



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CELTİS GLABRATA'NIN BAZI EKSTRAKLARININ AMES/SALMONELLA MİKROZOM TEST SİSTEMİ İLE ANTİMUTAJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Döndü AKIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos–2010
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Döndü AKIN tarafından hazırlanan "*Celtis glabrata*'nın bazı ekstraktlarının Ames/*Salmonella* mikrozom test sistemi ile antimutajenik etkisinin araştirilmasi " adlı tez çalışması 20/08/2010 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Başkan Prof. Dr. Yusuf DURAK	……..
Danışman Prof. Dr. Yusuf DURAK	……..
Üye Prof. Dr. Ali ATEŞ	……..
Üye Prof. Dr. Celaleddin ÖZTÜRK	……..

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Bayram SADE
FBE Müdürü

*Bu tez çalışması BAP tarafından **09201057** nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all materials and results that are not original to this work.

İmza

Döndü AKIN
Tarih: 20/08/2010

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

***CELTİS GLABRATA*'NIN BAZI EKSTRAKTLARININ AMES/*SALMONELLA* MİKROZOM TEST SİSTEMİ İLE ANTİMUTAJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Döndü AKIN
Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf DURAK
2010, XI + 49 sayfa

Jüri
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Ali ATEŞ
Prof. Dr. Celaleddin ÖZTÜRK

Bu çalışmada, *Celtis glabrata* Steven ex Planch'ın yaprak, meyve ve çekirdek ekstraktları, antimutajenik aktiviteleri yönünden Salmonella/mikrozom test sistemi ile incelendi. İncelenen bitki ekstraktlarının farklı dozlarının sitotoksik etkisi gözlenmedi. Antimutajenite denemeleri S9 varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde yapıldı.

İncelenen bitki yaprak, meyve ve çekirdek ekstraktlarının TA 98 suşu üzerinde S9 varlığında, TA 100 suşu üzerinde ise S9 yokluğunda daha güçlü antimutajenik aktiviteleri gözlendi. Yaprak aseton ekstraktı TA 100 suşu üzerinde ve S9 yokluğunda 50 mg/ml dozda en güçlü (% 95.5) , 0.05 mg/ml dozda ise en düşük (% 2.5) antimutajenik aktivite gösterdi. Çekirdek kloroform, aseton ve metanol ekstraktlarının TA 100 suşu üzerinde ve S9 varlığında doza bağlı güçlü antimutajenik aktiviteleri belirlendi.

Celtis glabrata Steven ex Planch bitkisinin tüm ekstraktlarının önemli derecede antimutajenik aktiviteye sahip oldukları görüldü.

Anahtar kelimeler: *Celtis glabrata*, *Salmonella*/mikrozom test sistemi, Antimutajenite, Sitotoksik etki.

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF ANTIMUTAGENIC EFFECTS OF SOME EXTRACTS OF *CELTIS GLABRATA* BY SALMONELLA/ MICROSOME TEST SYSTEM

Döndü AKIN
THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BİOLOGY

Advisor: Prof. Dr. YUSUF DURAK
2010, XI+ 49 pages

Jury
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Ali ATEŞ
Prof. Dr. Celaleddin ÖZTÜRK

In this study, *Celtis glabrata* Steven ex Planch leave, fruit and seed extracts were examined in terms of antimutagenic activities by the *Salmonella* / microsome test system. Different doses of examined plant extracts was not observed the cytotoxic effect. Antimutagenic experiments were performed in the presence and absence of S9 on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains.

The stronger antimutagenic activity of examined plant leave, fruit and seed extracts was observed on the TA 98 strain in the presence of S9 and on the TA 100 strain in the absence of S9.

Acetone extract of the leaves showed the most powerful antimutagenic activity the absence of S9 on the TA 100 strain in dose of 50 mg / ml (95.5%) ,however the lowest antimutagenic activity in dose of 0.05 mg / ml, (2.5%)

In the chloroform, acetone and methanol extracts of seed was determined dose-dependent strong antimutagenic activty in the presence of S9 on the TA 100 strain

All the extracts of *Celtis glabrata* Steven ex Planch plants were determined to be important for antimutagenic activity.

Key Words: *Celtis glabrata*, *Salmonelle* /microsomes test system, Antimutagenic, cytotoxic effect.

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2009-2010 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlandı. Çalışmada *Celtis glabrata*'nın bazı ekstraktlarının Ames/Salmonella mikrozom test sistemi ile antimutajenik etkileri araştırıldı. Laboratuar çalışmaları S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren değerli danışmanım sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK'a, Biyoloji Bölümünün her türlü araştırma imkânlarından faydalanmamı sağlayan, Bölüm Başkanı, Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK'e, tezimin oluşturulması ve yazılması sırasındaki her aşamada, gecesini gündüzüne katarak, çok büyük yardımlarını gördüğüm ve bana her konuda büyük destek olan sevgili arkadaşım Nuriye EKMEKCİ'ye, hayatımın en zor anında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Gönül DEMİREL'e, değerli bilgilerini, yardım ve önerilerini benden esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Ahmet UYSAL'a,

Çalışmalarım sırasında her konuda yardımcı olan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. M. Onur ALADAĞ'a, Yrd. Doç. Dr. Haluk ÖZPARLAK'a, Arş. Gör. Hatice TANER'a, Arş. Gör. Evren YILDIZTUGAY'a, Yrd. Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL'a, Yrd. Doç. Dr. Birol ÖZKALP'e, Doç. Dr. M. Aydın ŞANDA'ya, Öğr. Gör. Fatih SEVGİ'e, Arş. Gör. Erdoğan GÜNEŞ'e, Yavuz Selim ÇAKMAK'a, Arş.Gör. Gökhan ZENGİN'e, Safiye ACAR'a, Biyoloji Bölümü teknisyenleri Süleyman ALAN ve Yücel ÜSTÜN'e, bitkiyi öneren Mustafa OKUDAN'a, maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bu çalışmayı **09201057** nolu proje ile destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Döndü AKIN
KONYA - 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
ÖNSÖZ ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER LİSTESİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**
3. MATERYAL METOT **10**
3.1. Materyal 10
3.1.1. *Celtis glabrata* Steven ex Planch 10
3.1.2. Kullanılan test suşları 11
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler 11
3.1.4. Besiyerleri, tamponlar ve çözeltiler 12
3.2. Metot 18
3.2.1. Bitki ekstraksiyonlarının hazırlanması 18
3.2.2. Ekstraktların liyofilizasyonu 19
3.2.3. Bitki kısımlarının % verimlilik değerlerinin hesaplanması 19
3.2.4. Bitki ekstrakt dozları 19
3.2.5. Test şuslarının üretilmesi 20
3.2.6. Salmonella/mikrozom test sisteminde kullanılan şusların genetik özelliklerinin kontrolü 20
3.2.7. Kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü 24
3.2.8. Master plakların hazırlanışı 25
3.2.9. Sitotoksik dozun hesaplanması 26
3.2.10. Pozitif kontrol 26
3.2.11. Negatif kontrol 27
3.2.12. Antimutajenite testi (AMES/Salmonella mikrozon testi) 28
3.2.12.1. S9 yokluğunda yapılan deney 28
3.2.12.2. S9 varlığında yapılan deney 29
3.2.13. Sonuçların değerlendirilmesi 30
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI **31**
4.1. Test Şuslarının Üreme Durumları 31
4.2. Ekstraktların Hazırlanması 32
4.3. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi 33
4.4. Çalışılan Bitkilerin Antimutajenik Özelliklerinin Belirlenmesi 33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **42**
6. KAYNAKLAR **45**

SİMGELER VE KISALTMALAR

g …… gram
mg ……. miligram
ml…… mililitre
l……... litre
µg…… mikrogram
µl……. mikrolitre
^{0}C…… santigrad derece
rpm…….. dakikada ki devir sayısı
LD_{50}…… yarı yarıya öldürücü doz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.1. *Celtis glabrata* Steven ex Planch bitkisinin çeşitli görünümleri a) Sonbahar dönemi b) İlkbahar dönemi c) Sonbaharda meyve d) Sonbaharda meyve hasadı 10

Şekil 3.2.1. a) Rotary evapatörü b) Cam soxholet cihazı 19

Şekil 3.2.6.1 *S. typhimurium* TA 98'in histidin gereksinim kontrolü a) Histidin/ biyotin agarda üreme var b) Biyotin agarda üreme yok..... 21

Şekil 3.2.6.2. *S. typhimurium* TA 100'ün histidin gereksinim kontrolü a) Histidin/ biyotin agarda üreme var b) Biyotin agarda üreme yok 21

Şekil 3.2.6.3. *S. typhimurium* TA 98 ve *E.coli* ATTC suşlarında R faktörü varlığının kontrolü a) Ampisiline dirençli TA 98 suşu b) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu 22

Şekil 3.2.6.4. *S. typhimurium* TA 100 ve *E.coli* ATTC suşlarında R faktörü varlığının kontrolü a) Ampisiline dirençli TA 98 suşu b) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu 22

Şekil 3.2.6.5. *S. typhimurium* TA 98, TA 100 ve *E.coli* ATTC 25922 suşlarında R faktörü varlığının kontrolü a) Ampisiline dirençli TA 98 suşu b) Ampisiline dirençli TA 100 suşu c) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu 23

Şekil 3.2.6.6. *S. typhimurium* TA 98 suşunda rfa mutasyonu kontrolü a) Zon çapı 14 mm b) Zon çaplarının yakın görünümü 23

Şekil 3.2.6.7. *S. typhimurium* TA 100 suşunda rfa mutasyonu kontrolü a) Zon çapı 14 mmb) Zon çaplarının yakın görünümü 24

Şekil 3.2.7. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarının kontrolü. a) *S. typhimurium* TA 98 suşunda b) *S. typhimurium* TA 100 suşunda 24

Şekil 3.2.10.1. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerine; a) S9 yokluğunda 4 nitro-o-fenilendiamine mutajeninin etkisi b) S9 varlığında 2-Aminoflouren mutajeninin etkisi..... 27

Şekil 3.2.10.2. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerine S9 varlığında ve yokluğunda Sodyum azid mutajeninin etkisi..... 27

Şekil 3.2.11.1. *Salmonella typhimurium*n TA 98 suşunun negatif kontrol plaklarındaki üreme durumu a) Dimetil sülfoksit b) Su 28

Şekil 3.2.12.2 *Salmonella typhimurium*n TA 100 suşunun negatif kontrol plaklarındaki üreme durumu a) Dimetil sülfoksit b) Su 28

Şekil 4.4.1. *Celtis glabrata Steven ex Planch* çekirdek ekstraktlarının 50 mg/ml dozunda *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığında antimutajenik etkileri a) Kloroform b) Aseton c) Metanol d) Etanol 38

Şekil 4.4.2. *Celtis glabrata* Steven ex Planch yaprak ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları..... 39

Şekil 4.4.3. *Celtis glabrata* Steven ex Planch *meyve* ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları..... 39

Şekil 4.4.4. *Celtis glabrata* Steven ex Planch çekirdek ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları 40

Şekil 4.4.5. *Celtis glabrata* Steven ex Planch *yaprak* ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları..... 40

Şekil 4.4.6. *Celtis glabrata* Steven ex Planch *meyve* ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları..... 41

Şekil 4.4.7. *Celtis glabrata* Steven ex Planch çekirdek ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları .. 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.2. Ames test sisteminde kullanılan bazı *Salmonella* suşları ve genetik özellikleri 11

Çizelge 3.2.7. Mutant suşların kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları 25

Çizelge 4.1.1. *Salmonella typhimurium TA 98* 'in zamana bağlı absorbans değerleri ve üreme yoğunluğu 31

Çizelge 4.1.2. *Salmonella typhimurium TA 100* 'in zamana bağlı absorbans değerleri ve üreme yoğunluğu 31

Çizelge 4.2. *Celtis glabrata* Steven ex Planch bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek kısımlarının klorofrom, aseton, metanol ve etanol çözücüsü ile edilen ekstraktların % verimlilik oranları 32

Çizelge 4.3. *Celtis glabrata* Steven ex Planch bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek ekstraktlarının *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerine etkileri 33

Çizelge 4.4.1. *Celtis glabrata* Steven ex Planch yaprak ekstraktlarının farklı dozlarının *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde antimutajenik etkileri 35

Çizelge 4.4.2. *Celtis glabrata* Steven ex Planch meyve ekstraktlarının farklı dozlarının *S.typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları üzerinde antimutajenik etkileri 36

Çizelge 4.4.3. *Celtis glabrata* Steven ex Planch çekirdek ekstraktlarının farklı dozlarının *S.typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları üzerinde antimutajenik etkileri 37

1.GİRİŞ

Bitkiler, binlerce yıldan beri tedavi amacıyla insanlar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Baytop 1999, Toroğlu ve Çenet 2006).

Bitkilerin antimikrobiyal özellikleri ve insan sağlığı ile ilgili aktiviteleri araştırılmaya devam edilmektedir (Dığrak ve ark. 1999).

Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO); 91 ülkede toplam 20.000 civarındaki bitki türünün tedavi amaçlı olarak kullanıldığını bildirmiştir (Baytop 1999).

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

Bitkisel drogların yapısında selüloz, nişasta, pektin, protein ve şeker gibi tedavi yönünden etkisiz maddelerin yanı sıra, çok az miktarlarda farmakolojik etkilere sahip bileşikler de bulunmaktadır (Baytop 1999). Bu bileşiklerin başlıcaları; glikozitler, alkaloitler, organik asitler, tanenler, eterik yağlar, uçucu yağlar ve vitaminlerdir (Başer 1997).

Bitkiler hem geleneksel ilaçlar hem de modern ilaçların ham maddesi olarak kullanılmaktadırlar (Rovado ve ark. 2004). Çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve geriletici özelliği olan bitkisel metabolitler üzerine birçok deneysel çalışmalar yapılmakta, antimutajen ve antikanserojenlerin önemi gün geçtikçe daha fazla anlaşılmaktadır (Karaker ve ark. 2000).

Bitkisel metabolitlerin antimutajenik aktivitelerinin belirlenmesinde, deney hayvanları kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalar uzun süre ve yüksek maliyet nedeniyle başlangıç aşamasında tercih edilen test sistemleri değildir (Iarc 1980). Bu nedenle araştırıcılar, antimutajenite çalışmalarına temel olabilen kısa zamanlı ve düşük maliyetli birçok test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans ve Zeiger 2000). AMES-*Salmonelle/*mikrozom test sistemi kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinden biri olup antimutajen/ antikarsinojenlerin veya tersine mutajen/karsinojenlerin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan önemli bir sistemdir (Abdullaev ve ark. 2003).

Bu çalışmada; Karaman ili Ermenek ilçesi ve civarında, gün geçtikçe azalan, insanlar tarafından değersiz görülerek kesilmeye başlandığından, yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalan ve geleneksel olarak, halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılan *Celtis glabrata* Steven ex Planch bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek kısımlarının değişik çözücüler kullanılarak elde edilen özütlerinin, sodyum azid, 4-nitro-o-fenilendiamin ve 2-aminofluoren mutajenlerine karşı antimutajenik etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu bitkilerin antimutajenik aktiviteleri ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmadığından adı geçen bitki türünün AMES/*Salmonella* mikrozom testi sistemi ile araştırılması uygun görüldü.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Doğal ya da yapay kimyasal maddelerin pek çoğu belirli metabolik aktivasyonlardan sonra veya doğrudan doğruya DNA ile etkileşime girerek mutasyona ve kansere neden oldukları hemen herkes tarafından kabul edilmektedir. Sayıları milyonları bulan kimyasal maddelerin çok azının (20.000 civarında) kanserojenik potansiyelleri bilinmektedir. Geriye kalanların ve her gün listeye giren yeni sentezlenen maddelerin seri bir şekilde test edilerek mutajenik/kanserojenik etkilerinin saptanması gerekir. Kimyasal maddelerin karsinojenik etkilerini ortaya koymak için en önemli yöntem, deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Ancak bu testlerin sonuçlanması uzun zaman almakta ve maliyetleri yüksek olmaktadır (Iarc 1980). Bu nedenle araştırıcılar mutajenite taramalarına esas olan ve kısa zamanda sonuç verebilen düşük maliyetli birçok mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir. Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanları bakteriyel testlerdir. Ames / *Salmonella* / Mikrozom test yöntemi (*Salmonella typhymurium*'un TA ve YG suşları), S.O.S kromotest (*Escherichia coli)* bakteriyel test sistemlerinden bazılarıdır. Bakteriler; basit ortamlarda hızlı üremeleri ve maliyetlerinin düşük olması nedeni ile tercih edilmektedirler (Hofnung ve Quillardet 1986).

