

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARIN ANTİGENOTOKSİK
AKTİVİTESİNİN *DROSOPHILA* KANAT SOMATİK MUTASYON VE
REKOMBİNASYON TESTİ (SMART) İLE ARAŞTIRILMASI**

AYGÜL KILIÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA
2008**

Tezin Başlığı : Bazı Beyaz Çürükçül Fungusların Antigenotoksik Aktivitesinin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) İle Araştırılması

Tezi Hazırlayan : Aygöl KILIÇ

Sınav Tarihi : 21 Temmuz 2008

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Murat ÖZMEN (Başkan)




Prof. Dr. Elif YEŞİLADA (Danışman)

Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL (Üye)



Prof. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘Bazı Beyaz Çürükçül Fungusların Antigenotoksik Aktivitesinin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi İle Araştırılması’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yaralandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.



Aygül KILIÇ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARIN ANTİGENOTOKSİK AKTİVİTESİNİN *DROSOPHILA* KANAT SOMATİK MUTASYON VE REKOMBİNASYON TESTİ (SMART) İLE ARAŞTIRILMASI

AYGÜL KILIÇ

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

57 + viii

2008

Danışman: Prof. Dr. Elif YEŞİLADA

Araştırmalar, bazı besinlerin antigenotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, *Trametes versicolor* ve *Pleurotus ostreatus* beyaz çürükçül funguslarının genotoksisite üzerinde azaltıcı etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla somatik mutasyon ve rekombinasyonu ölçen ve *in vivo* bir çalışma olan *Drosophila* kanat benek testi (SMART) kullanıldı. Bir mutajen olan Mitomisin C (MMC)'ye karşı beyaz çürükçül fungusların antigenotoksik etkisi araştırıldı.

Çalışmalar sonucunda *T.versicolor* ve *P. ostreatus* tozlarının MMC tarafından oluşturulan DNA hasarını baskılayabileceği saptandı. *T.versicolor* ve *P. ostreatus* MMC tarafından oluşturulan somatik hücre mutasyonunu baskılayabilmektedir.

Bu sonuçlar, *T.versicolor* ve *P. ostreatus* funguslarının antirekombinojenik aktivite ile antigenotoksik aktiviteli faktörleri içerdiğini öne sürmüştür. Elde edilen verilerden özellikle *T.versicolor*' ın birtakım antigenotoksik faktör(ler) içerdiği ve olasılıkla da bunların polisakkaropeptit formunda olduğu düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Antigenotoksisite, *Drosophila melanogaster*, SMART test, beyaz çürükçül fungus, mitomisin-C.

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF SOME OF THE WHITE ROT FUNGI IN *DROSOPHILA* WING SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST (SMART)

AYGÜL KILIÇ

Department of Biology
Institute of Natural Sciences
Inonu University

57+ viii pp.

2008

Supervisor: Prof. Dr. Elif YEŞİLADA

Studies have shown that certain foods contain with antigenotoxic activities. Here, we ask if dried powders from two white rot fungi, *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*, have a mitigating effect on genotoxicity. We used *in vivo* assay: *Drosophila* wing spot test (also known as SMART) which measures somatic mutation and recombination. A mutagen were tested with the mushroom powders: Mitomycin-C (MMC). We found that *T. versicolor* and *P. ostreatus* powders can suppress DNA damage induced by MMC we tested. *T. versicolor* and *P. ostreatus* powders were able to suppress somatic cell mutation induced by MMC.

These results suggest that *T.versicolor* and *P.ostreatus* mushrooms contain factors with antigenotoxic activity, including anti-recombinogenic activity. The data suggest that there is a novel antigenotoxic factor(s) in *T.versicolor*, possibly in the form of polysaccharopeptides.

