radikallerin olumsuz etkisine karşı korumakta, hücre-hücre arasındaki iletişimi, bağları güçlendirmekte ve hücre metabolizmasını düzenlemektedir (91-93).

Smilax türlerine ait çeşitli dokularda saponin varlığı da rapor edilmektedir (88,89). Saponinler yüksek antioksidan aktivitesi sayesinde antimutajenik, antikarsinojenik etki sergilemektedirler. Bitki dokularında bulunan saponinlerin, özelliklere böceklerle karşı ve çevreden gelebilecek zararlı etkenlere karşı savunmada kullanıldığı bilinmektedir (94). Fareler üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada saponin uygulamasının preneoplastik kolon lezyonlarında gerilemeye neden olduğu rapor edilmektedir. Benzer başka bir çalışmada ise ginsenoside-Rb2 ve ginsenoside-Rg3 saponinlerinin tümör metastazını inhibe edici bir özellik sergilediği belirtilmiştir (94-96).

Bitkilerin yaprak, kök, çiçek ve meyve gibi dokularında glikozitler şeklinde bulunan flavonoid çeşitlerinin 2000'den fazla bir sayıda olduğu bilinmektedir (97). *Smilax* yaprak ve meyve dokuları da çeşitli flavanoid içermektedir (87). Flavonoidler, antioksidatif etkileri ile serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonu önleyerek kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların

önlenmesinde aktif rol almaktadır. Radikal oluşumunda görev alan enzimatik sistemi engellediği, metal iyonlarını bağlayarak lipid oksidasyonunu azalttığı da bilinmektedir (98). Pek çok çalışmada flavonoidlerin antimutajenik ve antikanserojenik etkilerinin olduğu gösterilmektedir. Bu çalışmada özellikle yaprak ekstraktlarının gösterdiği yüksek antimutajenik etki yaprak özütlerinde bulunan flavonoidlerin aktif etkileri ile açıklanabilir (99-101).

Doğal bitkisel bileşenler, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Gelişen teknolojiye paralel olarak kullanımı gittikçe artmış bulunan sentetik ilaç maddelerinin pek çok yan etkilerinin olması ve mikroorganizmaların çeşitli direnç mekanizmaları oluşturması, doğal aktif bileşenlerin tedavi amaçlı kullanımını tekrar ön plana çıkarmıştır. Bitkisel doğal ürünlerin antifungal, antioksidatif, antibakteriyel, antimutajenik, antiviral ve antikanserojenik gibi pek çok etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konmaktadır. Fakat doğal kaynakların çeşitliliği bu çalışmaları yetersiz kılmaktadır. Bu çalışmada Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren, *Smilax excelsa* yaprak ve meyve ekstraktının anti-mutajenik aktivitesi Ames/Salmonella/Mikrozom testi kullanılarak *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları ile araştırılmış ve özellikle sıkça gıda maddesi olarak tüketilen yaprak ve meyve ekstraktlarının TA 98 suşu üzerine yüksek antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Bununla birlikte sitotoksik doz tespiti sonucunda test edilen dozlarda mutajenik etkinin görülmemesi, *Smilax excelsa* yaprak ve meyve dokularının potansiyel bir doğal antimutajenik kaynak olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. **Süzer, Ö.** 2005. Süzer Farmakoloji, 3. Baskı, Klinisyen Tıp Kitabevleri, İstanbul, s. 533.
2. **Stein,C.M.** 2002. Areherbalproductsdietarysupplementsordrugs? An important question for public safety, *Cli. Pharmacol. Therapeutics*, 71: 411-423.
3. **Anonim.**2010e. Antioksidan, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan> [Ziyaret Tarihi: 16 Ağustos 2010]
4. **AOAC.,** 2005. Total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines.
5. **AOAC.**2000. Official methods of analysis no 985. 26 (17th edn), Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.
6. **Iarc, L.**1980. Monographs on the carcinogenic risks of chemicals to humans. supp. z. Long Term Screening Assays For Carcinogens. A Critical Appraisal, IARC Monographs Supplement 2. IARC Lyon, International Agency For Research on Cancer.
7. **Hofnung, M.,** Quillardet, P. 1986. Recent developments in bacterial short-term for the detection of genotoxic agents. *Mutagenesis*. 1(5):319-330.
8. <http://www.haberordu.com/sifa-deposu-merucen-seyyar-pazarda-18519h.htm>
9. aves.istanbul.edu.tr/ImageOfByte.aspx?Resim=8&SSNO=11&USER=1651
10. **Shuo X.,** Ming-Ying S., Guang-Xue L. , Feng X., Xuan W., Cheng-Chao S., Shao-Qing C. 2013. Chemical Constituents from the Rhizomes of *Smilax glabra* and Their Antimicrobial Activity *Molecule*, 18: 5265-5287. doi:10.3390/molecules18055265.
11. **Navarro M.C.,** Montilla M.P., Cabo M.M., Galisteo M., Cáceres A., Morales C., Berger I. 2003. Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in Izabal for infectious diseases. *Phytotherapy Research* 17:325–329.