Salmonella/ mikrozom test sistemi, gen mutasyonlarının oluşumunda öncülük eden, genetik hasarların meydana gelişine neden olabilecek maddelerin tespit edilmesinde geniş ölçüde kabul gören kısa zamanlı bakteriyel test sistemidir. Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş bir sistem olup kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini araştırmak amacıyla standardize edilmiş ve günümüzde en fazla kabul gören bir yöntemdir (Maron ve Ames 1983, Mortelmans ve Zeiger 2000). Bu sistem; sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, okzotrofik, histidin aminoasitine ihtiyaç duyan, mutant *Salmonella typhimurium* test bakterileri kullanılarak yapılmaktadır (Jorgensen ve ark. 1987). Bu test sisteminde kullanılan *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilen *Salmonella typhimurium* his (-) mutantları, his operonunun değişik bölgelerinde değişik birer mutasyon içerir. *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile kimyasal maddelerin, bu test suşlarını his (+) revertantları haline dönüştürme özellikleri saptanmaktadır. *Salmonella*/mikrozom test sistemi başlıca iki varsayıma dayanmaktadır.

Bunlardan birincisi, kullanılan maddelerin bakteri DNA'sı ile etkileşime girerek mutasyona ve insan dahil diğer canlı türlerinde de benzer mutasyonlara yol açmaya neden olmalarıdır. İkincisi, mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelâsyonun yüksek olmasıdır (Mortelmans ve Zeiger 2000).

Salmonella/ mikrozom test sisteminin kullanıma başlandığı 1975 yılından 1982 yılına kadar geçen süre içinde, beş binden fazla kimyasal maddenin mutajenik etkileri araştırılmıştır. Bu test sisteminde, karsinojen olarak bilinen 179 madde teste tabi tutulmuş ve bunlardan 156'sının (% 87'si) mutajenik olduğu bulunmuştur. Aynı sistem ile 117 karsinojenik olmayan maddeyi de % 86'lık bir oran ile nonmutajenik olarak sınıflandırmıştır. Bu değerden anlaşılacağı gibi *Salmonella*/mikrozom test sistemi, karsinojenik maddelerin % 13'ünü mutajenik etkili olarak saptayamamaktadır. Diğer taraftan aynı test sistemi ile karsinojenik olmayan maddelerin de % 14'ü mutajenik olarak tanımlamaktadır (Akın 1990).

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

Akın ve Sümer (1989), Sodyum benzoatın S9 varlığında ve yokluğunda test suşları üzerinde mutajenik etkili olmadığını, sodyum nitratın ise S9 varlığında *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerinde zayıf mutajenik etkili olduğunu belirlemişlerdir.

İzbırak ve ark. (1990), Gıdaları renklendirmede yaygın olarak kullanılan 4 azo boyasının (Ponceau 4R, Amaranth, Sunset Yellow FCF ve Tartrazine) *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 üzerine mutajenik etki göstermediğini tespit etmişlerdir.

Sümer ve ark. (1990), bazı insektisitlerin *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki mutajenik etkilerini araştırdıkları bu çalışmalarında; Bioallethrin'in, *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşu, Propoxur ve Formulation I'in ise sadece *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde zayıf mutajenik etki gösterdiğini saptamışlardır.

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

Le Curieux ve ark. (1993), yedi kimyasal maddeyi SOS chromotest, Ames test sistemi ve newt mikronukleus test sistemleri ile incelemiş; test edilen kimyasal maddeleri Ames test sisteminde sodyum hipoklorit hariç diğer bütün kimyasalların *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 102 ve TA 98 üzerinde mutajenik aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Ramos ve ark. (2001), *Parthenium hysteropharus* bitkisinden elde edilen ham ekstraktı mutajenik potansiyeli yönünden Salmonella/mikrozom test sisteminde ve fare kemik iliği mikronükleus testinde incelemişlerdir. Bakteriyel mutajenite testi sonuçları beş farklı suşta (S*almonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA 98, TA 100 ve TA 102) negatif olarak bulunmuştur.

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

Kutlu ve ark. (2006), çalışmalarında ilaç ham maddesi olarak kullanılması düşünülen iki tetrahidrobenzimidazol türevi bileşiğin mutajenik özelliklerini *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda araştırmışlardır. Negatif kontrollerle karşılaştırıldığında bileşiklerin mutajenik özellik göstermediği belirtilmiştir.

İn vivo ve *in vitro* çalışmalar, bitkilerin yaprak, meyve ve kök gibi kısımlarından elde edilen bazı doğal bileşiklerin, ksenobiyotik özellikteki maddelerin etkileri üzerinde düzenleyici rol oynadıklarını göstermiştir. Bu bileşiklerin karakterizasyonu, tanımlanması, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin belirlenmesi önemlidir (Rovado ve ark. 2004).

Son zamanlarda birçok doğal bileşiğin tümör inhibe edici etkiye ve immun sistemi kuvvetlendirici özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Lien ve Li 1985).

Antimutajenite; mutajenik maddelerin mutajen veya kanserojen etkilerinin ortadan kaldırılması veya bunların DNA ile etkileşimlerinin önlenmesidir. Genellikle antimutajenik maddeler etki etme şekillerine göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olmak üzere ikiye ayrılır. Mutajenin DNA'nın yapısına katılmasından sonra DNA replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarının işleyişini düzenleyerek mutagenezisi azaltan maddeler biyoantimutajenik maddelerdir. DNA polimeraz I ve DNA polimeraz III sentezini artırmak, error- prone DNA tamir mekanizmasını engellemek, error- free DNA tamir mekanizmasını geliştirmek biyoantimutajenlerin etkiledikleri önemli

mekanizmalardır. Mutajen ajanların hücreye girişini bloke eden yani DNA'nın yapısına dahil olmadan onları inaktif hale getiren antimutajenik maddeler ise desmutajenler olarak tanımlanmaktadırlar. Ajanları bloke etme, nitrosation reaksiyonlarını engelleme, serbest radikalleri (reaktif oksijen türleri= ROS) giderme, devre I ve devre II detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu başlıca etki mekanizmalarıdır (Nakasugi ve ark. 2000).

Bitkiler; fenolik bileşikler (fenolik asit, flavonoid, quinonlar, koumarinler, taninler), nitrojen bileşikler (alkaloidler, betaalaninler, aminler), vitaminler, terpenoidler (karotenoidler) ve antioksidant aktivite bakımından zengin olan bazı endojen metabolitler içerebilirler. Epidemiyolojik araştırmalar böyle antioksidant bileşiklerin anti-inflamatuar, anti-arteriosklerotik, antitümör, antimutajenik, antikarsinojenik, antiviral, antibakteriyal aktivitelere çok veya az ölçüde sahip olduğunu göstermiştir (Chai ve ark. 2004).

Polifenoller, fenolik bileşikler veya polifenollerin aromatik halkaları, bir veya daha fazla sayıda hidroksil grup içeren bileşiklerdir ve büyük bir kısmı hidrofiliktir. Meyvelerde ve sebzelerde bol bulunan fenolik bileşikler, birçok besin ve içeceğin tadının, lezzetinin, renginin kaynağını oluştururlar (Moss ve ark. 1993). Fenolik bileşiklerin sahip olduğu antioksidant aktivite esas olarak metal şelatlama, singlet oksijen giderme, hidrojen verici ve indirgeyici ajan olarak davranmalarını sağlayan redox özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Polifenollerin antimutajenik ve antikarsinojenik etkiye sahip olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır (Ancos ve ark. 2000).

Bitki pigmentleri olarak bilinen flavonoidler, polifenolik bileşikler grubuna dahil olup bitkilerin herhangi yerinde oluşabilirler (Wenzel 2004, Chai ve ark. 2004; Galati ve O'Brien 2004). Doğal olarak oluşabilen 4000 farklı flavonoid tanımlanmış ve bu sayı gün geçtikçe artış göstermektedir (Galati ve O' Brien 2004). Flavonoidlerin (galangin, kaempferol, quercetin, myricetin, fisetin, morin, catechin, rhamnetin, rutin v.b.) birçok biyolojik aktiviteyi düzenlediği belirtilmiştir. Bakterisit ve biyotransformasyon enzimlerini düzenleyici özellikleri nedeni ile antitümör ve antioksidant olarak görev aldıkları bildirilmektedir.

Beudot ve ark. 1998, heterosiklik aminlere karşı dördüncü pozisyonda fonksiyonel bir karboksil grubu içeren flavonoidlerin, antimutajenik aktivitede son derece önemli rol oynadıklarını tespit etmişlerdir.

E vitaminin insanda en baskın bulunan formu (α-tokoferol); antioksidant ve yağda erime özelliğine sahiptir. Bazı formlarının insanda kanser hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu ve bazılarının da apoptozisi indüklediği bildirilmiştir.

Askorbik asit (vitamin C), etkili serbest radikalleri bağlayıcı özelliğe sahip bir antioksidanttır ve bilinen birçok mutajene karşı antimutajenik etkisi gösterilmiştir (Gentile ve ark. 1998). Askorbik asitin insan kolon kanseri hücrelerinde spontan mutasyon oranını azalttığı belirlenmiştir (Wenzel 2004).

Karotenoidler; sarı, turuncu ve yeşil renkteki sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunmaktadır. Domates, havuç, portakaldan elde edilen çeşitli karotenoid fraksiyonlarının antimutajenik etkileri (hidrokarbon karotenoidleri, ksantofiller, karotenoid esterleri) iki farklı mutajenle indüklenmiş *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde araştırılmış ve tüm bu fraksiyonların antimutajenik etki gösterdikleri kanıtlanmıştır (Raucher ve ark.1998).

Tanen içeriği yüksek yeşil çayın mide kanserine neden olan tümörlerin oluşumunu engellediği değişik araştırıcılar tarafından belirtilmiştir. Değişik mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda da tanen'in önemli bir antimutajenik madde olduğu bildirilmektedir. Antikarsinojenik ve antimutajenik etkisinin, antioksidant özelliğine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Ergezer ve ark. 2008).

Birt ve ark. (1986), sebzelerde bulunan apigenin ve robinetin'in antimutajenik aktivitesini Ames testi ile belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada; apigenin % 62 oranında ve robinetin ise % 87 oranında antimutajenik aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

Karakaya (1997), çiğ ısırgan otu ve haşlama suyu, kurutulmuş ısırgan tohumu, karabaş otu, adaçayı, kuşburnu çayı, üzüm pekmezi ve tarhananın sodyum azid mutajenine karşı *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerinde antimutajenik aktivite gösterdiklerini, mutajenik aktivitelerinin ise belirlenemediğini bildirmiştir.

Kalaycıoğlu ve ark. (1997), *Spinacia oleracea* L. (ıspanak), *Lepidium sativum* L. (tere), *Urtica dioica* L. (ısırgan otu) özütlerinin pestisitlere karşı antimutajenik özelliğini *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında, metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz olarak incelemişlerdir. Bu bitki ekstraktlarının Captan, Folpet, DDVP, Azinphosmethyl, Bioresmethrin ve Trifluralin'in mutajenik aktivitelerini azalttıklarını belirtmişlerdir.

Kaur ve ark. (2002), *Terminalia arjuna*'nın benzen, kloroform, aseton ve metanol ekstraktlarının *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde siyah asit boyası, 2- Aminofluore (2AF) ve 4- nitro-o- fenilendiamin'e (NPD) karşı antimutajenik etkilerini incelemiş, aseton ve metanol ekstraktlarının antimutajenik aktivitelerinin diğer ekstraktlardan daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

İpek ve ark. (2005), *Origanum onites*'in (İzmir kekiği) yağı ve ana bileşenlerinden olan carvacrol' u; *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde, S9 varlığında ve yokluğunda önemli antimutajenik aktiviteye neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Santhosh ve ark. (2005), Yeşil çay polifenollerinin (catechin, epicatechin, catechin gallate, epigallatocatechin gallate) antimutajenik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla AMES/*Salmonella/*mikrozom test sistemini kullanmış, tütünle indüklenen mutajeniteyi inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Nogueira ve ark. (1995), *Melampodium divaricatum*'un çiçek ekstraktların*Salmonella typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları üzerinde mutajenik aktivite göstermediğini ve AFB1, benzo(a)pyrene ve daunomycin'in mutajenik aktivitesini azalttığını gözlemişlerdir.

Evandri ve ark. (2005), *Melaleuca alternifolia* (çay bitkisi yağı) ve *Lavandula angustifolia* (lavanta yağı)'ın mutajenik ve antimutajenik etkilerini *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 suşları ve *Escherichia coli* WP2-uvrA suşları üzerinde incelemiş, iki bakteriyel test sisteminde de mutajenik aktivite görmezken, konsantrasyona bağlı antimutajenik aktivite belirlemişlerdir.

Hayder ve ark. (2008), *Myrtus communis* (mersin) bitkisinin yaprak kısmının hekzan, etil asetat, metanol ve kloroform ile elde edilen ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik aktivitelerini *Salmonella*/mikrozom testi ile incelemişlerdir. Ekstraktların hiç biri mutajenik aktivite görtermemiş, test edilen ekstraktlar *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları üzerinde aflatoxin B1 (AFB1) mutajenine karşı, *Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA1535 suşları üzerinde ise sodyum azid mutajenine karşı önemli bir antimutajenik etki göstermişlerdir. Etil asetat ve metanol ekstraktları da sodyum azid ve AFB1'e karşı yüksek seviyelerde antimutajenik aktiviteye neden olmuşlardır.

Özbek ve ark. (2008), Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesinden toplanan *Origanum vulgare* L. subsp. *Vulgare*'nin (kekik) metanol ekstraktının *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1538 suşları üzerine antimutajenik potansiyelini araştırmış

ve sonuç olarak *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* ekstraktının antimutajenik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ham ve ark. (2009), *Inonotus obliquus* (kül mantar) ekstraktlarının antimutajenik ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmiş, ekstraktların *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine önemli ölçüde antimutajenik etki gösterdiğini bulmuşlardır.

Loh ve ark. (2009), *Euphorbia hirta*'nın (sütlenğeç) bir bileşeni olan quercetin (25µg/ml)'in *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerine S9 varlığında ve yokluğunda güçlü mutajenik etki gösterdiğini, aynı bitkinin su ve metanol ekstraktlarının (>100 µg/ml) TA 98 ve TA 100 suşları üzerine S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik etkisinin olmadığını belirlemişlerdir.

Sotto ve ark. (2010), *Sisymbrium officinale Scop*. (yuvarlak hardal) ekstraktlarının *Salmonella typhimurium* TA 98, *Salmonella typhimurium* TA100 ve *Escherichia coli* WP2-uvrA suşları üzerinde güçlü bir antimutajenik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. *Celtis glabrata* Steven ex Planch

Celtis glabrata Steven ex Planch'ın yetiştiği lokaliteler ve vejetatif dönemleri belirlendi. Farklı yönlerden fotoğrafları çekildi. Yaprak ve meyveleri toplandı. Bitkinin ekolojik ve morfolojik özellikleri tespit edildi. Bitkinin teşhisi Araştırma Görevlisi Evren YILDIZTUGAY (Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından yapıldı. Bitkiye ait meyve ve yaprak örnekleri 2008- 2009 sonbahar döneminde toplandı (Şekil 3.1.1).



a) b)

c) d)

Şekil 3.1.1. *Celtis glabrata* Steven ex Planch bitkisinin çeşitli görünümleri a) Sonbahar dönemi b) İlkbahar dönemi c) Sonbaharda meyve d) Sonbaharda meyve hasadı.

3.1.2. Kullanılan test suşları

Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları (Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü)' den sağlandı (Çizelge 3.1.2.).

Çizelge 3.1.2. Ames test sisteminde kullanılan bazı *Salmonella* suşları ve genetik özellikleri.