KEYWORDS: Antigenotoxicity, *Drosophila melanogaster*, SMART test, white rot fungus, mitomycin-C (MMC)

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında ve hazırlanmasında gerek deneysel gerekse teorik çalışmalarımın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgmeden beni yönlendiren çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif YEŞİLADA'ya;

Projeyi (2007/34) destekleyen İnönü Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Fonu'na;

Deneysel çalışmalarım boyunca fikir ve önerileri ile yardımcı olan ve laboratuvar çalışmalarımda her türlü kolaylığı gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e;

Çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteklerini gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya;

Çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan ve manevi desteğini hep üzerimde hissettiğim değerli hocam Sayın Doç. Dr. Dilek ASMA'ya;

Tezin deneysel aşamalarında bana yardımcı olan ve yardımlarını hiç eksik etmeyen hocalarım Arş. Grv. Eylem Eroğlu DOĞAN'a ve Arş. Grv. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye;

Çalışmalarımda bana hep destek olan Araştırma Görevlisi arkadaşlarım Filiz KURU ve Duygu ÖZHAN'a,

Ve...

Tüm yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, bana olan desteklerini, güvenlerini ve sonsuz sevgilerini hep üzerimde hissettiğim, varlıklarıyla benim daha güçlü olmamı ve hayata daha sıkı tutunmamı sağlayan canım annem, babam ve kardeşime,

en içten dileklerimle teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TESEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Beyaz Çürükçül Funguslar	2
1.1.1. Bazı Beyaz Çürükçül Funguslardan Elde Edilen Bileşenler ve Etkileri.....	3
1.1.2. Tıbbi Önemi Olan Bazı Beyaz Çürükçül Funguslar.....	5
1.2. Çalışmanın Amacı.....	7
1.3. Çalışmada Kullanılan Organizmalar İle İlgili Genel Bilgiler.....	8
1.3.1. <i>Trametes versicolor</i> ve <i>Pleurotus ostreatus</i>	8
1.3.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.3.2.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Sistematikteki Yeri	10
1.3.2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Yaşam Döngüsü.....	11
1.3.2.3. Yumurta.....	12
1.3.2.4. Larva.....	13
1.3.2.5. Pupa.....	13
1.3.2.6. Ergin.....	14
1.4. Genetik Toksikolojide Kullanılan Testler.....	14
1.4.1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART).....	15
1.4.1.1. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi.....	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
2.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Antigenotoksik Etkileri ile İlgili Yapılan Çalışmalar... ..	19
2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> ile Yapılan Antigenotoksikite Çalışmaları.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Çalışmada Kullanılan Beyaz Çürükçül Funguslar.....	26
3.2. Çalışmada Kullanılan Beyaz Çürükçül Fungusların Üretimi ve Saklanması.....	26
3.3. Çalışmada Kullanılan Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması.....	26
3.4. Fungus Peletlerinin Üretilmesi.....	26
3.5. Fungus Peletlerinin Kurutulması.....	27
3.6. Çalışmada Kullanılan <i>Drosophila melanogaster</i> soyları.....	27
3.7. Çalışmada Kullanılan Çapraz.....	27
3.8. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	28
3.9. Deney Koşulları.....	28
3.9.1. Besiyerinin Hazırlanması.....	28
3.9.2. Bayıltma Yöntemi.....	29
3.9.3. Mitomisin C (MMC)'nin Hazırlanması ve Besiyerine Eklenmesi.....	30
3.9.4. Kurutularak Toz Haline Getirilmiş Fungus Peletlerinin Besiyerine Eklenmesi.....	30
3.10. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinin Uygulanması.....	30
3.11. SMART Testi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
4.1. <i>Drosophila</i> Kanat Benek Testinden Elde Edilen Bulgular.....	32
4.1.1. Mitomisin C'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	32
4.1.2. Fungusların Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	34