12. **Jiang J.**, Xu Q. 2003. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 53–59.
13. **Chen T.**, Li J., Cao J., Xu Q., Komatsu K., Namba T. 1999. A new flavanone isolated from rhizoma *Smilacis glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage. *Planta Medica*, 65: 56–59.
14. **Lee S.E.**, Ju E.M., Kim J. H. 2001. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root. *Experimental and Molecular Medicine*, 33:263–268.
15. **Mc Cann J.**, Ames, B. N. 1976. Detection of Carcinogens as Mutagens in The Salmonella/microsome Test: Assay of 300 chemicals: Discussion, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 950-954
16. **Karolina S.**, Beata P., Elżbieta P., Anna M. 2014. Waszkielewicz Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genetics*. 55:273–285.
17. **Özbek T.** 2006. Doğu Anadolu tıbbi bitkilerine ait bazı türlerin Ames/Salmonella Mikrozom testi kullanılarak antimutajenik özelliklerinin saptanması. Atatürk Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
18. **Moriya M.**, Ou C., Bodepudi V., Johnson F., Takeshita M., Grollman A. P. 1991. *Mutat. Res.* 254: 281-288.
19. **Osawa T.**, Namiki M. 1981. *Agric Biol Chem* 45(3): 735–739.
20. **Delbert M. S.**, Philip E. H., Tsuneo K., Alexander H., Claire M. W., Gregory K. 2013. Springer Science & Business Media, 13 Mar 2013 – 618.
21. **Jones M.**, Wagner R. 1981. N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine sensitivity of E. coli mutants deficient in DNA methylation and mismatch repair. *Mol Gen Genet.* 184(3):562-3.
22. **Tadashi I.**, Yoshiko O., Yoshito S., Tsuneo K. 1981. Effect of cobaltous chloride on spontaneous mutation induction in a *Bacillus subtilis*. *Mutation Research*. 91: 41-45

23. **Shimoi K.**, Nakamura Y., Tomita I., Kada T. 1985. Bio-antimutagen effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* Brr, *Mutation Res.* 149: 17–23.
24. **Shimoi K.**, Nakamura Y., Tomita I., Hara Y., Kada T. 1986. The pyrogallol related compounds reduce UV-induced mutations in *Escherichia coli* Brr WP2, *Mutation Res.* 173: 239–244.
25. **Nakamura Y.**, Sasaki A., Park E.Y., Kubo N., Nakamura T., Kubo Y., Okamoto S. 2015. Expectations of health benefits in plant materials in Southeast Asia based on Washoku (Japanese cuisine) study focusing on Kyoyasai (heirloom vegetables in Kyoto) *MU J Pharm Sci.* 42 (2): 47-54.
26. **Boone C.W.**, Kelloff G.J., Malone W.E. 1990. Identification of cancer chemotherapy agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: A review. *Cancer Res.*, 50: 2-9.
27. **Antunes L.M.**, Takahashi C.S. 1998. Effects of high doses of vitamin C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in winter rat bone marrow cells. *Mutat. Res.*, 419: 137-143.
28. **Tavan E.**, Maziere S., Narbonne J.F. and Cassend P. 1997. Effects of vitamins A and E on methylazoxymethanol induced mutagenesis in *S. typhimurium* strains TA100. *Mutat. Res.*, 377: 231-237.
29. **Edenharder R.**, Tang X.. 1997. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarin, quinones and other phenolic compounds. *Food Chem. Toxicol.*, 35: 357-372.
30. **Heo M.Y.**, Yu K.S., Kim K.H., Kim H.P. and Au W.W. 1992. Anticlastogenic effect of flavonoids against mutagen-induced micronuclei in mice. *Mutat. Res.*, 284: 243-249.
31. **Manikumar G.**, Gaetano K., Wani M.C., Taylor H. and Huges T.J. 1989. Plant antimutagenic agents, 5. isolation and structure of two new isoflavones, fremontin and fremontone from *Psoralea fremontii*. *J. Nat. Prod.*, 52: 769-773.