Suş	Histidin Mutasyonu	Lipopolisakkarit (LPS)	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA1535	his G46	rfa	uvrB	-	AT_ GC Transisyon	Baz Çifti yerdeğişimine Neden Olan Mutajenler
TA1537	his C376	rfa	uvrB	-	C…….C yanına +1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA1538	his D3052	rfa	uvrB	-	CG……CG yanından -1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 97	his D6610	rfa	uvrB	+	CCC yanına +4	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 102	his G428 PAQ1_his	rfa	uvrB	+	G Ochre AT	Oksidanlar, X-Isınları, U.V., Mitomisin C, Bleomisin ve Kinonlar
TA 98	**his D3052**	**rfa**	**uvrB**	+	**CG yanından -1**	**Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler**
TA 100	**his G46**	**rfa**	**uvrB**	+	**AT_ CG Transisyon**	**Baz Çifti Değişimine Neden Olan Mutajenler**

(Öksüzoğlu 2000).

Salmonella typhimurium TA 98 suşu çerçeve kayması, TA100 ise baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Sodyum azid, 2-aminoflouren (2-AF) ve 4-nitro-o- fenilendiamin (NDP) (Merck, KGaA Darmstad, Germany)'den sağlandı. Diğer kimyasal maddeler ise D-glukoz 6-fosfat, β-NADP, D-biyotin, Ampisilin trihidrat (Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmBH, Germany), L-histidin-HCl monohidrat (Merck, KGaA Darmstad, Germany), Ampisilin ticari diskleri (Oxoid, Unipath Ltd, Basngstoke Hampshire, England), S9 fare karaciğer fraksiyonu (Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmBH, Germany)'dan sağlandı.

Kullanılan çözücüler: Kloroform ($CHCl_3$, donma noktası -63.7°C, kaynama noktası 61.7°C), Aseton (C_3H_6O, donma noktası -94.3°C, kaynama noktası 56.2°C), Metanol (CH_4O, donma noktası -98°C, kaynama noktası 64.6°C), Etanol (CH_3CH_2OH,

donma noktası -114.1°C, kaynama noktası 78.5°C), Dimetil sülfoksit ($(CH_3)_2SO$, donma noktası -20°C, kaynama noktası 189°C) (Merck, KGaA Darmstad, Germany)'den sağlandı (Uyar 1992).

3.1.4. Besiyerleri, tamponlar ve çözeltiler

Vogel-Bonner Minimal Medium Tuzları (50x VB): Minimal glikoz agar (MGA), histidin biyotin (HB) agar ve histidin biyotin ampisilinli (HBA) agar plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

	1000 ml
Distile su (45 ºC)	670 ml
Magnezyum sülfat ($MgSO_4.7H_2O$)	10 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat, dibazik (susuz) (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($NaHNH_4(PO_4.4H_2O)$)	175 g

Temiz bir erlen içine distile su konularak 45 ºC'ye kadar ısıtıldı. Maddelerin her biri yukarıdaki sıraya göre sıcak distile suya ilave edildi. Kristalleşmeyi önlemek için bir madde iyice çözülmeden diğeri eklenmemelidir. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121°C'de 20 dakika (d) steril edildi. Maddeler tamamen çözülmeden otoklav edilmemelidir. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

(0.5 mM) Histidin / biyotin çözeltisi: Antimutajenite deneylerinde (90 ml top agara 10 ml olarak) kullanıldı.

D- biyotin (F.W. 247.3)	30.9 mg
L-Histidin-HCl (F. W. 191.7)	24.0 mg
Distile su	250 ml

Biyotin kaynama noktasına yakın derecedeki distile su içerisinde çözüldü. Ardından histidin ilave edildi. Sterilizasyon 0.22 µm lik filtre kağıtları kullanılarak filtrasyonla veya otoklavda 121 ºC'de 20 dakika steril edilebilir. Çalışmamızda karışım otoklavda 121ºC'de 20 d steril edildi. +4°C de saklandı.

Üst Agar (Top Agar): Bakteri test suşları üzerinde denenen maddelerin homojen dağılımı için kullanıldı.

Agar agar	0.6 g
NaCl	0.5 g
Distile su	100 ml

Bitki ekstraktlarının sitotoksik dozlarını belirlemek amacıyla, yukarıdaki maddeler 100 ml distile su içerisinde ve 100 °C'ye ayarlı su banyosunda homojen hale gelinceye kaynatıldı. Beş ml'lik cam tüplere ikişer ml olarak dağıtıldı ve otoklavda 121 °C'de 20 d süre ile sterilize edildi.

Ekstraktların antimutajenik aktiviteleri için ise yukarıdaki maddeler 100 ml distile su içerisinde ve 100 °C'ye ayarlı su banyosunda homojen hale gelinceye kaynatıldı ve otoklavda 121 °C'de 20 d süre ile sterilize edildi. 50 °C'ye kadar soğutulan agara histidin biyotin çözeltisi eklenerek steril dispenser yardımı ile steril beş ml'lik cam tüplere ikişer ml olarak dağıtıldı ve katılaşmaması için 50 °C'ye ayarlı benmaride bekletildi.

Kristal viyole çözeltisi (% 0.1 lik): Suşların kristal viyole'ye duyarlılıklarını, dolayısı ile de rfa mutasyonu taşıyıp taşımadıklarını kontrol amacı ile kullanıldı.

Kristal viyole	0.1 g
Distile su	100 ml

Kristal viyole distile suda çözüldü ve hazırlanan solüsyon +4 ºC'de renkli şişede saklandı.

Serum Fizyolojik: Bakteri kültürlerinin dilüsyonunda kullanıldı.

NaCl	4.5 g
Distile su	500 ml

(% 0.13) Biyotin Çözeltisi: Standart bakteri suşlarının genotip özelliklerinin kontrolü ve HBA plakları hazırlanmasında kullanıldı.

D-biyotin	0.13 g
Distile su	100 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözüldü. Otoklavda 121 °C'de 20 d sterilize edildi. +4 °C'de saklandı.

(% 0.5) Histidin Çözeltisi: Standart bakteri suşlarının genotip özelliklerinin kontrolü ve HBA plakları hazırlanmasında kullanıldı.

L-Histidin-HCl (F.W. 191.7)	0.5 g
Distile su	100 ml

Otoklavda 121 °C'de 20 d sterilize edildi. +4 °C'de saklandı.

(% 20) Glikoz Çözeltisi: MGA ve HBA plakları hazırlanmasında kullanıldı.

Glikoz	20 g
Distile su	100 ml

Glikoz distile su içinde tamamen çözülerek otoklavda 121 °C'de 20 d sterilize edildi. +4 °C'de saklandı.

(2 μg/μl) 2-Aminofluorene (2AF): Pozitif kontrol olarak kullanıldı. 0.2 mg/plak olarak dimetilsülfoksit'de (DMSO) çözülerek kullanıldı. TA 98 suşu için S9 varlığında kullanılan indirekt mutajendir.

2AF	0.02 g
DMSO	10 ml

+4 °C'de saklandı (Kaur ve ark. 2002).

(2 μg/μl) 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD): Pozitif kontrol olarak kullanıldı. 0.2 mg/plak olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanıldı. TA 98 suşu için S9 yokluğunda direkt mutajendir.

NPD	0.02 g
DMSO	10 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

(0.01 µg/µl) Sodyum Azid Çözeltisi: Pozitif kontrol olarak kullanıldı. 1 µg/plak olmak üzere distile suda çözülerek kullanıldı. TA 100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda direkt mutajendir.

Sodyum azid	0.01 g
Distile su	100 ml

+4 °C'de saklandı.

0.02N NaOH Hazırlanışı: Ampisilin çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

NaOH	0.2 g
Distile su	250 ml

+4 ºC 'de saklandı.

(% 0.8/0.02 NaOH) Ampisilin çözeltisi: Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolünde ve master plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

Ampisilin trihidrat	0.8 g
NaOH (0.02 N)	100 ml

Ampisilin trihidrat, 0.02 N NaOH içinde çözüldü ve 0.45 µm çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. +4 °C'de saklandı.

Tuz çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M $MgCl_2$): S9 karışımında kullanıldı.

Potasyum klorür (KCl)	61.5 g
Magnezyum klorür ($MgCl_2$. $6H_2O$)	40.7 g
Distile su	500 ml

Distile suda çözülen tuzlar, otoklavda 121 ºC de 20 dakika steril edildikten sonra cam şişelerde buzdolabında veya oda ısısında saklandı.

0.2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH:7.4): S9 yokluğunda kullanıldı.

0.2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO4. H_2O)(13.82 g/500 ml)	60 ml
0.2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)(14.2g/500 ml)	440 ml

pH ölçüldü. Düşük olduğunda 0.2 M Disodyum hidrojen fosfat eklenerek istenilen pH derecesi ayarlandı. Otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi. Oda ısısında saklandı.

0.1 M β-NADP çözeltisi: S9 karışımında kullanıldı.

β-NADP (M. A: 765.4 g/mol)	383 mg
Steril distile su	5 ml

Sterilizasyon 0.45 μm çaplı filtre ile yapıldı. -20 °C'de buzdolabında saklandı

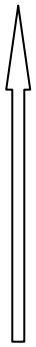
1M Glukoz -6 -fosfat çözeltisi: S9 karışımında kullanıldı.

Glukoz-6-fosfat	282 mg
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0.45 μm çaplı filtre ile yapıldı. -20 °C'de buzdolabında saklandı.

S9 karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri ve kofaktörleri): Antimutajenite deneylerinde kullanıldı.

	50 ml için
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml
MgCl2 – KCl tuz çözeltisi	1 ml
1 M Glukoz-6-fosfat	0.25 ml
0.1 M-NADP	2.0 ml
0.2 M Fosfat tamponu (pH: 7.4)	25 ml
Steril distile su	19.75 ml



Karışım her zaman aşağıdan yukarıya doğru taze olarak ve ihtiyaç duyulan miktarda hazırlandı. S9 karışımı deney çalışması sırasında sürekli içi buz dolu kap içinde tutuldu.

Minimal glukoz agar(MGA plakları) : Antimutajenite deneylerinde alt agar ve revertant koloni hesaplamalarında kullanıldı.

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	880 ml
50 x VB tuz çözeltisi	20 ml
Glukoz çözeltisi (% 20'lik)	100 ml

Agar ve distile su karışımı otoklavda 121 °C'de 20 d steril edildi. 50 °C'ye soğutularak, % 20 glukoz solüsyonu ve 50xVB tuzları karıştırılıp petri kutularına 25 ml olarak dağıtıldı. +4 °C'de saklandı.

Histidin / Biyotin / Ampisilinli katı ortam: R faktörü taşıyan suşların ampisiline dirençliliklerini test etmek amacıyla ve master plakların hazırlanmasında kullanıldı.

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	860 ml
50 x VB tuzları	20 ml
% 20'lik glukoz çözeltisi	100 ml
Steril histidin HCl H2O (% 0,5)	10 ml
Steril 0,5 mM Biyotin	6 ml
Steril ampisilin çözeltisi	3.15 ml

Agar ve su karışımı otoklavda 121 °C'de 20 d steril edildi. 50 °C'ye soğutularak % 20 glukoz, 50xVB tuzları, histidin çözeltisi, biyotin çözeltisi ve ampisilin çözeltisi eklendi. Karışım petrilere 25 ml olarak aktarıldı (Bu plaklarda bakteriler +4 °C'de 2 ay saklanabilir).

Nutrient broth: Bakterilerin sıvı kültürlerinin hazırlanmasında kullanıldı.

Nutrient broth no: 2 (Oxoid)	25 g
Distile su	1000 ml

Karışım otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi.

Nutrient agar: Test suşlarının kristal viyole ve UV'ye duyarlılık özelliklerinin test edilmesi, sitotoksik etkinin belirlenmesi ve gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi için kullanıldı.

Nutrient broth no: 2 (Oxoid)	25 g
Bacto agar	15 g
Distile su	1000 ml

Karışım otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi ve plaklara 25-30 ml olacak şekilde döküldü.

Histidin / Biyotin plakları (HB Agar) : Histidin gereksinimi deneyinde kullanıldı.

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	864 ml
50 x VB tuzları	20 ml
% 20'lik glukoz çözeltisi	100 ml
Steril histidin HCl H2O (% 0.5)	10 ml
Steril 0.5 mM Biyotin	6 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra 121ºC'de 20 dakika otoklavda steril edildi. 50 ºC 'ye soğutulup (20-30 d) 50xVB tuzları, % 20' lik glukoz, steril histidin, steril biyotin solüsyonları karışıma ilave edildi. Solüsyon steril petrilere 25 ml olacak şekilde döküldü ve katılaştıktan sonra +4 ºC'de saklandı.

3.2. Metot

Çalışmamızda, Maron ve Ames'in (1983) plak inkorporasyon metodu uygulandı. Deneyler S9 varlığında ve S9 yokluğunda yapıldı. Her deney üç paralelli olarak tekrarlandı. Çalışmada pozitif, negatif ve spontan kontroller de yapıldı. Çalışma Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2.1. Bitki ekstraksiyonlarının hazırlanması

Toplanan bitkinin yaprak, meyve ve çekirdekleri gölgede kurutuldu. Aseptik şartlara uyularak bir mekanik parçalayıcı yardımıyla toz haline getirildi. Toz haline getirilen bitki örneklerinden 20 g tartılarak 200 ml kloroform içerisinde Soxhlet (termal) cihazında sekiz saat ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Çözücü 50 °C'nin altındaki bir sıcaklıkta Rotary evoperatörde buharlaştırılarak ham ekstrakt elde edildi. Selülozik soxhlet kartuşu etüvde kurutularak diğer çözücülerle (aseton, metanol, etanol) yapılan ekstraksiyon işlemlerinde yeniden kullanıldı ve çözücüler yardımıyla elde edilen ham ekstraklar toplanarak buzdolabında +4 °C 'de saklandı (Sökmen 1999).





a) b)

Şekil 3.2.1. a) Rotary evapatörü b) Cam soxhlet cihazı

3.2.2. Ekstraktların liyofilizasyonu

Elde edilen bitki ekstraktları etüvde 50 °C'de çözücülerden tamamen ayrılıncaya kadar tutuldu. Liyofilizasyon şişelerine alınan ve -20 °C'de bir gece bekletilen ekstraktlar liyofilizatörde liyofilize (Edwards) edildi.

3.2.3. Bitki kısımlarının % verimlilik değerlerinin hesaplanması

Selülozik kartuşun darası alındı sonra 20 g bitki örneği kartuşa kondu. Ekstraksyon işleminden sonra kartuş kurutularak tartıldı. Aralarındaki fark alınarak % verimlilik oranı hesaplandı.

3.2.4. Bitki ekstrakt dozları

Liyofilize haldeki bitki ekstraktları 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml olacak şekilde DMSO'da çözülerek sitotoksik doz araştırmada kullanıldı. Antimutajenik aktivite çalışmalarında ise 50 mg/ml, 5 mg/ml, 0.5 mg/ml ve 0.05 mg/ml dozlar kullanıldı.

3.2.5. Test suşlarının üretilmesi

Salmonella typhimurium standart test suşları ile yapılan mutajenite/antimutajenite çalışmalarında, bakteri kültürünün bir ml'sinde 1-2 x 10^9 Koloni Oluşturan Birim (kob) olması öngörülmektedir. *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100'ün üreme eğrilerinin çıkarılması için içerisinde 20 ml nutrient broth (63 µl ampisilin solüsyonu eklenmiş) bulunan 50 ml'lik erlenlere master plaklardan veya histidin/biyotin agar plaklarından tek koloni alınarak ekim yapıldı. Çalkamalı etüvde 37 ºC'de 140 rpm çalkalama ile 16 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda elde edilen kültürden 0.5 ml örnekler alınarak 20 ml nutrient broth içeren erlenlere ekim yapıldı. 37 ºC'de 110 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Bakteri kültüründen belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin, spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Buna paralel olarak alınan örnekler belirli oranlarda (10^{-6} ve 10^{-7}) serum fizyolojik ile sulandırılarak, nutrient agarlı plaklara 0.1 ml olacak şekilde ekim yapıldı. Bu ekim sırasında bakterilerin homojen dağılımını sağlamak amacı ile bakteri kültürleri 50 °C'deki iki ml üst agara karıştırıldı ve çalkalandıktan sonra hızlı bir şekilde plakların yüzeyine dağıtıldı. Plaklar 37 ºC'lik etüvde bir gece inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapıldı. Bu amaçla *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 test suşlarının zamana karşı absorbans değerleri ve mililitredeki canlı bakteri sayıları belirlenerek üreme tabloları hazırlandı (Maron ve Ames 1983).