4.1.2.1.	<i>Trametes versicolor</i> 'ın Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	34
4.1.2.2.	<i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	36
4.1.3.	<i>Trametes versicolor</i> 'ın MMC'ye Karşı Antigenotoksik Etkisinin Karşılaştırılması...	37
4.1.4.	<i>Pleurotus ostreatus</i> 'un MMC'ye Karşı Antigenotoksik Etkisinin Karşılaştırılması...	39
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	44
6.	KAYNAKLAR	51
7.	ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>Trametes versicolor</i> (Şapka formu).....	9
Şekil 1.2.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Şapka formu).....	9
Şekil 1.3.	<i>T.versicolor</i> 'ın sıvı besiyerinde çalkalamalı inkübasyon sonucunda oluşan pelet formu.....	9
Şekil 1.4.	<i>Drosophila melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü.....	12
Şekil 1.5.	Tekli ve ikili beneklerin oluşumuna neden olan farklı genotoksik olayları gösteren genetik mekanizmalar.....	18
Şekil 4.1.	Farklı dozlarda MMC uygulanan (<i>mwh flr⁺/mwh⁺ flr3</i>) larvalarda çeşitli benek tiplerinin doza bağlı olarak indüksiyonu.....	34
Şekil 4.2.	Farklı miktarlarda <i>T.versicolor</i> tozu içeren gruplarda kanat başına düşen benek sayılarının karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.3.	Farklı miktarlarda <i>P.ostreatus</i> içeren gruplarda kanat başına düşen benek sayılarının karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.4.	MMC (0.05mM) ile birlikte uygulanan <i>T.versicolor</i> 'ın farklı dozlarının (7.5mg, 15mg ve 30mg) varlığında gözlenen çeşitli benek tiplerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 4.5.	MMC (0.05mM) ile birlikte uygulanan <i>P.ostreatus</i> 'un farklı dozlarının varlığında (7.5mg, 15mg ve 30mg) gözlenen çeşitli benek tiplerinin karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.6.	0.05mM MMC ile birlikte, <i>T.versicolor</i> ve <i>P.ostreatus</i> 'un farklı dozlarının (7.5mg, 15mg ve 30mg) uygulanması sonucu gözlenen toplam benek sayılarının karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.7.	<i>T.versicolor</i> ve <i>P.ostreatus</i> 'un farklı dozlarının (7.5mg, 15mg ve 30mg) uygulanması sonucu gözlenen MMC tarafından indüklenen kanat başına düşen toplam benek sayılarını inhibe etme yüzdelerinin karşılaştırılması.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	<i>Drosophila</i> besiyerinin içeriği.....	29
Çizelge 3.2.	<i>Drosophila</i> besiyerinden kullanılan asit karışımı.....	29
Çizelge 4.1.	MMC gruplarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	33
Çizelge 4.2.	<i>T.versicolor</i> gruplarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	35
Çizelge 4.3.	<i>P.ostreatus</i> gruplarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	36
Çizelge 4.4.	MMC+ <i>T.versicolor</i> gruplarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	38
Çizelge 4.5.	MMC+ <i>P.ostreatus</i> gruplarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	40

1. GİRİŞ

Genetik materyalin yapısında meydana gelen spontan veya indüklenabilir değişikliklere mutasyon, mutasyon etkisi yapan kimyasal ve fiziksel faktörlere ise mutajen denir. Mutasyonların hedefi, RNA virüsleri ve RNA mutasyonları hariç tutulduğunda, genellikle DNA molekülüdür [1]. Mutajenler, gelecek nesillerde bir takım genetik hataların meydana gelmesini ve kanser oluşumunu da içeren somatik hücre hasarlarının ortaya çıkmasını arttırdığı için oldukça önemlidir. Bilindiği gibi herhangi bir kimyasal maddenin organizmada oluşturduğu toksik etki, genetik materyalde değişime neden oluyorsa, meydana gelen bu etkiye genotoksik etki denir [2]. İnsan hücreleri sürekli olarak çeşitli biyotik ve abiyotik faktörler tarafından oluşan reaktif oksijen radikallerine maruz kalmaktadır. Bunun sonucunda da nukleik asitlerin, proteinlerin, lipidlerin ve karbonhidratların oksidasyonu sonucu DNA hasarıyla ilişkili hastalıklar ortaya çıkabilmektedir [3]. Bu bağlamda bu etki genetik toksikolojinin ana konusudur [4]. Kısaca DNA’da hasar olarak tanımlanan genotoksik etki, kanser başlatıcı bir mekanizma olarak da kabul edilmekte ve genetik toksikolojinin ana konusunu oluşturmaktadır. Geliştirilen çeşitli yöntemler ile DNA’daki hasarın belirlenmesi ileride oluşacak kanser olaylarında riskin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir [2].