32. **Chulasiri M.**, Bunyapraphatsara N., Moongkandi P. 1992. Mutagenicity and antimutagenicity of hispidulin and hortensin, the flavonoids from *Millingtonia hortensis* L. *Environ. Mol. Mutagen.*, 20: 307-312.
33. **Hour T.C.**, Y.C. Liang, I.S. Chu and J.K. Lin, 1999. Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-) epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. *Food Chem. Toxicol.*, 37: 569-579.
34. **Weisburger J.H.**, Hara Y., Solan L., Luo F.Q., Pittman B., Zang E. 1996. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. *Mutat. Res.*, 371: 57-63.
35. **Geetha T.**, Garg A., Chopra K., Kaur I.P. 2004. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutat. Res.*, 556: 65-74.
36. **Soudamini K.K.**, Unnikrishnan M.C., Sukumaran K., Kuttan R. 1995. Mutagenicity and antimutagenicity of some selected spices. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 39: 347-353.
37. **Connolly J.D.**, Kitahara Y., Overton K.H. and Yoshikoshi A. 1965. A direct correlation of dolabradiene and erythroxydiol Y. *Chem. Pharm. Bull.*, 13: 603-605.
38. **Patil A.D.**, Freyer A.J., Webb R.L., Zuber G. and Reichwein R. 1997. Pulcherrimins A-D, novel diterpene dibenzoates from *Caesalpinia pulcherrima* with selective activity against DNA repair-deficient yeast mutants. *Tetrahedron*, 53: 1583-1592.
39. **Chung K.T.**, Wong T.Y., Wei C.I., Huang Y.W., Lin Y. 1998. Tannins and human health: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38: 421-464.
40. **Sasaki Y.F.**, Matsumoto K., Imanishi H., Watanabe M., Tutikawa K. 1990. In vivo anticlastogenic and antimutagenic effects of tannic acid in mice. *Mutat. Res.*, 244: 43-47.
41. **Elias R.**, Meo M.D., Vidal-Ollivier E., Laget M., Balansard G. and Dumenil G. 1990. Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L. *Mutagenesis*, 5: 327-331.

42. **Lee I.P.**, Kim Y.H., Kang M.H., Roberts C., Roh J.K. 1997. Chemopreventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) against cigarette smoke-induced mutations (SCE) in humans. *J. Cell. Biochem.*, 27: 68-75.
43. **Rostettmann K.**, Marston A. 1995. Saponins. Cambridge: Cambridge University Press. p. 3ff. ISBN 0-521-32970-1. OCLC 29670810.
44. [http://gida.gumushane.edu.tr/user_files/files/FonksiyonelGidalar-DersSlaytlari-1\(2\).pdf](http://gida.gumushane.edu.tr/user_files/files/FonksiyonelGidalar-DersSlaytlari-1(2).pdf).
45. **Maron D. M.**, Ames B. N. 1983. Revised methods for the mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
46. **McCann J.**, Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc Nat Acad Sci* 72: 5135-39
47. **Mortelmans K.**, Zeiger E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455: 29-60
48. <http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr/>
49. **Gollapudi B. B.**, Krishna G. 2000. Practical aspects of mutagenicity testing strategy:an industrial perspective. *Mutation Research* 455: 21–28.
50. **Claxton L.D.**, Allen J., Auletta A., Mortelmans K., Nestmann E., Zeiger E. 1987. Guide for Salmonella typhimurium / mammalian microsome test for bacterial mutagenicity. *Mutation Research* 189: 83-91.
51. **Levin D. E.**, Yamasaki E., Ames B. N. 1982. Salmonella tester strain, TA 97 forthe detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hotspot. *Mutat. Res* 94: 315-330.
52. **Ames B.N.**, Lee F.D., 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 of the United States of America 70:782- 786.
53. **Erdinger L.**, Haack T., Boche, G. 2001. Mutagenicity in Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100 of nitrose and respective hydroxylamine compounds. *Mutation Research* 491: 183-193.
54. www.uzmanveteriner.com.tr/.../BİYOTRANSFORMASYON-%20İLAÇ%.