Bir mililitredeki koloni oluşturan birim (kob/ml) = sulandırma faktörü x plaktaki koloni sayısı x10 olarak hesaplandı.

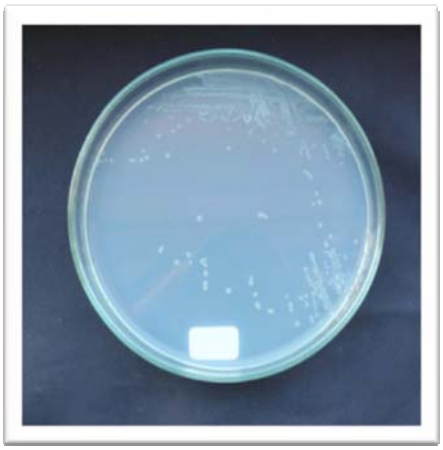
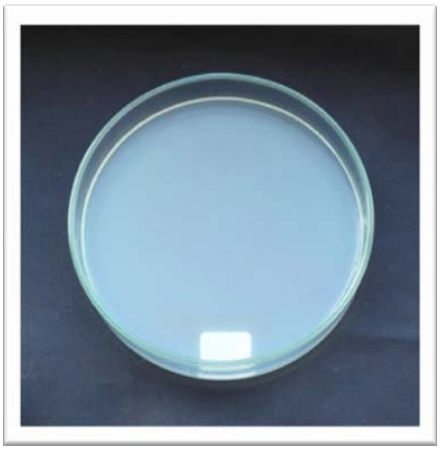
3.2.6. Salmonella/mikrozom test sisteminde kullanılan suşların genetik özelliklerinin kontrolü

Mutasyon testlerinde test maddesinin mutant suşu, atasal suş tipine döndürme gücü ölçüldüğü için, suşun genotip bakımından mutant karakterlere sahip olup olmadığının kontrol edilmesi, testin güvenilirliği açısından gereklidir. Bu nedenle, bakterilerin genotipleri çeşitli testler ile kontrol edildi.

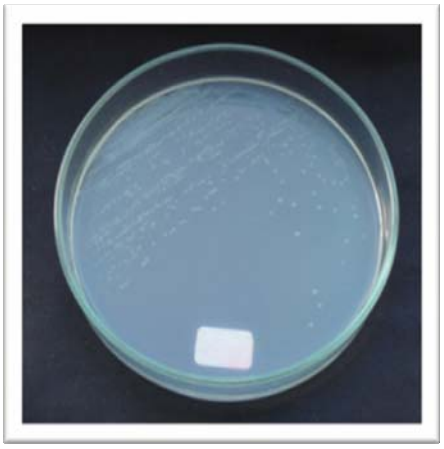
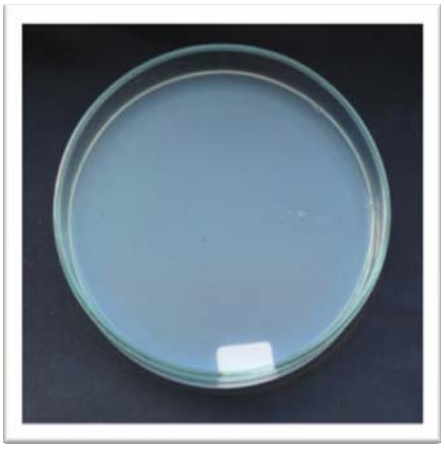
Histidin gereksinimi: Test suşlarının his (-) özelliği, minimal glukoz agar plaklarına ekilmeleri yoluyla kontrol edildi. Suşlar; uvrB delesyonu nedeniyle histidine ek olarak biyotine de gereksinim duydukları için histidin/ biyotin içeren ve sadece biyotin içeren histidinsiz minimal glukoz agar plaklarına ekildi. Suşların histidin varlığında üreyip,

histidin yokluğunda üremememeleri, his (-) karakterini doğrulamaktadır (Maron ve Ames 1983, Mortelmans ve Zeiger 2000).

Salmonella typhimurium TA 98 ve TA 100 suşları histidin\biyotin içeren minimal glukoz agarlı plaklarda üredi. Test bakterileri, biyotin içeren histidinsiz minimal glukoz agarlı plaklarda üremedi. Suşların his (-) karakteri doğrulandı (Şekil 3.2.6.1).

a)  b) 

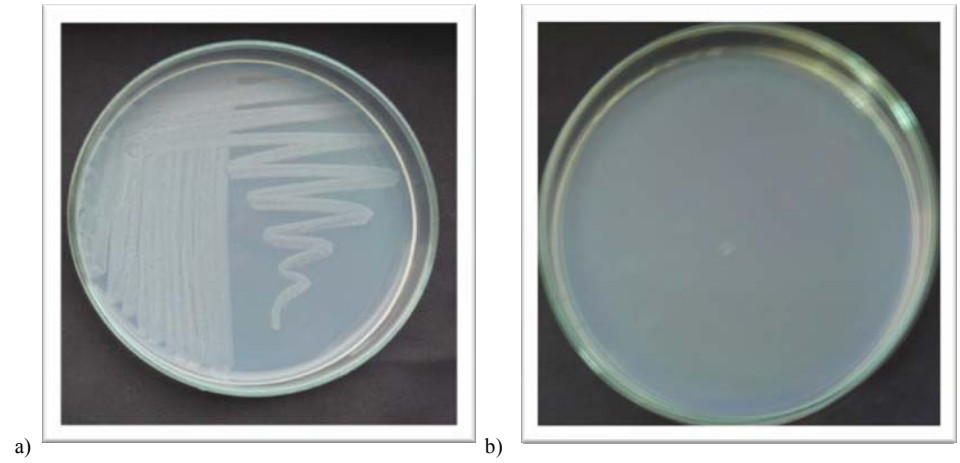
Şekil 3.2.6.1 *S. typhimurium* TA 98'in histidin gereksinim kontrolü a) Histidin/ biyotin agarda üreme var, b) Biyotin agarda üreme yok.

a)  b) 

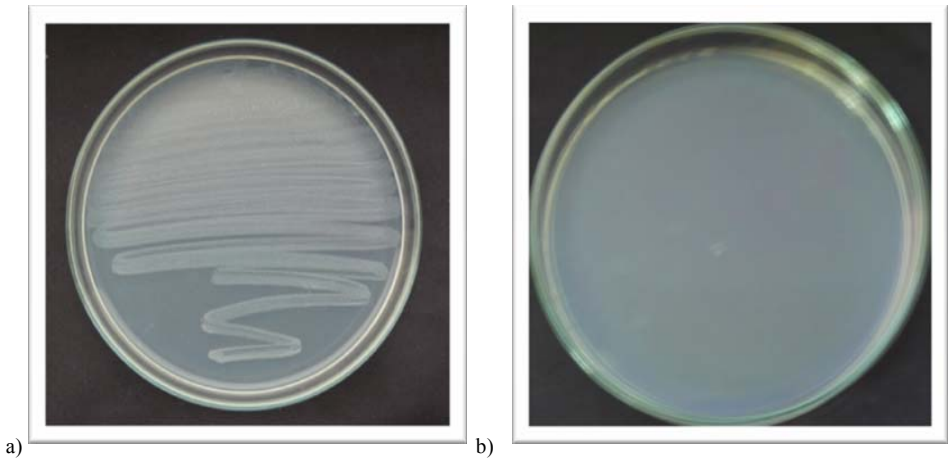
Şekil 3.2.6.2. *S. typhimurium* TA 100'ün histidin gereksinim kontrolü a) Histidin/ biyotin agarda üreme var, b) Biyotin agarda üreme yok.

R Faktörünün kontrolü: Öncelikle his (-) karakterleri doğrulanan kolonilerin ampisiline dirençlilikleri test edildi. Bunun için histidin/biyotin/ampisilin (HBA) agar hazırlanarak R faktörü test edilen suşların ekimi yapıldı (Mc. Cann ve ark. 1976). 37 °C'de 12-24 saatlik bir inkübasyon süresi sonunda, R faktörü içeren suşların ampisilinli plaklarda ürediği gözlendi. Bu çalışmaya alternatif olarak 10 μg'lık ticari ampisilin

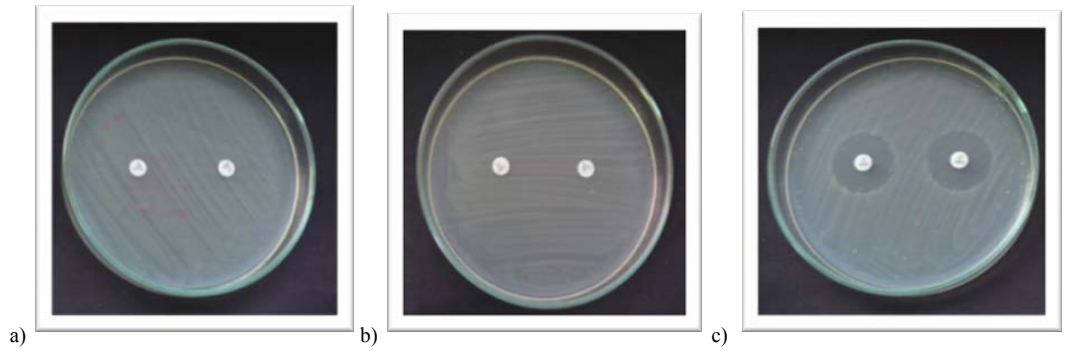
diskleri, bakteri ekimi yapılmış olan nütrient agarlı plaklara belirli aralıklarla yerleştirildi. İnkübasyon süresi (37 °C'de 12-24 saat) sonunda R faktörü taşıyan suşlarda inhibisyon zonu gözlenmedi. Kontrol amaçlı *E.coli* ATTC 25922 suşu için de bu işlemler yapıldı. Sonuç olarak HBA agar plaklarında üreme gözlenmedi ve nütrient agarlı plaklardaki ampisilin disklerinin etrafında inhibisyon zonu gözlendi. Bu da *E.coli* ATTC 25922 suşunun ampisiline duyarlı olduğunu kanıtladı (Şekil 3.2.6.3, 3.2.6.4 ve 3.2.6.5).



Şekil 3.2.6.3. *S. typhimurium* TA 98 ve *E.coli* ATTC suşlarında R faktörü varlığının kontrolü a) Ampisiline dirençli TA 98 suşu, b) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu.

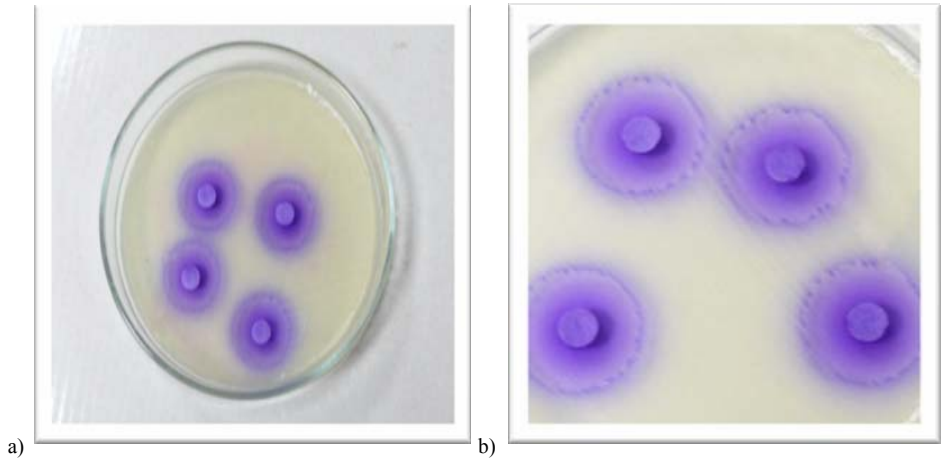


Şekil 3.2.6.4. *S. typhimurium* TA 100 ve *E.coli* ATTC suşlarında R faktörü varlığının kontrolü. a) Ampisiline dirençli TA 98 suşu, b) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu.

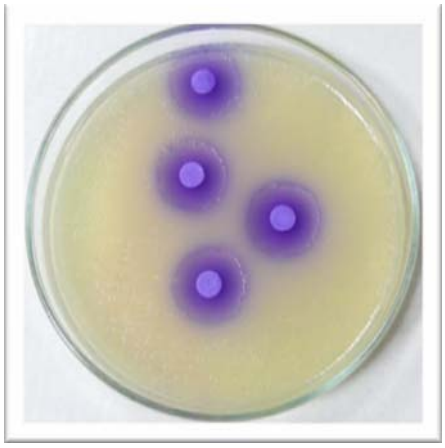


Şekil 3.2.6.5. *S. typhimurium* TA 98, TA 100 ve *E.coli* ATTC 25922 suşlarında R faktörü varlığının kontrolü. a) Ampisiline dirençli TA 98 suşu, b) Ampisiline dirençli TA 100 suşu, c) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu.

rfa mutasyonun kontrolü: Test suşlarının gecelik kültüründen alınan 0.1 ml'lik örnekler, Nutrient agarlı petrilere sürtme yöntemiyle dağıtılarak ekildi. 10 µl kristal viyole çözeltisi (1mg/ml) emdirilmiş hazır (Wathman no:1) boş diskler, petrilerin ortasına yerleştirildi. Petriler bir gece 37 °C'de inkübe edildikten sonra diskin etrafında inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığı gözlendi. Diskin çevresindeki şeffaf bölge, büyük moleküllü kristal viyole çözeltisinin bakteri içerisine girip, onu öldürmesine izin veren rfa mutasyonunun varlığının göstergesidir (Ames ve ark.1973 b).



Şekil 3.2.6.6. *S. typhimurium* TA 98 suşunda rfa mutasyonu kontrolü. a) Zon çapı 14 mm, b) Zon çaplarının yakın görünümü.

a)  b) 

Şekil 3.2.6.7. *S. typhimurium* TA 100 suşunda rfa mutasyonu kontrolü. a) Zon çapı 14 mm, b) Zon çaplarının yakın görünümü.

uvrB mutasyonunun kontrolü: Bu mutasyonun varlığı ultraviyole ışınlarına duyarlılık testi ile ölçüldü. Test suşlarının gecelik kültüründen öze ile alınan örnekler, nütrient agarlı plaklara ekilip yayıldı. 37 ^{0}C'de bir gecelik inkübasyondan sonra üreyen tek koloniler, steril eküvyon çubuklarıyla alınarak nütrient agarlı iki plağa çizgi ekim yöntemi ile ekildi. Bu plaklardan bir tanesi kontrol plağı olarak kullanıldı, diğeri ise kapağı açılıp 30 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 saniye süre ile ışınlandı. Kontrol plağı ve UV' ye maruz bırakılan plak 37 ^{0}C'de bir gece inkübe edildi. uvrB delesyonu taşıyan suşların kontrol plağında ürediği fakat UV ile ışınlanmış plaklarda ise üremediği gözlendi (Ames ve ark. 1973 a).

3.2.7. Kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü

Test suşlarının, histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geriye dönüş, mutajenite/antimutajenite deneylerinde rutin olarak ölçülür ve her plakta kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısı olarak ifade edilir. Bu kendiliğinden geriye dönüş her suş için belirli limitler içinde olmaktadır.