Besinler ile alınan birçok bileşen, karsinojenlerin oluşturduğu genotoksik etkiyi azaltmakta ve antigenotoksik etki göstermektedir [5,7]. Bu bağlamda son yıllarda özellikle funguslardan elde edilen ve biyolojik olarak aktif olan çeşitli bileşenler antigenotoksik etki göstermektedir [8]. Dolayısıyla çeşitli mutajenlerin etkisine bağlı olarak ortaya çıkan genotoksik etki, bu fungusların antigenotoksik etkisine bağlı olarak azalmaktadır. Fungusların bu etkisini ya direkt olarak mutajenle etkileşerek ya da mutajenin etkisini yok ederek gösterdiği belirtilmektedir [8]. Özellikle pek çok beyaz çürükçül fungus antigenotoksik etkiye sahip olması bakımından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca bu funguslar antioksidan özelliğe sahip olan bileşenleri de içermektedirler. Fungusların antigenotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmalar, fungusta bulunan bileşenlerin kimyasal yapılarını ve izolasyon yöntemlerini içermektedir [9].

Pek çok fungus lezzetli ve besleyici bir gıda olarak değerlendirilmekte, benzersiz tat ve kokuları ile gıdalara lezzet verici olarak eklenmektedir. Özellikle sahip oldukları karbonhidrat, yağ, protein ve lipid gibi biyokimyasal bileşenlerinden ötürü yıllardır besin olarak tüketilmektedirler [10,11]. Ayrıca K, Na, Mg, Ca, Se ve P gibi elementler yanında

vitamin D ve vitamin C başta olmak üzere çeşitli vitaminler bakımından da oldukça zengindirler [12]. Bütün bu özelliklerinin dışında fungusların büyük bir kısmı özellikle bağışıklık sistemini düzenleyici etki gösteren çeşitli biyopolimerleri de içerirler. Bu bağlamda bu fungusların yapısında bulunan;

- Steroidler,
- Triterpenler,
- Suda çözünebilir ligninler,
- Sülfatlı ve protein bağlı polisakkaritler,
- Oksalik asit ve linoleik asit gibi bileşenler antimikrobiyal ve antiviral ajan olarak yoğun bir biçimde araştırılmaktadır [13-14].

Özellikle de beyaz çürükçül funguslardan elde edilen ve biyolojik olarak aktif olan bu bileşenler tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadırlar [15].

1.1. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar, Basidiomycetes sınıfına dahil olup, lignoselülozik materyalden ligninin uzaklaştırılması veya çeşitli çevre kirleticilerinin biyoremediasyonu için ekstraselüler oksidatif radikaller üretebilen enzim sentezleme potansiyeline sahip olduklarından ötürü biyoteknolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar [16,17]. Bunun yanı sıra özellikle biyoteknolojik özelliklerine bağlı olarak da; ksenobiyotiklerin yıkımı, atık suların biyolojik olarak iyileştirilmesi [18], çeşitli boyaların renginin giderilmesi, biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon) [19], çeşitli enzimlerin üretimi (lakkaz, ligninaz gibi) [20], mikrobiyal protein üretimi [21], antitumör ve antiparasit çalışmaları gibi [8] çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

1.1.1. Bazı Beyaz Çürükçül Funguslardan Elde Edilen Bileşenler ve Etkileri

Pek çok beyaz çürükçül fungustan elde edilen ve tıbbi açıdan öneme sahip olan biyopolimerler, fungusun sıvı fermantasyonu sonucu oluşan miselinden elde edilebileceği gibi, fungusun şapkasından da elde edilebilir [22]. Ancak laboratuvar şartlarında fungusun miselinden elde edilen bileşenler, saf olarak elde edilebilmesi bakımından daha güvenilirdir. Aynı zamanda kültür şartlarının kontrol edilebilir özelliğe sahip olmasından ötürü, bu biyopolimerlerin fungus miselinden elde edilmesi tercih edilmektedir [13].