55. **Paolini M.**, Forti G.C. 1997. On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays: a review, *Mutation Research*, 387: 17-34.
56. **Inami K.**, Okazawa M., Mochizuki M. 2009. Mutagenicity of aromatic amines and amides with chemical models for cytochrome P450 in Ames assay. *Toxicology in Vitro* 23: 986–991.
57. **Omurtag G. Z.**, Arıcıoğlu F. Şardaş S., Oğuz S. 2013. Mutajenik Karsinojenik Etkinin Ames Testi İle Araştırılması. *MÜSBED* 3(2):75-82
58. **Bağcı H.** 1985. Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları.
59. **Vargus V.M.F.**, Motho V.E.P., Henriques J.A.P. 1993. Mutagenic Activity Detected by the Ames Test in River Water Under the Influence of Petro Chemical Industries. *Mut. Res* 319: 31-45.
60. **Perry P.E.**, Thompson E.J.1984. The methodology of sister chromatid exchanges. In: Kilbey B.J., Legator M.,Nichols W., Ramel C., eds. Handbook of mutagenicity test procedures, Elsevier Science, 495–529, Amsterdam.
61. **Dean BJ**, Brooks TM, Hodsonwalker G, Hutson DH.1985. GeneticToxicology Testing of 41 Industrial-Chemicals. *Mutat Res.* 153: 57-77.
62. **Uysal A**, Lazarova I, Zengin G, Gunes E, Aktumsek A, Gevrenova R. 2016. New Perspectives on *Asphodeline lutea* from Bulgaria and Turkey: Anti-mutagenic, Anti-microbial and Anti-methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Activity. *Brit J Pharm Res*10.
63. **Maron DM**, Ames BN.1983. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutat Res* 113: 173-215.
64. **Zengin G**, Uysal A, Gunes E, Aktumsek A. 2014. Survey of Phytochemical Composition and Biological Effects of Three Extracts from a Wild Plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch et Mey.): A Potential Source for Functional Food Ingredients and Drug Formulations. *Plos One* 9: 1-13.
65. **Schutz K**, Carle R, Schieber A.2006. Taraxacum - A review on its phytochemical and pharmacological profile. *J Ethnopharmacol* 107: 313-23.

66. **Popovic M**, Kaurinovic B, Mimica-Dukic N, Vojinovic Miloradov M, Dordevic A. 2001. Combined effects of plant extracts and xenobiotics on liposomal lipid peroxidation. Part 3. Dandelion extract-CCl₄/fullerenol. *Oxid Commun* 24: 335-43.
67. **Yamada J.** ve Tomita, Y. 1994. Antimutagenic activity of water Extracts of black tea and oolong tea, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58 (12), 2197-2200.
68. **Wu S.**, Yen G., Wang B.,Chiu C., Yen W., Chang L., Duh P. 2007. Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea, www.sciencedirect.com.
69. **Ivanova A.**, Marinova E, Toneva A., Kostova I., Yanishlieva N. 2006. Antioxidant properties of *Smilax excelsa*. *La Revista Italiana Della Sostanze Grasse*, 83: 124–128.
70. **Jiang J.**, Xu Q. 2003. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 53–59.
71. **Lee S.E.**, Ju E.M., Kim J.H. 2001. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root. *Experimental and Molecular Medicine*, 33 : 263–268.
72. **Rugna A.**, J. Polo, P. Evelson, A.A. Gurni, S. Llesuy, M.L. 2003. Wagner Antioxidant activity in rhizomes from *Smilax campestris* Griseb Smilacaceae. *Molecular Medicinal Chemistry*, 1 : 21–25
73. **Turkmen N.**, Sari F., Velioglu Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chem*, 99 : 835–841.
74. **Dai J.**, Mumper R.J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15 : 7313–7352.
75. **Martino L.D.**, Feo V.D., Nazzaro F. 2009. Chemical composition and in Vitro antimicrobial mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. *Molecules* 14(10): 4213-4230.
76. **Gomes-Carneiro M.R.**, Dias D.M.M., De-Oliveira A.C.A.X., Paumgartten. F.J.R., 2005. Evaluation of mutagenic and antimutagenic

activities of α - Bisabolol in the Salmonella/Microsome Assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 585(1-2): 105-112.