TA 98 için 20-50 revertant / plak

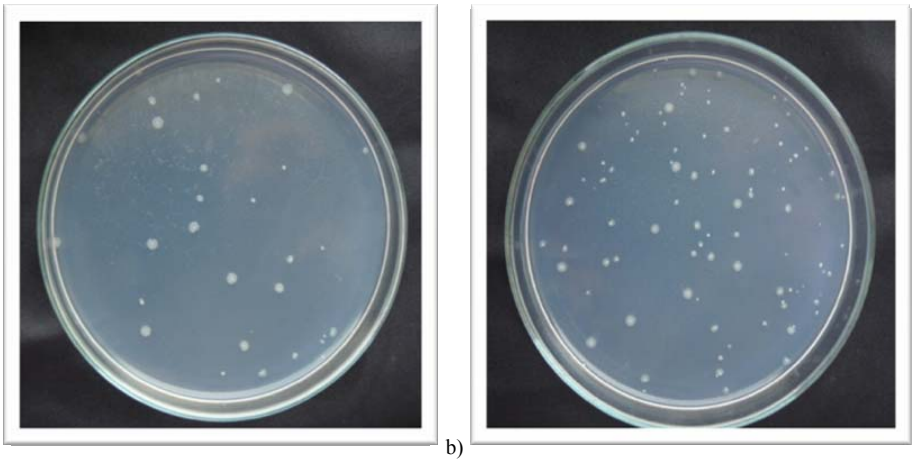
TA 100 için 80-200 revertant / plak

Bu bakterilerin kolonileri, oksotrofik mutant bakterilerin geliştiği bir besiyerinde kolayca gözlenebilir. Kendiliğinden geriye dönüş frekansını saptayabilmek için minimal glukoz agar plakları hazırlandı. Bacto agar (% 0.6) ve NaCl (% 0.5) içeren 100 ml'lik üst agar 121 ^{0}C'de 20 d otoklavda steril edildikten sonra, 50 ^{0}C'lik su banyosunda

bekletildi. Toplam hacim 100 ml olacak şekilde içerisine 0,5 mM histidin/biyotin çözeltisinden 10 ml eklendi. Bu karışım ikişer ml olarak steril tüplere dağıtıldı. Her suşun gecelik kültüründen tüplere 0,1 ml eklendi. Tüpler düşük devirli tüp çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra, karışım soğutulmadan plağın yüzeyine dağıtıldı ve sekiz şeklinde hareket ettirilerek yayılması sağlandı. 37 ^{0}C'de 48-72 saat arası inkübasyondan sonra geriye dönen kolonilerin sayımı yapıldı. Bu deney her iki suş için de birçok kez tekrarlandı ve ortalama sayıları belirlendi. Deney suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları, literatürlerdeki sayılarla benzerlik gösterdi (Maron ve Ames 1983).

Çizelge 3.2.7. Mutant suşların kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları

***Salmonella typhimurium* mutant suşları**	**Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı**
TA 100	120- 200
TA 98	30-50



a) b)

Şekil 3.2.7. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarının kontrolü. a) *S. typhimurium* TA 98 suşunda, b) *S. typhimurium* TA 100 suşunda.

3.2.8. Master plakların hazırlanışı

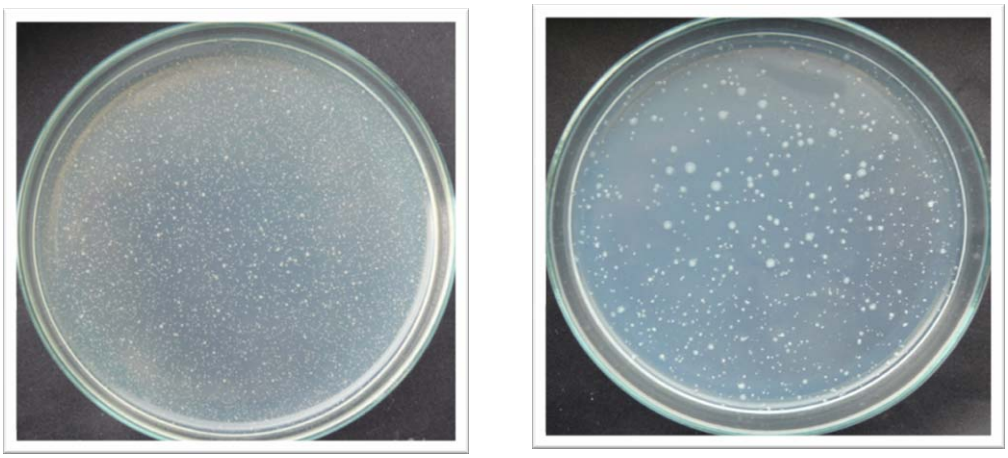
Bakteri suşlarının iki ay süre ile saklanabilmesi için (+4 ºC'de) master plaklar hazırlandı. Genetik işaretleri doğrulanan suşlar, histidin/biyotin/ampisilin içeren bu plaklara ekildi. Daha sonraki kültür hazırlama çalışmaları, iki ay süre ile bu plaklardan yapıldı (Maron ve Ames 1983).

3.2.9. Sitotoksik dozun hesaplanması

Antimutajenite deneyine geçmeden önce deneyin sağlıklı olarak değerlendirilmesi için, bitki ekstraktlarının sitotoksik etkilerinin saptanması gerekir. Uygun sayıda *S. typhimurium* TA 100 suşu içeren ($1\text{-}2x10^9$) kültürden serum fizyolojik kullanılarak 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} 10^{-6} ve 10^{-7} oranlarında seyreltme yapıldı. Sitotoksik etkiyi belirlede daima 10^{-7} oranındaki kültür kullanıldı. Daha sonra ekstraktların uygun konsantrasyonları hazırlandı. Bu işlemler tamamlandıktan sonra içerisinde ikişer ml top agar ihtiva eden tüplere, bakteri kültüründen 0,1 ml ve bitki ekstraktlarının değişik konsantrasyonlarından 0,1 ml eklendi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra nutrient agarlı plaklara hızlı bir şekilde döküldü ve yayıldı. Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra plaklardaki koloni sayıları, kontrol plaklarındaki bakteri sayıları ile karşılaştırılarak toksik olmayan dozlar saptandı (Dean ve ark. 1985). Sitotoksik doz, LD_{50}'nin altında olması gerekir. Deneme plaklarındaki koloni sayısı, kontrol plağındaki koloni sayısının yarısının altında olmaması durumunda, doz toksik olarak kabul edilmemektedir.

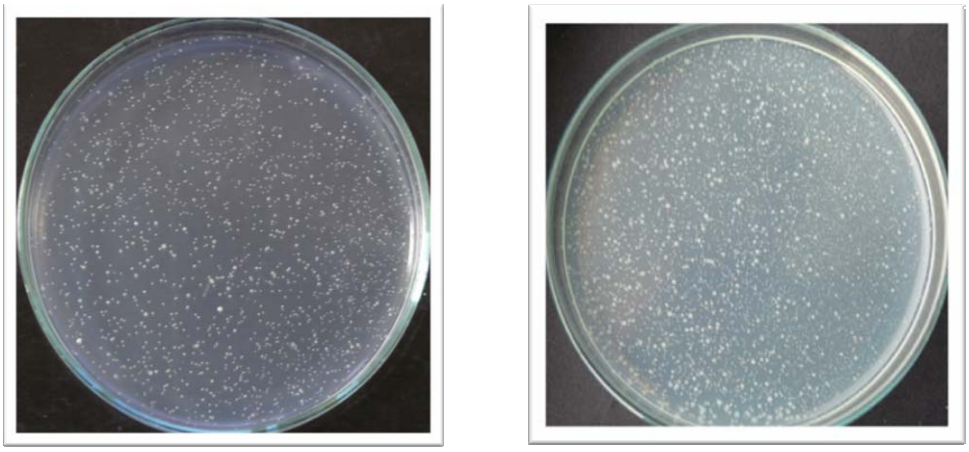
3.2.10. Pozitif kontrol

Bakterilerin bilinen standart mutajenlere karşı tepkilerini saptamak için belirlenmiş bir mutajen, pozitif kontrol amacıyla esas denemeye paralel olarak yapıldı. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için indirekt mutajen olan, 2-aminoflouren S9 karışımı varlığında ve direkt mutajen olan 4-nitro-o-fenilendiamine S9 karışımı yokluğunda kullanıldı. *Salmonella typhimurium* TA 100 için direkt mutajen olarak S9 karışımı varlığında ve yokluğunda sodyum azid kullanıldı (Özbek 2008).



a) **b)**

Şekil 3.2.10.1. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerine; a) S9 yokluğunda 4 nitro-o-fenilendiamine mutajeninin etkisi, b) S9 varlığında 2-Aminoflouren mutajeninin etkisi.

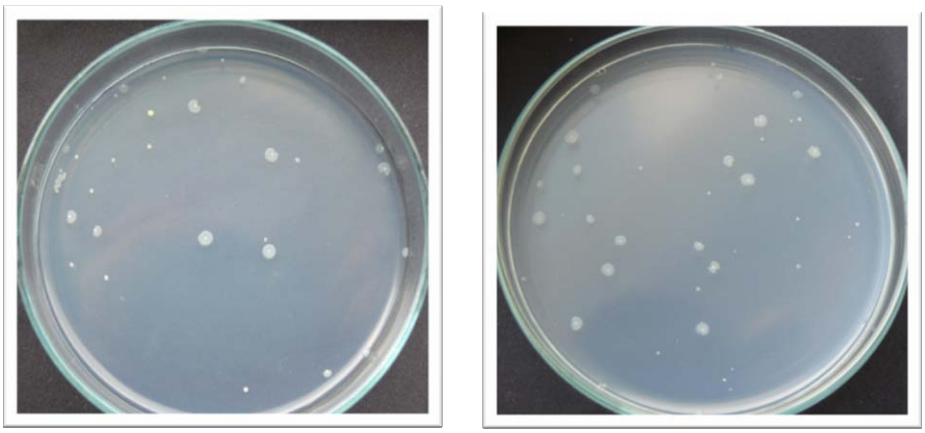


a) b)

Şekil 3.2.10.2. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerine; a) S9 varlığında Sodyum azid'in mutajenik etkisi, b) S9 yokluğunda Sodyum azid'in mutajenik etkisi.

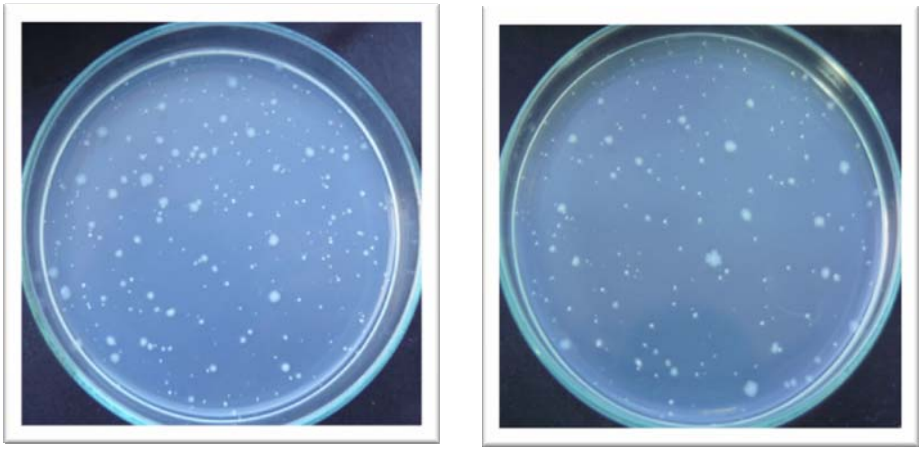
3.2.11. Negatif kontrol

Bitki ekstraktları ve kontrol mutajen maddelerinden 4-nitro-o-fenilendiamine ve 2-aminofloureni çözmek için kullanılan Dimetil sülfoksit'in, kontrol mutajenlerinden Sodyum azid'i çözmek için kullanılan suyun, her iki bakteri suşu üzerine etkisi olup olmadığını kontrol etmek amacı ile bu deney yapıldı. Bu denemede uygun konsantrasyondaki bakteri kültüründen ($1\text{-}2x10^9$) 0.1 ml ve spektrofotometrik saflıktaki dimetil sülfoksit'ten veya sudan 0.1 ml alınarak, içerisinde 2 ml top agar bulunan tüpe aktarıldı ve karışım minimal glukoz agarlı plakların yüzeyine dağıtıldı. Plaklar 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda negatif kontrol plakları ile revertant plaklarındaki bakteri sayıları karşılaştırıldı. Bu sayıların benzer veya yakın olması negative kontrolü doğruladığı kabul edildi.



a) b)

Şekil 3.2.11.1. *Salmonella typhimurium*n TA 98 suşunun negatif kontrol plaklarındaki üreme durumu. a) Dimetil sülfoksit, b) Su.



a) b)

Şekil 3.2.11.2 *Salmonella typhimurium*n TA 100 suşunun negatif kontrol plaklarındaki üreme durumu. a) Dimetil sülfoksit , b) Su.

3.2.12. Antimutajenite testi (AMES/ Salmonella mikrozom testi):

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

3.2.12.1 S9 yokluğunda yapılan deney

Bu deney için öncelikle gecelik kültür hazırlandı. 140 rpm'de 16 saat çalkalanan gecelik kültürden 500 µl alınarak taze kültür hazırlandı ve 6 saat boyunca 110 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bırakıldı. Bakteri kültürünün altı saat sonundaki üremesi bu deney için uygun olarak görüldü.

6. saat sonunda, 50 °C' lik su banyosunda tutulan ve tüplere iki ml olarak dağıtılmış olan top agara (bunun içine tüplere dağıtmadan önce 90 ml top agara 10 ml olacak oranda histidin/biyotin solüsyonu eklendi) sırasıyla önce 500 µl sodyum-fosfat tamponu, daha sonra 100 µl bitki ekstraktı, 100 µl altı saatlik taze bakteri kültürü ve 100 µl pozitif mutajen madde eklendi. Tüpler düşük hızda vortekslenerek MGA plakların yüzeyine döküldü ve sekiz işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Agarın donması beklendi ve plaklar ters çevrilerek 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plaklardaki koloniler sayıldı.

Deneyde her bir doz için üç ayrı plak kullanıldı. Ayrıca deneye paralel olarak negatif ve pozitif kontroller de yapıldı.

Negatif kontrol (su veya DMSO) için: 500 µl sodyum-fosfat tamponu +100 µl su veya DMSO+100 µl bakteri kültürü top agara eklendi.

Pozitif kontrol için: 500 µl sodyum-fosfat tamponu +100 µl pozitif mutajen madde +100 µl bakteri kültürü top agara eklendi.

3.2.12.2 S9 varlığında yapılan deney

Bu deney için öncelikle gecelik kültür hazırlandı. 140 rpm de 16 saat çalkalanan gecelik kültürden 500 µl alınarak taze kültür hazırlandı ve altı saat boyunca 110 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bırakıldı. Bakteri kültürünün altı saat sonundaki üremesi bu deney için uygun olarak görüldü.

6. saat sonunda, 50 °C' lik su banyosunda tutulan ve tüplere ikişer ml olarak dağıtılmış olan top agara (bunun içine tüplere dağıtmadan önce 90 ml top agara 10 ml olacak oranda histidin/biyotin solüsyonu eklendi) sırasıyla önce 500 µl S9 karışımı, daha sonra 100 µl bitki ekstraktı, 100 µl pozitif mutajen madde ve 100 µl altı saatlik taze bakteri kültüründen eklendi. Tüpler düşük hızda vortekslenerek MGA plakları yüzeyine döküldü ve sekiz işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlandı.

Deneyde her bir doz için üç ayrı plak kullanıldı. Ayrıca deneye paralel olarak negatif ve pozitif kontroller de yapıldı.

Negatif kontrol (su veya DMSO) için: 500 µl S9 karışımı +100 µl su veya DMSO +100 µl bakteri kültürü top agara eklendi.

Pozitif kontrol için: 500 µl S9 karışımı +100 µl pozitif mutajen madde +100 µl bakteri kültürü top agara eklendi.

3.2.13. Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmamızda denemeler üç tekrarlı olarak yapıldı ve elde edilen sonuçlar % inhibisyon değeri ile analiz edilerek tablo halinde verildi.

Salmonella mikrozom test sisteminde elde edilen sonuçlar değerlendirilirken, % inhibisyon oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

% inhibisyon oranı $= 1 - \frac{T-S}{M-S} \times 100$

T→ Mutajen madde ve bitki ekstraktlarının varlığında geri dönen koloni sayısı

M→ Sadece mutajen madde varlığında geri dönen koloni sayısı

S → Spontan revertant koloni sayıları

Bitkinin yaprak, meyve ve çekirdek ekstraktlarının mutajen madde üzerindeki inhibisyon oranı % 20-40 arasında olduğu durumlarda antimutajenik etki orta dereceli olarak tanımlanırken; % 40'tan fazla olduğu durumlarda güçlü antimutajenik etkili olarak kabul edildi. İnhibisyon oranı % 20'den daha az olduğunda ise antimutajenik etki negatif olarak kabul edildi (Negi ve ark. 2003).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1.Test Suşlarının Üreme Durumları

Salmonella typhimurium TA 98 ve TA 100 suşlarının zamana bağlı absorbans değerleri ve kültürün mililitresindeki canlı bakteri sayıları belirlendi (Çizelge 4.1.1, 4.1.2).