Beyaz çürükçül funguslar yüksek oranda linoleik asit içerikleriyle tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadırlar. Pek çok fungus, linoleik asit içeriğiyle antitumör etkiye sahiptir. Linoleik asit AMES testinde *Salmonella*'da mutajen benzoprene karşı antitumör aktiviteye sahip temel madde olarak tanımlanmaktadır [23]. Bilindiği gibi yağ bileşiminde linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asidini kapsayan yağlar (ayçiçeği yağı, mısırözü yağı ve soya yağı gibi) sağlıklı yağlar olarak kabul edilmektedirler. Bileşiminde yüksek linoleik asit yüzdesine sahip yağların insan sağlığı açısından çok büyük önemleri vardır. Bu yağlar damar sertliğini (arteriosklerozis) önledikleri gibi, kanda yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) yapısına girerek mevcut olan damar sertliğini geriletir [24]. Aynı zamanda linoleik asit tümör baskılayıcı olarak da rol oynamaktadır [2]. Pek çok beyaz çürükçül fungus polifenol, terpen ve steroid gibi farklı sekonder metabolitleri içermektedir [24]. Bunun yanında sahip oldukları vitamin C ve çeşitli fenolik bileşikler sayesinde antioksidan özelliğe sahiptir [25]. Özellikle fenolik maddeler düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun engellenmesinde antioksidan etki göstermektedir [25]. Tüm bunların yanında C₁₈'den C₂₄'e kadar olan yağ asitlerinin analizleri en zayıf DNA polimeraz inhibitörünün linoleik asit olduğunu göstermektedir.

Bilindiği gibi karsinogenik ve mutajenik bileşikler kuvvetli elektrofilik özellikler taşırlar. Elektrofilik ara ürünlere dönüşerek metabolize olan bileşikler genellikle alkileyici ajanlar olarak bilinir. Reaktivitesi yüksek olan bu bileşikler organizmada nükleofilik özellikli -SH, -NH₂ ya da -OH gruplarını içeren proteinlerle, RNA ve DNA gibi makromoleküllerle kovalent bağ yapabilirler. Böylesine bir bağlanma da mutasyona yol açmaktadır [2]. Bu bakımdan beyaz çürükçül bir fungusta bulunan cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic asit (EPA), DNA polimeraz enziminin -SH gruplarıyla etkileşime girerek, dolaylı olarak antitumör aktivite göstermesi bakımından oldukça önemlidir [14].

Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslar, sahip oldukları biyopolimerlerin tıbbi önemlerinden ötürü; kanser ve kalp hastalıklarının önlenmesinde [24], kan basıncının düşürülmesinde [9], kandaki kolesterol seviyesinin azaltılmasında, bağışıklık sisteminin kuvvetlendirilmesinde, hemoostazinin korunmasında ve biyoritmin düzenlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar [15,26]. Bu nedenle bu funguslar birçok Asya ülkesinde geleneksel olarak hem besin hem de ilaç olarak kullanılmaktadır [9,27]. Bu bağlamda *Agaricus bisporus*, *Pleurotus* spp., *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor*, gibi pek çok fungusun ticari anlamda üretimi yapılmaktadır [9].

Yakın zamana kadar araştırmalar *Lentinula edodes*, *Schizophyllum commune*, *Grifola frondosa* ve *Sclerotinia sclerotiorum* adı verilen beyaz çürükçül funguslar üzerinde yoğunlaşmıştı. Özellikle de bu funguslardan elde edilen β -glukan, lentinan, schizophyllan (SPG, sonifilan ya da sizofiran olarak da adlandırılır), grifolan ve SSG yaygın bir şekilde çalışılmıştır [28]. Ayrıca funguslar içerdikleri beta ve alfa-glukan gibi polisakkaritler sayesinde antigenotoksik aktiviteye sahiptir [29]. Özellikle son yıllarda β -glukanların anti-sitotoksik, antitümör ve anti-tümör etkileri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır [30]. Bu bileşenlerin çoğunda bulunan β -(1-6)-dallı β -(1-3)-bağlı glukanlar önemli ölçüde antitümör aktivite göstermektedirler [31]. (1-3)- β -D-glukanlar bağışıklık sistemini uyarıcı etkiye sahip olmalarının yanı sıra, 'biyolojik yanıt değiştiriciler' olarak da sınıflandırılmaktadırlar [28]. Aynı zamanda çeşitli bakteriyel, viral, fungal ve parazitik enfeksiyonlara karşı koyabilme gücüne de sahiptirler [2].