77. **Bakkali F**, Averbeck S., Averbeck D., Zhiri A., Baudoux D., Idaomar M. 2006. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 606(1-2): 27-38.
78. **Jayaprakasha G. K.**, Negi P.S., Jena B.S. 2006. Antioxidative and antimutagenic activities of the Extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7, 246–250.
79. **Samant S. S.**, 1997 . Diversity, Distribution and Conservation of Fodder Resources of West Himalaya, India', G. B. Plant Institute of Himalayan Environment & Development, Kosi-Katarmal, Almora (U. P.), India 263-643.
80. **Seo HK**, Lee JH, Kim HS, Lee CK, Lee SC. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of *Smilax china* L. leaf extracts. *Food Sci Biotechnol*, 21: 1723-1727.
81. **Chen L**, Yin H, Lan Z, Ma S, Zhang C, Yang Z, Li P, Lin B. 2011. Antihyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. *J Ethnopharmacol*, 135: 399-405
82. **Ozsoy N**, Can A, Yanardag R, Akev N. 2008. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chem*, 110: 571-583.
83. **Özsoy N.**, Okyar A., Arda-Pirinçci P., Can A., Bolkent Ş., Akev N. 2013. Evaluation of *Smilax excelsa* L. Use in Experimentally Induced Nephrotoxicity. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 19 (5): 807-814.
84. **Chen T**, Li J, Cao J, Xu Q, Komatsu K, Namba T. 1999. A new flavanone isolated from rhizoma *Smilacis glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage. *Planta Med*, 65, 56-59, 1999.
85. **Kuo Y. H.**, Hsu Y. W., Liaw C.C., Lee J.K., Huang H.C., Kuo LKJ., 2005. *J. Nat. Prod.*, 68, 1475.

86. **Longo L.**, Vasapollo G. 2006. *Food Chem.*, 94: 226.
87. **Ng T.B.**, Yu Y. L. 2001. *Int. J. Biochem. Biol.*, 33: 269.
88. **Bernardo R.R.**, Pinto A.V., Parente J.P. 1996. *Phytochemistry*, 43: 465.
89. **Ivanova A.**, Mikhova B., Klaiber I., Dinchev D., Kostova I. 2009. *Nat. Prod. Res.*, 23: 916.
90. **Ivanova A.**, Mikhova B, Kostova I, Evstatieva L. 2010. Bioactive chemical constituents from *Smilax excelsa*. *Chem Nat Compd*, 46: 295-297.
91. **Gupta Sk**, Trivedi D, Srivastava S, Joshi S, Halder N, Verma, Sd. 2003. Lycopene Attenuates Oxidative Stress Induced Experimental Cataract Development: An In Vitro And In Vivo Study. *Nutr*, 19: 794-799.
92. **Rao L.G.**, Guns, E., Rao A.V. 2003. Lycopene: its role in human health and disease. *Agro Food 7- 8* : 25-30.
93. **Tapiero H.**, Townsend D.M, Tew K.D. 2004. The Role Of Carotenoids In The Prevention Of Human Pathologies. *Biomed Pharma*, 58 : 100-110.
94. **Lacaille-Dubois MA**, Wagner H. 1997. A review of the biological and pharmacological activities of saponin. *Phytomedicine*, 2 : 363-386.
95. **Koratkar R.**, Rao AV. 1997. Effect of soya bean saponins on azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the colon of mice. *Nutr Cancer*. 27(2) : 206-209.
96. **Fidan AF**, Dündar Y. 2007. Yucca schidigera ve İçerdiği Saponinler İle Fenolik Bileşiklerinin, Hipokolesterolemik ve Antioksidan Etkileri. *Lalahan Hay Arast Ens Derg*, 47 (2) : 31-39.
97. **Shahidi F.**, Naczki M. 1995. Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications. Technomic, USA.
98. **Karakaya S.**, El S.N. 1997. Flavonoidler ve sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi* 26(2) : 54-60.
99. **Hertog M.G.L.** 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2379-2383.
100. **Cemeroğlu A.P.**, Cemeroğlu B.S. 1998. Sağlık açısından gıda fenolikleri. *Gıda Teknolojisi* 3(9) : 52-55.

101. **Wanasundara U.N.**, Shahidi F. 1998. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry* 63(3) : 335-342.



ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Giresun'da doğdu. Lise öğrenimini Giresun'da Espiye-75. Yıl Çok programlı Lise'de tamamladı. 2010 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2014 yılında mezun oldu. Aynı yıl başladığı Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans öğrenimini 2016 yılında tamamladı. Yabancı dili İngilizcedir.