Salmonella/mikrozom test sisteminde kullanılan suş kültürlerinin bir mililitresinde 1-2x10^9 kob/ml olması öngörülmektedir (Maron ve Ames 1983). *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının bir mililitresinde bulunması gereken bakteri sayısına (1-2x 10^9 kob/ml); *Salmonella typhimurium* TA 98 inkübasyonunun yaklaşık 5. ve 6. saatleri arasında, *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunda ise 6. saatte ulaşıldı. Bu nedenle denemelerde, çalkalamalı inkübatörde 110 rpm ve 37 °C 'de altı saat süre ile inkübe edilen *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanıldı.

Çizelge 4.1.1. *Salmonella typhimurium* TA 98 'in zamana bağlı absorbans değerleri ve üreme yoğunluğu.

Zaman(saat)	Ortalama Absorbans(λ=650 nm)	Ortalama Canlı Bakteri Sayısı	Mc Farland tüp Yoğunluğu
3	0.540	1.1 10^8	0.6
4	0.545	1.2 10^8	0.7
5	0.720	1.74 10^8	0.8
6	**0.954**	**2.10^9**	**0.9**
7	0.718	1.25 10^8	0.7
8	0.818	1.29 10^8	0.7

Çizelge 4.1.2. *Salmonella typhimurium* TA 100 'ün zamana bağlı absorbans değerleri ve üreme yoğunluğu.

Zaman(saat)	Ortalama Absorbans (λ=650 nm)	Ortalama Canlı Bakteri Sayısı	Mc Farland Tüp Yoğunluğu
3	0.353	2.79 10^7	0.4
4	0.346	5.7 10^7	0.4
5	0.465	1.53 10^8	0.5
6	**0.640**	**1.35 10^9**	**0.6**
7	0.648	3.06 10^9	0.7
8	0.631	1.25 10^9	0.6

4.2. Bitki ekstraktlarının % verimlilik oranları

Celtis glabrata Steven ex Planch bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek kısımlarının kloroform, aseton, metanol ve etanol çözücülerinde çözülmesi sonucunda % verimlilikleri belirlendi. Yaprak ve çekirdek ekstraktlarının % verimlilik oranları en fazla kloroform'da, meyve'nin ise en fazla etanol'da belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *Celtis glabrata* Steven ex Planch bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek kısımlarının kloroform, aseton, metanol ve etanol çözücüsü ile elde ekstraktların % verimlilik oranları.

	YAPRAK	MEYVE	ÇEKİRDEK
KLOROFORM	% 4.94	% 5.366	% 8.4
ASETON	% 0.3	% 8.37	% 2.23
METANOL	% 4.166	% 9.46	% 5.36
ETANOL	% 2.23	% 34.97	% 5.46

4.3. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi

Antimutajenite denemelerinde kullanılan bitki ekstraktlarının sitotoksik dozları *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde araştırıldı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *Celtis glabrata* Steven ex Planch bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek ekstraktlarının *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerine etkileri.

Test Edilen Ekstraktlar		Dozlar mg/ plak			
		10 mg/plak	5 mg/ plak	2,5 mg/plak	Negatif kontrol
YAPRAK	Kloroform	191kob/plak	152 kob/plak	188 kob/plak	135 kob/plak
	Aseton	194 kob/plak	140 kob/plak	169 kob/plak	
	Metanol	88 kob/plak	138 kob/plak	169 kob/plak	
	Etanol	127 kob/plak	110 kob/plak	159 kob/plak	
MEYVE	Kloroform	137 kob/plak	163 kob/plak	163 kob/plak	135 kob/plak
	Aseton	141 kob/plak	103 kob/plak	137 kob/plak	
	Metanol	166 kob/plak	138 kob/plak	164 kob/plak	
	Etanol	148 kob/plak	163 kob/plak	138 kob/plak	
ÇEKİRDEK	Kloroform	141kob/plak	149 kob/plak	141kob/plak	135 kob/plak
	Aseton	121 kob/plak	125 kob/plak	145 kob/plak	
	Metanol	98 kob/plak	116 kob/plak	158 kob/plak	
	Etanol	125 kob/plak	127 kob/plak	114 kob/plak	

Bulgular; *Celtis glabrata* Steven ex Planch bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek kısımlarının kloroform, aseton, metanol ve etanol çözücüleri kullanılarak elde edilen ekstraktlarının 100 mg/ml ve altındaki dozlarının antimutajenik aktivite araştırmasında kullanılabilir olduğunu gösterdi. Sitotoksik dozun belirlenmesi sırasında, çözücü olarak kullanılan spektrofotometrik saflıktaki dimetil sülfoksit'in (DMSO) test suşları üzerine inhibisyon etkisi araştırıldı. Kontrol plağına göre anlamlı bir etkisi bulunmadı (Çizelge 4.3).

Antimutajenite deneylerinde bitki ekstraktlarının 50, 5, 0.5 ve 0.05 mg/ml'deki dozları kullanıldı (Çizelge 4.4.1, 4.4.2 ve 4.4.3).

4.4. Bitki Ekstraktlarının Antimutajenik Aktivite Sonuçları

Yaprak ekstraktlarının *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığında, S9 yokluğuna göre doza bağlı olarak daha yüksek inhibisyon oranları

gösterirken, TA100 suşu üzerinde ise S9 yokluğunda, S9 varlığına göre aseton ve etanol ekstraktları daha yüksek inhibisyon oranları gösterdi (Çizelge 4.4.1).

Meyve ekstraktlarının *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığında, S9 yokluğuna göre doza bağlı olarak daha yüksek inhibisyon oranları gösterirken, TA 100 suşu üzerinde ise S9 yokluğunda, S9 varlığına göre 50 mg/ml dozundaki aseton ekstraktı, metanol ekstraklarının tümü ve etanol ekstraktları (0.05 mg/ml dozu hariç) daha yüksek antimutajenik aktivite gösterdi (Çizelge 4.4.2).

Çekirdek ekstraktlarının *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 yokluğunda, S9 varlığına göre etanol ekstraktının 50 ve 5 mg/ml dozlarında ve metanol ekstraklarının 0.5 ve 0.05 mg/ml dozlarında daha yüksek inhibisyon etkisi gösterdi. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 yokluğunda, S9 varlığına göre kloroform ve etanol ekstraktlarında doza bağlı daha yüksek % inhibisyon oranları gözlendi (Çizelge 4.4.3).

Çizelge 4.4.1. *Celtis glabrata* Steven ex Planch yaprak ekstraktlarının farklı dozlarının *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde antimutajenik etkileri.

Suşlar	Yaprak Ekstraktları	Konsantrasyon (mg/plak)	Geriye dönen (revertant) koloni sayısı			
			S9 yokluğunda		S9 varlığında	
			Ortalama±SD	%i nhibisyon	Ortalama±SD	% inhibisyon
TA 98	Negatif Kontrol®	**100 µl/plak**	32+		41+	
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		384+	
	KLOROFORM	**5 mg/plak**	437±437	%25.3	185±23	%58.1
		0.5 mg/plak	455±54	%21.6	240±56	%42.0
		0.05 mg/plak	485±102	%16.0	249±6	%39.4
		0.005 mg/plak	517±10	%10.1	267±53	%34.2
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		290+	
	ASETON	**5 mg/plak**	412±62	%29.5	159±36	%64.7
		0.5 mg/plak	452±101	%22.1	161±16	%51.9
		0.05 mg/plak	470+25	%18.8	201±34	%35.8
		0.005 mg/plak	483±32	%16.4	217±15	%18.9
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		247+	
	METANOL	**5 mg/plak**	268±14	%56.3	124±20	%61.2
		0.5 mg/plak	380±58	%35.5	138±19	%53.0
		0.05 mg/plak	451±22	%22.3	150±25	%47.1
		0.005 mg/plak	470±14	% 18.8	165±24	%39.9
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		276+	
	ETANOL	**5 mg/plak**	399±26	% 32.0	112±18	%69.8
		0.5 mg/plak	406±8	% 30.7	148±21	%54.5
		0.05 mg/plak	435+12	% 25.3	160±74	%49.4
		0.005 mg/plak	456±5	% 21.4	196±28	%34.1
TA 100	Negatif Kontrol®	**100µl/plak**	130+		123+	
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		306+	
	KLOROFORM	**5 mg/plak**	253 ± 116	% 49.4	139±89	%91.8
		0.5 mg/plak	271 ± 34	% 42.0	159±37	%80.77
		0.05 mg/plak	323 ± 67	% 20.6	205±6	%55.5
		0.005 mg/plak	347 ± 32	% 10.7	208±4	%53.85
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		315+	
	ASETON	**5 mg/plak**	141 ± 20	% 95.5	179±50	%71.3
		0.5 mg/plak	272 ± 10	% 41.6	185±18	%61.8
		0.05 mg/plak	337 ± 160	% 14.9	204±13	%58.2
		0.005 mg/plak	367 ± 54	% 2.5	257±15	%30.4
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		387+	
	METANOL	**5 mg/plak**	213 ± 37	% 65.9	209±60	%67.5
		0.5 mg/plak	218 ± 52	% 63.8	269±62	%48.7
		0.05 mg/plak	303 ± 54	% 28.9	364+54	%31.0
		0.005 mg/plak	321 ± 230	% 21.4	379±71	%8.8
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		441+	
	ETANOL	**5 mg/plak**	224 ± 288	%58.9	256±21	%58.4
		0.5 mg/plak	236 ± 211	% 56.4	264±67	%55.9
		0.05 mg/plak	244 ± 79	% 53.1	295±41	%46.1
		0.005 mg/plak	247 ± 102	% 51.9	363±52	%24.7

**S.typhimurium* TA 98 suşu için S9 varlığında kullanılan indirekt mutajen 2-Aminofluoren, S9 yokluğunda kullanılan direkt mutajen 4-nitro-o-fenilendiamine.
©*S.typhimurium* TA 100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda kullanılan direkt mutajen Sodyum azid .
®*S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları için S9 varlığında ve yokluğunda kullanılan negatif kontrol su.
SD: Standart sapma.

Çizelge 4.4.2.*Celtis glabrata* Steven ex Planch meyve ekstraktlarının farklı dozlarının *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde antimutajenik etkileri.

Suşlar	Meyve Ekstraktları	Konsantrasyon (mg/plak)	Geriye dönen (revertant) koloni sayısı			
			S9 yokluğunda		S9 varlığında	
			Ortalama±SD	%i nhibisyon	Ortalama±SD	% inhibisyon
TA 98	Negatif Kontrol®	**100 µl/plak**	32		41	
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		238+	
	KLOROFORM	**5 mg/plak**	360±70	%39.2	147±26	%46.2
		0.5 mg/plak	399±22	%32.0	153±14	%43.2
		0.05 mg/plak	412±20	%29.5	174±2	%32.5
		0.005 mg/plak	457±32	%21.2	227±37	%5.6
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		218+	
	ASETON	**5 mg/plak**	396±13	%32.5	125±22	%52.6
		0.5 mg/plak	415±32	%29.0	129±10	%50.3
		0.05 mg/plak	467±46	%19.3	131±26	%49.2
		0.005 mg/plak	568±5	% 6.0	171±10	%26.6
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		314+	
	METANOL	**5 mg/plak**	311±96	%48.3	140±17	%63.8
		0.5 mg/plak	353±44	%40.5	173±23	%51.7
		0.05 mg/plak	394±102	%32.9	200±67	%41.8
		0.005 mg/plak	434±ظ	%25.5	211±26	%37.8
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		222+	
	ETANOL	**5 mg/plak**	331±34	%44.6	99±58	%68.0
		0.5 mg/plak	345±53	%42.0	104±50	%65.2
		0.05 mg/plak	416±58	%28.8	149±62	%40.4
		0.005 mg/plak	423±15	%27.5	197±22	%13.9
TA 100	Negatif Kontrol®	**100µl/plak**	130+		123+	
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		379+	
	KLOROFORM	**5 mg/plak**	219±51	%63.4	366±65	%55.0
		0.5 mg/plak	235±65	%56.8	106±30	%31.0
		0.05 mg/plak	308±91	%26.8	113±113	%29.5
		0.005 mg/plak	361 ± 43	%5.0	116±11	%30.5
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		628+	
	ASETON	**5 mg/plak**	169±158	%84.0	267±49	%71.8
		0.5 mg/plak	267±254	%43.7	303±55	%64.5
		0.05 mg/plak	335±157	%17.7	461±58	%33.4
		0.005 mg/plak	337±173	%14.9	477±161	%29.9
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		527+	
	METANOL	**5 mg/plak**	181±58	%79.1	373±30	%38.2
		0.5 mg/plak	225±54	%61.0	407±105	%29.8
		0.05 mg/plak	235±43	%56.8	434±42	%23.1
		0.005 mg/plak	323±102	%20.6	466±64	%15.1
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		628+	
	ETANOL	**5 mg/plak**	177±19	%80.7	318±162	%61.4
		0.5 mg/plak	212±80	%66.3	323±63	%60.4
		0.05 mg/plak	213±71	%65.9	406±121	%44.0
		0.005 mg/plak	283±72	%37.1	433±	%38.0

**S.typhimurium* TA 98 suşu için S9 varlığında kullanılan indirekt mutajen 2-Aminofluoren, S9 yokluğunda kullanılan direkt mutajen 4-nitro-o-fenilendiamine.

©*S.typhimurium* TA 100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda kullanılan direkt mutajen Sodyum azid

®*S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları için S9 varlığında ve yokluğunda kullanılan negatif kontrol su.

SD : Standart sapma

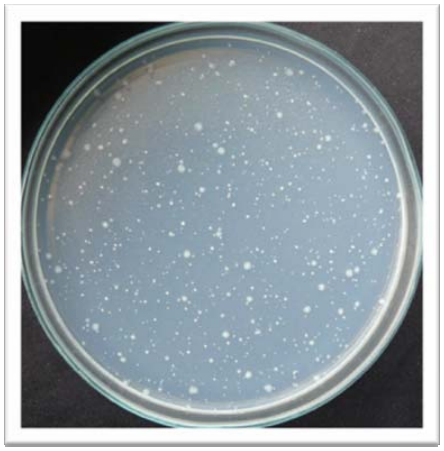
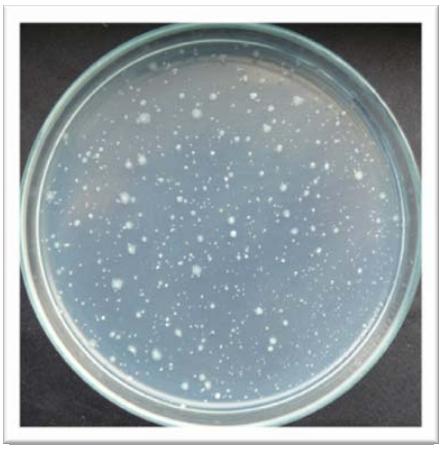
Çizelge 4.4.3. *Celtis glabrata* Steven ex Planch çekirdek ekstraktlarının farklı dozlarının *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde antimutajenik etkileri.