Maya, bakteri ve fungus gibi organizmaların hücre duvarlarının temel bileşenini oluşturan β -glukanlar, hücre duvarının iç kısmında bulunurlar ve hücre duvarının sertliğini koruyarak hücreye şekil vermek bakımından önemlidirler [10,30]. Biyolojik aktiviteleri bakımından β -glukanların moleküler ağırlıkları (MA) ve dallanma dereceleri (DD) oldukça önemlidir. Biyolojik olarak en etkili β -glukanlar $0.2 \leq DD \leq 0.33$, $100 \leq MA \leq 200$ kDa ve triple heliks yapıda olanlardır. Bunun yanında β -glukanların suda çözünübilirliği dallanma dereceleriyle ilişkilidir. Örnek olarak $DD > 100$ olan β -glukanlar tamamıyla suda çözünemezler [30].

Pek çok fungus yüksek oranlarda sterol ve vitamin D₂ içermektedir. Bilindiği gibi vitamin D insanlar için gerekli bir bileşiktir [34]. Bitkisel steroller serum kolesterolünü düşürücü etkiye sahip olması bakımından oldukça önemlidirler. Fungal steroller de bitkisel sterollerle benzer fonksiyonlara sahiptir. Bazı funguslarda bulunan ergosterol vitamin D₂'ye dönüşebilmesi açısından da oldukça önemlidir [32,33].

Bütün aerobik mekanizmalarda normal metabolizma boyunca makromoleküllere zararlı olan serbest radikaller sürekli olarak üretilmektedir. Antioksidan enzimler, serbest radikal türevlerini temizleyici özelliğe sahiptir. Bu enzimler günlük yaşamdaki serbest radikallere karşı koymak için yeterlidir. Çeşitli faktörlerle antioksidatif savunma mekanizmasının bozulması, organizmada pek çok hastalığın meydana gelmesiyle sonuçlanacaktır. Bu bağlamda pek çok beyaz çürükçül fungusun elde edilen polisakkaritler, kanseri önlemede glutatyon (GSH) seviyesini artırıp, glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesine neden olmaktadır [26]. Özellikle Faz II detoksifikasyon enzimlerini içeren çalışmalar, bu enzimlerin kanseri önlediklerini, aynı zamanda memelilerde ksenobiyotiklerin metabolik detoksifikasyonunu kolaylaştırdıklarını göstermiştir [28]. Bu bakımdan pek çok beyaz çürükçül fungus antioksidan özelliğe sahip olan bileşenleri içermesiyle oldukça büyük bir öneme sahiptir [9, 26, 34, 35].

Antitümör etkiye sahip olan polisakkaritler; glukoz, galaktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz, fukoz ve riboz gibi monosakkaritleri içerirler. Bu polisakkaritlerin yapısı; monosakkaritlerin kompozisyonu, glikozidik bağların konfigürasyonu ve pozisyonu gibi faktörlerle etkilenir. Özellikle de helikal konformasyon antitümör fungus polisakkaritlerinde bulunan en önemli yapıdır. Tıbbi öneme sahip olan funguslardan elde edilen polisakkaritler oral kullanım sonucu kanser önleyici aktivite, tümörlere karşı bağışıklık sistemini güçlendirerek bağışıklık sistemini güçlendirici aktivite ve tümör hücrelerini apoptozise teşvik ederek, doğrudan tümör inhibisyon aktivitesine sahiptir [22]. Bağışıklık sistemini güçlendirici polisakkaritler [36] ve radikal süpürücü etkiye sahip indol türevleri [37] gibi biyolojik olarak aktif maddeler de yine bazı funguslarda bulunmaktadır.