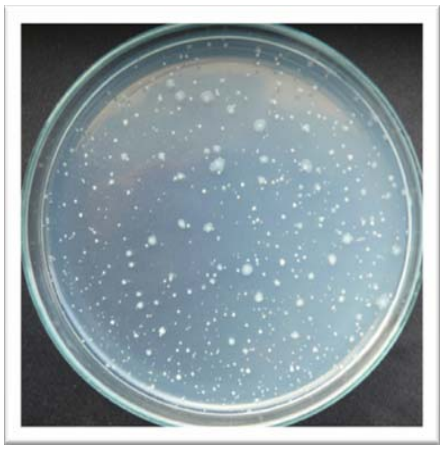
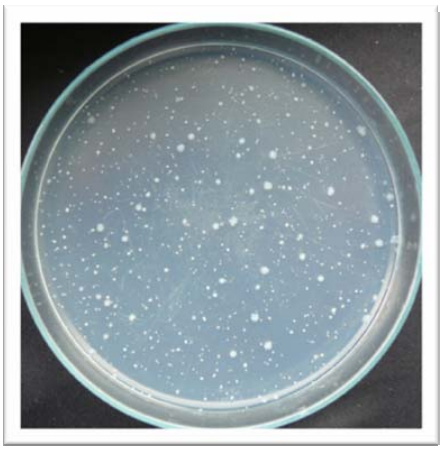
Suşlar	Çekirdek Ekstraktları	Konsantrasyon (mg/plak)	Geriye dönen (revertant) koloni sayısı			
			S9 yokluğunda		S9 varlığında	
			Ortalama±SD	% inhibisyon	Ortalama±SD	% inhibisyon
TA 98	Negatif Kontrol®	**100 µl/plak**	32		41	
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		304+	
	KLOROFORM	**5 mg/plak**	437±201	% 21.1	66±48	%90.5
		0.5 mg/plak	476±164	% 17.7	116±5	%71.5
		0.05 mg/plak	451±56	% 16.7	126±8	%67.7
		0.005 mg/plak	496±57	% 14.0	152±16	%57.8
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		180+	
	ASETON	**5 mg/plak**	451±29	% 22.3	82±2	%70.6
		0.5 mg/plak	494±69	% 14.3	84±16	%69.1
		0.05 mg/plak	510±82	% 11.4	138±36	%30.3
		0.005 mg/plak	528±111	% 8.0	156±62	%17.3
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		130+	
	METANOL	**5 mg/plak**	368±42	% 37.7	98±8	%67.5
		0.5 mg/plak	379±40	% 35.7	108±11	%45.0
		0.05 mg/plak	383±156	% 19.0	126±25	%15.8
		0.005 mg/plak	487±22	% 15.6	140+0	%13.5
	Pozitif Kontrol*	**0.2 mg/plak**	571+		158+	
	ETANOL	**5 mg/plak**	291±19	% 52.0	70±14	%51.3
		0.5 mg/plak	469±28	% 49.1	126±8	%42.8
		0.05 mg/plak	444±107	% 23.6	116±5	%27.4
		0.005 mg/plak	499±71	% 15.3	118+14	%15.4
TA 100	Negatif Kontrol®	**100µl/plak**	130		123	
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		306+	
	KLOROFORM	**5 mg/plak**	165±40	% 85.6	193±15	%74.8
		0.5 mg/plak	168±118	% 84.3	199±6	%72.6
		0.05 mg/plak	204±121	% 69.6	228±28	%62.1
		0.005 mg/plak	207±37	% 68.4	252±70	%53.5
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		315+	
	ASETON	**5 mg/plak**	177±61	% 80.7	185±41	%74.1
		0.5 mg/plak	334±133	% 16.1	191±38	%71.6
		0.05 mg/plak	341±158	% 13.2	195±46	%69.9
		0.005 mg/plak	357±156	% 6.0	208±67	%64.5
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		387+	
	METANOL	**5 mg/plak**	235±53	% 56.8	176±79	%74.2
		0.5 mg/plak	248±49	% 51.5	190±48	%67.4
		0.05 mg/plak	249±62	% 51.1	200±28	%62.5
		0.005 mg/plak	328±14	% 18.6	204±5	%60.5
	Pozitif Kontrol©	**1 mg/plak**	373+		441+	
	ETANOL	**5 mg/plak**	189±43	% 75.8	193±60	%53.7
		0.5 mg/plak	211±12	% 66.7	233±6	%27.2
		0.05 mg/plak	308±131	% 36.3	240±38	%22.6
		0.005 mg/plak	285±86	% 26.8	248±32	%17.3

**S.typhimurium* TA 98 suşu için S9 varlığında kullanılan indirekt mutajen 2-Aminofluoren, S9 yokluğunda kullanılan direkt mutajen 4-nitro-o-fenilendiamine.
©*S.typhimurium* TA 100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda kullanılan direkt mutajen Sodyum azid .

®*S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları için S9 varlığında ve yokluğunda kullanılan negatif kontrol su.

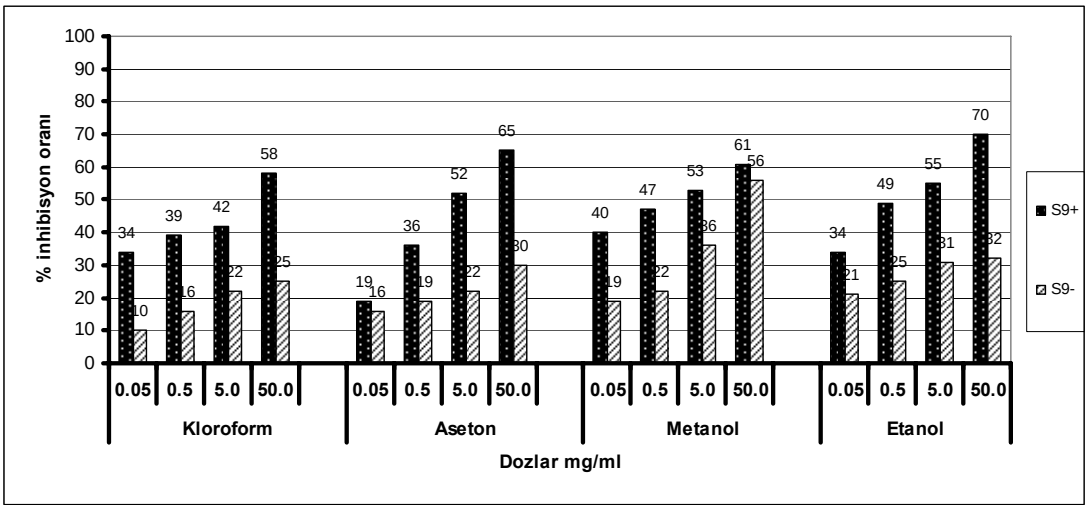
SD: Standart sapma

a)  b) 

c)  d) 

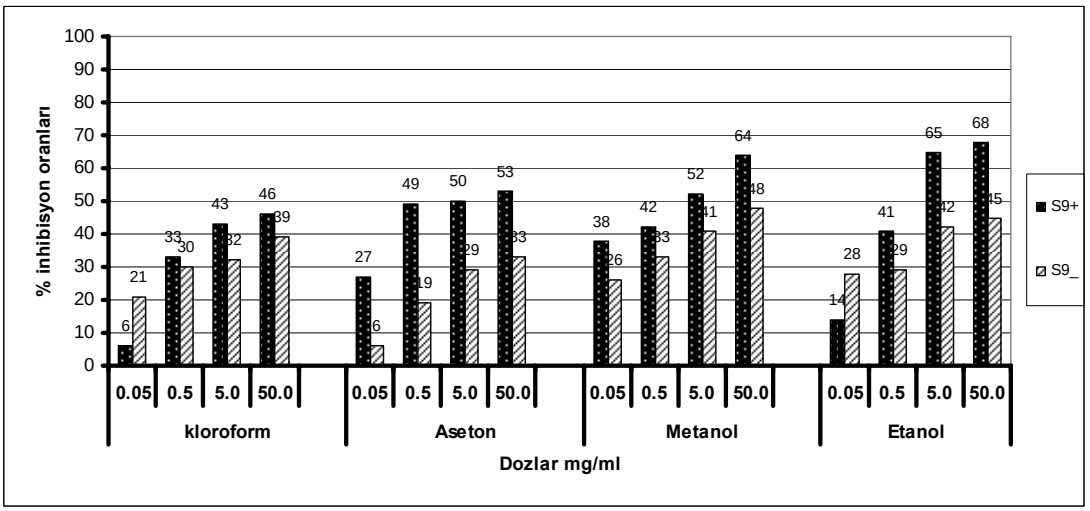
Şekil 4.4.1. *Celtis glabrata* Steven ex Planch çekirdek ekstraktlarının 50 mg/ml dozunda *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığında antimutajenik etkileri a) Kloroform b) Aseton c) Metanol d) Etanol.

Yaprak ekstraktlarının 50 mg/ml dozları *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve S9 varlığında sırasıyla en yüksek inhibisyon oranlarını etanol (% 70), aseton (% 65), metanol (% 61) ve kloroform (% 58) ektraktları, S9 yokluğunda ise metanol ekstraktı (% 56) gösterdi (Şekil 4.4.2).



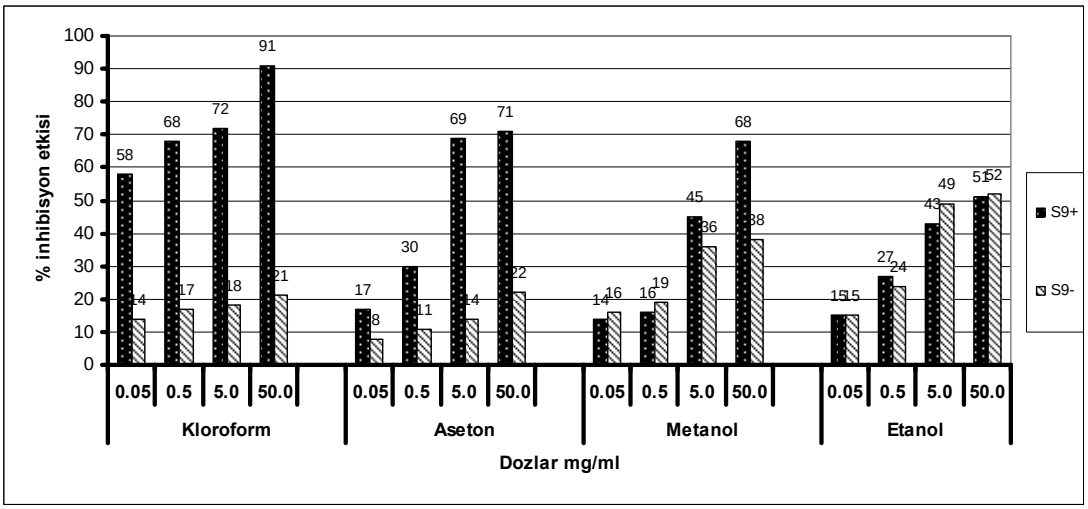
Şekil 4.4.2. *Celtis glabrata* Steven ex Planch yaprak ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları.

Meyve ekstraktlarının 50 mg/ml dozları *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve S9 varlığında sırasıyla en yüksek inhibisyon oranları etanol (% 68), metanol (% 64), aseton (% 53) ve kloroform (% 46), S9 yokluğunda ise metanol (% 48)ve etanol (% 45) ekstraktları gösterdi (Şekil 4.4.3).



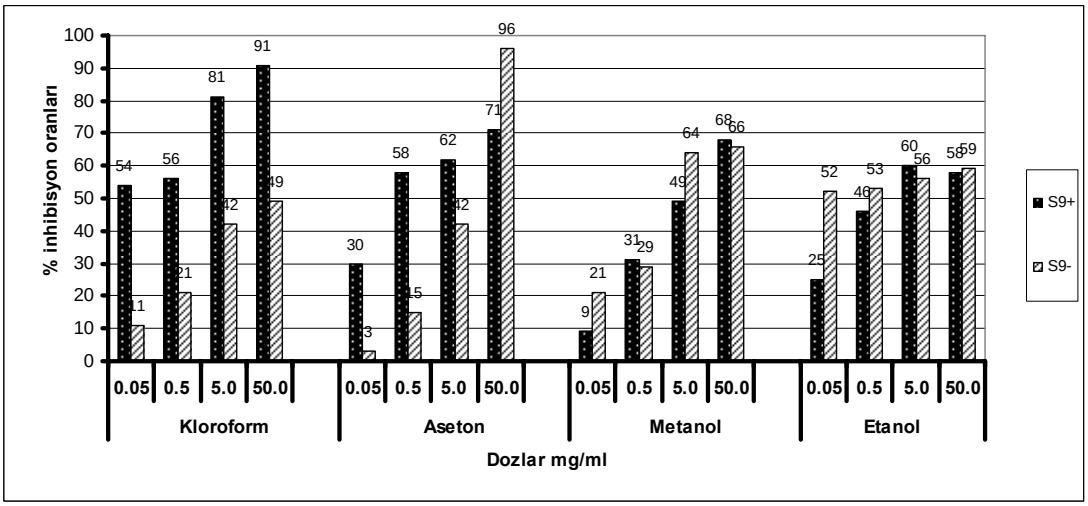
Şekil 4.4.3. *Celtis glabrata* Steven ex Planch meyve ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları.

Çekirdek ekstraktlarının 50 mg/ml dozları *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve S9 varlığında en yüksek inhibisyon oranını kloroform (% 91) ve en düşük inhibisyon oranı ise etanol (% 51) ekstraktları, S9 yokluğunda ise en yüksek etonal (% 52) ve en düşük kloroform (% 21) ekstraktları gösterdi (Şekil 4.4.4).



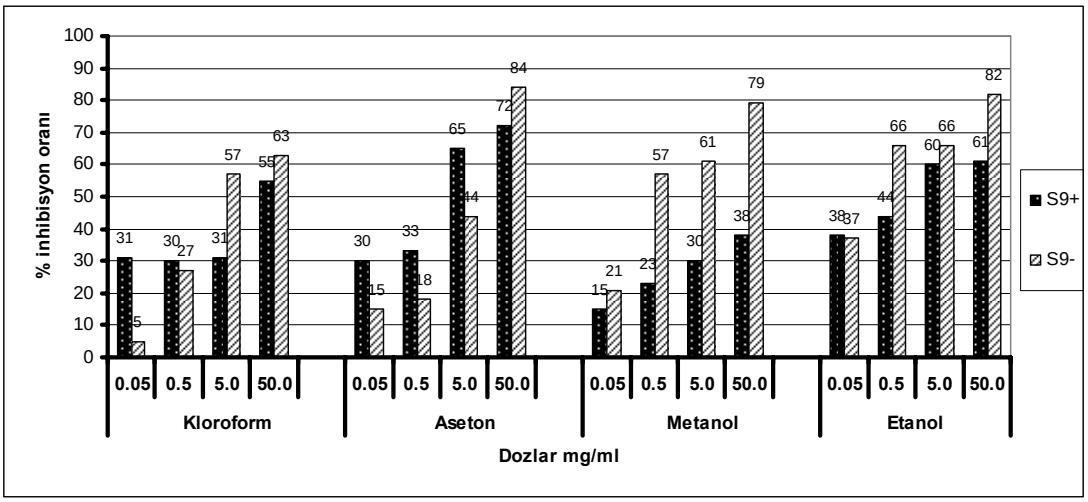
Şekil 4.4.4. *Celtis glabrata* Steven ex Planch çekirdek ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları.

Yaprak ekstraktlarının 50 mg/ml dozları *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde ve S9 varlığında sırasıyla en yüksek inhibisyon oranlarını kloroform (% 91) ekstraktı, S9 yokluğunda ise en yüksek inhibisyon oranı aseton (% 96) ekstraktı gösterdi (Şekil 4.4.5).



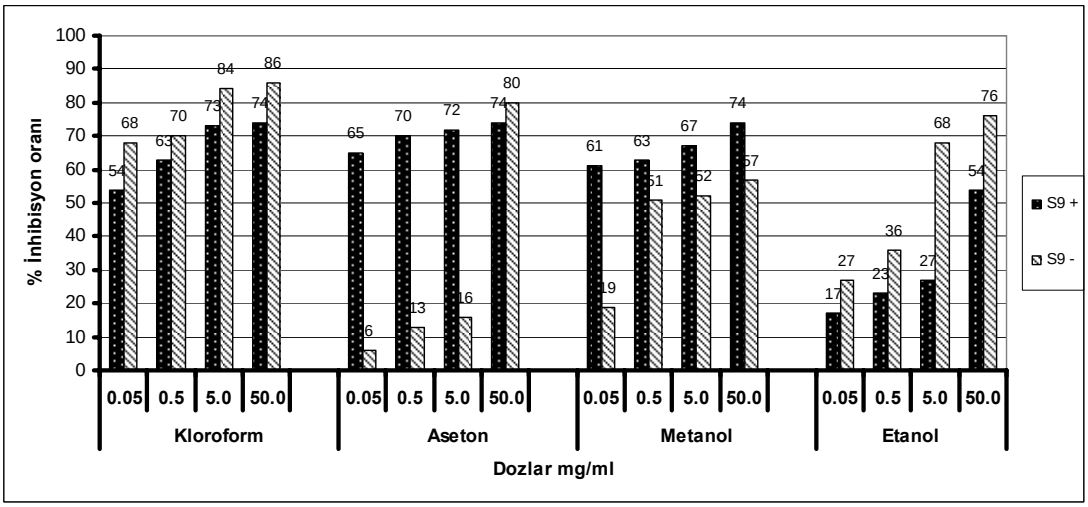
Şekil 4.4.5. *Celtis glabrata Steven ex Planch* yaprak ekstraktlarının *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları.

Meyve ekstraktlarının 50 mg/ml dozları *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde, S9 varlığında ve yokluğunda en yüksek inhibisyon oranlarını aseton ekstraktı (% 72, % 84) gösterdi (Şekil 4.4.6).



Şekil 4.4.6. *Celtis glabrata Steven ex Planch* meyve ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları.

Çekirdek ekstraktlarının 50 mg/ml dozları *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde, S9 varlığında ve yokluğunda sırasıyla en yüksek inhibisyon oranlarını kloroform ekstraktı (% 74, % 86) gösterdi (Şekil 4.4.7).



Şekil 4.4.7. *Celtis glabrata Steven ex Planch* çekirdek ekstraktlarının *S.typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğundaki antimutajenik inhibisyon oranları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu, S9 varlığında ortalama 41 revertant koloni, S9 yokluğunda ise 32 revertant koloni oluşturdu. TA 100 suşu ise sırası ile 123 ve 130 revertant koloni oluşturdu (Çizelge 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3). Ames'e (1972) göre mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (Spontan) his (-) durumundan his (+) durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 30–50 revertant/plak; TA 100 için 75–200 revertant/plaktır. Çalışmamızda belirlenen revertant koloni sayıları uygun değerde bulundu. Revertan koloni sayıları; sayım için kullanılan MGA bileşimine giren glukoz–6-fosfat, β-NADP, fosfat tamponu, glukoz ve tuz çözeltisinin derişimi, plaklardaki MGA'ın hacmi, top agarın miktarı ve yayılma şekli, ortamdaki hava sirkülâsyonu ve sıcaklığı, etüvdeki nem oranı, S9 fraksiyonunun miktarı gibi farklılıklardan dolayı değişebilmektedir (Çizelge 3.2.7 ve Şekil 3.2.7).

Samant (1997), *Celtis australis*'in % 45.8 azotsuz organik bileşikler ve % 20.2 ham lifleri içerdiğini, aynı familyadan olan ve çalışmamızda kullanılan *Celtis glabrata* ile ilgili kimyasal analiz sonuçları bulunmadığından, bu bitki ekstraktlarının antimutajenik aktiviteleri dominant bileşikler olarak belirlenmiş bulunan azotsuz organik bileşiklere ve ham lif maddelerine bir yönü ile bağlı olabileceği düşünüldü.

Abdelwahed ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada; flavonoidlerin AFB1 'nin etkisinin doza bağlı olarak önemli derecede azaldığını bu etkinin TA 98 suşa kullanıldığında, TA 100 suşuna göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda denediğimiz çekirdek kloroform ekstraktının *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde TA 100 'e göre doza bağlı daha güçlü antimutajenik etki gösterdiği belirlendi. Bu etkinin kullandığımız kloroform'un, diğerlerinin çözemediği flavonoidleri çözebilme özelliğinden kaynaklandığı (Cowan 1999) düşünüldü (Çizelge 4.4.3).

Çalışmamızda *Cetlis glabrata* bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek kloroform ekstraktlarının *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde (S9 varlığında), indirekt mutajen 2-Aminofluoren'nin mutajenik etkisini inhibe ederek güçlü antimutajenik aktivite gösterdiklerik fakat S9 yokluğunda direkt mutajen 4-nitro -o-fenilendiamin'nin mutajenik etkisini güçlü şekilde inhibe etmedikleri belirlendi. Natake ve ark. (1989), *Anethum graveolens* (dereotu) ve *Salvia officinalis* (adaçayı) su ekstraktlarının *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde (S9 varlığında), indirekt mutajen Trp-P-2'in mutajenik etkisini % 90 oranında inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bu sonuç, çalışmamızda çekirdek kloroform ekstraktlarının (50 mg/ml) gösterdiği % 90.5 inhibisyon oranı ile

benzerlik gösterdi (Çizelge 4.4.3). Yamada ve Tomita'da (1994), yarı fermente çayların *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde indirekt mutajenlere karşı antimutajenik aktivitesini % 58-100 ve direkt mutajenlere karşı antimutajenik aktivitesini ise % 29-33 oranında belirlemişlerdir. Çalışmamızda denen ekstraktların *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve indirekt mutajenlerin varlığında, direkt mutajenlerin varlığına göre daha güçlü antimutajenik aktivite gösterdikleri belirlendi (Çizelge 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3).

Çalışmamızda kullandığımız ekstraktların S9 yokluğunda, TA 98 suşu üzerinde gösterdikleri antimutajenik inhibisyon oranları, TA 100 göre daha düşük bulundu. Bu da çerçeve kayması mutasyonuna sahip olan suşun (TA 98), baz değişikliği mutasyonuna (TA 100) sahip olan suşa göre daha kararlı olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3). Bu sonuç Wu ve ark. (2007)'nın çeşitli çay ekstraktlarının (S9 yokluğunda) *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde gösterdikleri antimutajenik inhibisyon oranlarının TA 100 'e göre daha düşük olduğunu belirleyen çalışmalarına benzerlik gösterdi.

Celtis glabrata meyve ekstraktlarının direkt mutajen sodyum azid'in *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerinde ve S9 yokluğunda mutajenik etkisine karşı, antimutajenik aktivitesi aseton, etanol, metanol ve kloroform sırasına göre bulundu. 5 mg/plak konsantrasyonda tüm ekstraktlar güçlü aktimutajenik aktivite gösterdi. Jayaprakasha ve ark. 2007, *Cinnamomun zeylanicum* (Tarçın) meyve ekstraktlarının direkt mutajen sodyum azid'in *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerindeki mutajenik etkisine karşı, antimutajenik aktivitesini su, aseton, metanol ve etilasetat sırasına göre bulmuş ve tüm ekstraktların 5 mg/plak konsantrasyonda güçlü antimutajenik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada aseton ve metanol ekstraktlarının % verimlilik oranları ile antimutajenik aktivitelerinin ters orantılı olması ve 5 mg/ml konsantrasyonda güçlü antimutajenik aktivite göstermiş olmaları, belirlediğimiz sonuçlarla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.2, 4.4.2).

Celtis glabrata çekirdek ekstraktlarının direkt mutajen sodyum azid'in *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 yokluğunda ve varlığındaki mutajenik etkisine karşı, kloroform ekstraktı aseton ekstraktına göre daha güçlü antimutajenik aktivite gösterdiği ve her iki ekstraktın 5 mg/plak dozlarında güçlü antimutajenik aktiviteye sahip bulunduğu belirlendi. Jayaprakasha ve ark. (2006), *Garcinia pedunculata* meyve kabuğu ekstraktlarının direkt mutajen sodyum azid'in *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerindeki mutajenik etkisine karşı, hekzan ekstraktının kloroform ekstraktına göre daha yüksek antimutajenik aktivite gösterdiğini

tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, meyve kabuğu hekzan ve kloroform ekstraktlarının apolar özelliklerine paralel antimutajenik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bu bulgu çalışmamızda elde edilen sonuçları desteklemekte ve apolar özelliği kuvvetli olan çözücü ekstraktlarının daha güçlü antimutajenik aktiviteye neden olduğunu kanıtlamaktadır (Çizelge 4.4.3).

Celtis glabrata bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek kısımlarının kloroform, aseton, metanol ve etanol ekstraktlarının tümü önemli derecede antimutajenik aktiviteye sahip oldukları ve bu bitki kısımları içerisinde de çekirdek ektraktlarının antimutajenik inhibisyon oranlarının diğer ekstraktlara kıyasla daha yüksek olduğu tespit edildi (Çizelge 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3).

Sonuç olarak antimutajenik aktivite yönünden yaprak apolar ve polar ekstraktları, *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde yakın değerlerde antimutajenik aktivite gösterirken, *Salmonella typhimurium* TA100 suşu üzerinde apolar ekstraktların daha güçlü antimutajenik aktivite gösterdikleri belirlendi. Meyve polar ekstraktlarının apolar ekstraktlara göre, *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde daha güçlü antimutajik aktivitesi belirlendi. Çekirdek apolar ekstraktlarının polar ekstraktlara göre, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde daha güçlü antimutajenik aktiviteye neden oldukları tespit edildi ve çekirdeğinin öğütülerek kullanılmasının antimutajenik aktivite yönünden sağlığa yararlı olabileceği sonucuna varıldı (Çizelge 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3).

6. KAYNAKLAR

Abdelwahed, A., Skandrani, I., Kilani, S., Neffati, A., Sghaier, M. B., Bouhlel, I., Boubaker, J., Ammar, R. B., Mahmoud, A., Ghedira, K., ve Chekir-Ghedira L., 2008, Mutagenic, Antimutagenic, Cytotoxic, and Apoptotic Activities of Extracts from *Pituranthos tortuosus,* Drug and Chemical Toxicology*,* 31,37–60*,* Copyright

Abdullaev, F. I., Riveron-Negrete, L., Caballero-Orgeta, H., Hernandez, J. M., Perez-Lopez, I., Pereda-Miranda, R., Espinosa-Aguirre, J. J., 2003, Use of in vitro assay to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). Toxicology in Vitro, 17, 731-736.

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

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

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

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

Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. D., 1973-a, Carcinogens are mutagens: A Simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 70, 2281-2285.

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

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

Başer, K. H. C., 1997, Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin İlaç ve Alkollü İçki Sanayilerinde Kullanımı. Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi (TBAM), İstanbul Ticaret Odası, Yayın no: 39, İstanbul.

Baytop, T., 1999, Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), 2. Baskı, Nobel Kitabevi, İstanbul.

Beudot, C., De Me´o, M. P., Dauzonne, D., Eliasc, R., Laget, M., Guiraud, H., Balansard, G., Dume´nil, G., 1998, Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames Test. Mutation Research, 417, 141-153.

Birt, DF., Walker, B., Tıbbels, MG., and Bresnick, E., 1986. Antimutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol. Carcinogenesis, 7(6):959-63.

Chai,Y., Q.Luo., M. Sun., H. Corke., 2004, Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. Life Sciences. 74: 2157-2184.

Cowan M. M., 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents, clınıcal mıcrobıology revıews, American Society for Microbiology. All Rights Reserved, 12:4, 564–582.

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

Dean, B. J., Brooks, T. M., Hodson –Walker., G., Hutson, D. H., 1985, Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. Mutation Research, 153, 57-77.

Dığrak, M., İlçim, A., Alma, M.H., 1999, Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia, Juniperus oxycedrus, Abies cilicia, Cedrus libani* and *Pinus nigra*. Phytotherapy Research, 13, 584-587.

Ergezer, H., Çam, M., 2008, Tanenler: Sınıflandırma, Yapıları ve Sağlık Üzerine Etkileri, Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.

Evandri, MG., Battınellı, L., Danıele, C., Mastrangelo, S., Bolle,P., and Mazzantı, G., 2005, The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. Food Chem. Toxicol., 43(9),1381-7.

Galati, G.,O'Brien, J.P., 2004, Potential toxicity of flavonoıds and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. Free Radical Biology ve Medicine, 37(3), 287-303.

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

Ham, S., Kim, S.H., Moon, S.Y., Chung, M.J., Cui, C.B., Han, E.K., Chung, C.K., Choe, M. 2009, "Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) Extract", Mutation Research 672, 55–59.

Hayder, N., Skandrani, I., Kilani, S., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Ben Ammar, R., Mahmoud, A., Ghedira, K., Ghedira L. 2008, Antimutagenic activity of *Myrtus*

communis L. using the Salmonella microsome assay, South African Journal of Botany 74, 121–125.

Hofnung, M., Quillardet, P., 1986, Recent developments in bacterial short-term for the detection of genotoxic agents. Mutagenesis, 1(5), 319-330.

Jorgensen, K.V. Clayton, J.W. and Price, R.L., 1987, Evaluation of aflotoxin B mutagenesis: Glutathione-S-transferase to the *Salmonella* mutagenicity assay. Environ. Mutagen., 9, 411-419.

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.

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.

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.

İpek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tüylü, B., Kürkcüoglu, M., Can Baser, K.H., 2005, "Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test", Food Chemistry, Vol.93, pp.551-556.

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

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

Kalaycıoğlu, A., Öner, C., 1997, Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimutajenik Etkilerinin Amest- Salmonella Test Sistemi ile Araştırılması. Tr. Botany, 18, 117-122.

Kaur, S., Arora, S., Kaur, K., Kumar, S., 2002, The in vitro antimutagenic activity of Triphala- an Indian herbal drug. Food and Chemical Toxicology, 40, 527-534.

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

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

Lien, E.J., and Li, W.Y., 1985, Structure Activity Relationship Analysis of Anti-Cancer Chinese Drugs and Related Plants. Long Beach, CA: Oriental Healing Arts Institute.

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

Natake, M., Kanazaura,K., Mizuno, M., Veno, N., Kobayaski, T., Danno,G., and Minamoto, S., 1989, Herb-water exacts makely surpess the Mutagenicity of Trp-P-2 ,Agricultural and Biogical Chemıstry 53 (5), 1423-1425.

Nakasugi,T., Nakashima, M., Komait, K., 2000, Antimutagens in Gaiyou (*Artemisia argyi* Levl. et Vant.). J. Agric. Food Chem., 48, 3256-3266.

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

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

Nogueira, AC., Carvalho, RR., Souza, CA., Chahoud, I., and Paumgartten, FJ., 1995, Study of enbryofeto-toxicity of citral in the rat. Toxicology, 96, 105-113.

Maron, D.M., Ames, B.N., 1983, "Revised methods for the mutagenicity test", Mutation Research, 113, 173-215.

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.

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

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

Öksüzoğlu, E., Diril, N., Durusoy, M., 2000, Mutagenic effects of plants growth hormones with the Salmonella/microsome test and the SOS chromotest.Bull. Environ. Contam. Toxicol., 65, 691-698.

Özbek, T., Güllüce, M., Şahin, F., Sevsay, S., Barış, Ö., 2008, Investigation of the Antimutagenic Potentials of the Methanol Extract of Origanum vulgare L. Subsp. vulgare in the Eastern Anotolia Region of Turkey. Turk Journal of Biological.

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

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

Raucher, R., Edenharder, R., 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.

Rovado, T., Vicentini, V.E.P., Mantovani, M.S., 2004, Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes in vitro. Toxicology in Vitro, 18(5), 617-22.

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.

Santhosh, K.T.,Swarnam, J., Ramadasan, K., 2005, Potent suppressive effect of gren tea polyphenols on tobacco-induced mutagenicity. Phytomedicine, 12, 216-220.

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

Sotto, A. D., Vitalone, A., Nicoletti, M., Piccin, A., Mazzanti, G. 2010, "Pharmacological and phytochemical study on a *Sisymbrium officinale Scop*. Extract", Journal of Ethnopharmacology 127 , 731–736.

Sökmen, A., Jones, B.M., Ertürk, M., 1999, The *in-vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants. Journal of Ethnopharmocology, 67, 79-86.

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

Toroğlu, S., Çenet, M., 2006, Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi. 9 (2).

Uyar, T., 1992, Organik Kimya. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü.

Yamada, J. ve Tomita, Y., 1994, Antimutagenic activity of water Extracts of black tea and oolong tea, Bioscıence, Biotechnology and Biochemistry, 58 (12), 2197-2200

Wenzel, U., Nickel,A., Kuntz, S., Daniel, H., 2004, Ascorbic asid suppresses druginduced apoptozis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. Carcinogenesis, 25,703-712.

Wu S., Yen G., Wang B.,Chiu C., Yen W., Chang L., Duh P., 2007, Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea, www.sciiencedirect.com.