1.1.2. Tıbbi Önemi Olan Bazı Beyaz Çürükçül Funguslar

En az 651 türle temsil edilen hetero yada homobasidiomycetes funguslarının 182 genusu antitümör ya da bağışıklık sistemini uyarıcı polisakkaritleri içermektedir [31]. Basidiomycetes sınıfına dahil, beyaz çürükçül bir fungus olan *T. versicolor* (*Coriolus versicolor*) tarafından birkaç tip protein bağlı polisakkarit üretilmektedir. Protein bağlı polisakkaritler yada polisakkaropeptidler olarak adlandırılan bu bileşenler, oldukça etkili bağışıklık sistemi düzenleyicilerdir. Bunlar yapısal olarak farklı polimerler olmalarına rağmen, fizyolojik açıdan aktiviteleri benzerdir. *T. versicolor*'ın en iyi bilinen ticari polisakkaropeptid preparasyonları; polisakkaropeptid Krestin (PSK) ve polisakkaropeptid

(PSP)'dir. Her iki üründe *T. versicolor* miselinin ekstraksiyonundan elde edilir. PSK polisakkaropeptidlerinin elemental analizi yaklaşık olarak şu şekildedir; %47.5 O, %40.5 C ve %5.2 hidrojen. Tipik tozlaştırılmış ekstrakt %34-35 çözülebilir karbonhidrat (%91-93 β glukan), %28-35 protein, %7 nem, %6-7 kül, geri kalanı ise serbest şeker ve aminoasitlerdir. Yapılarında bulunan 18 çeşit amino asitin %70'i lösin, valin, alanin, glisin, glutamik asit, serin, tironin, aspartik asit ve nötral aminoasitlerdir [38]. Doğada şapka formunda bulunan *T. versicolor* fungusu, biyoreaktörlerde derin kültürde miselli biyokütle olarak gelişebilir. Derin kültürde tipik olarak 25-27°C'de, 4-6 günde gelişir [38, 39]. *T. versicolor* fungusundan elde edilen PSP, interlökin ve interferon üretimini arttırmakta ve T hücrelerinin çoğalmasını uyarmaktadır. Ayrıca PSP akciğer ve özafagus kanseri gibi hastalıklarda, radyoterapi ve kemoterapinin neden olduğu istenmeyen birtakım yan etkileri hafifletmektedir [31].

Pleurotus genusu, Basidiomycetes sınıfına dahil olan funguslar içerisinde, sahip olduğu lezzeti ve besinsel değerinin yanı sıra, tıbbi özelliklerinden ötürü de ticari anlamda önemli bir yere sahiptir. Üretilmesi oldukça kolay olan *Pleurotus ostreatus* fungusunun, ekstraselüler enzimleri, β -galaktosidazları, antimikrobiyal özelliğe sahip olan bileşenleri ve vitaminleri yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bu çalışmaların temelini hücre içi ve dışı polisakkaritlerin elde edilmesi oluşturmaktadır. *P.ostreatus* fungusundan elde edilen ve saflaştırılan proteoglikan fraksiyonları bağışıklık sistemini düzenleyici etkiye sahip olmalarının yanı sıra, antikanser aktivite de göstermektedir. Özellikle fungustan elde edilen β -1,3 glukanlar, bağışıklık sistemini uyarıcı etkiye sahiptirler. Ayrıca metastazisi engellemek suretiyle antitümör aktivite de göstermektedirler [40]. Bunun dışında yapılan pek çok çalışma bu fungusun hidroksil radikalini süpürücü etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca *P.ostreatus* fungusu lipid peroksidasyonunu engelleyici aktivite de göstermektedir [27].

Basidiomycetes sınıfına dahil, beyaz çürükçül bir fungus olan *Lentinula edodes* tıbbi amaçlı kullanılan funguslar içerisinde en iyi tanımlanmış ve en çok çalışılmış funguslardan biridir. Bu fungus antiviral, antimikrobiyal ve antitumoral aktiviteye sahip olan biyolojik açıdan önemli aktif bileşenleri içerdiği için yüzyıllardır üretimi yapılmaktadır [31]. Yine bu fungustan LEM, lentinan ve KS-2 adı verilen ve farmakolojik etkiye sahip olan tıbbi polisakkaritler elde edilir. LEM, *L.edodes* fungusunun miselinden elde edilir. %24.6 protein, %44 şeker (galaktoz, mannoz, fruktoz) içerir. Ayrıca nükleik asit türevleri, B vitaminleri, ergosterol ve suda çözünebilir ligninleri içerir [13].

Aynı zamanda bu fungus diğer pek çok beyaz çürükçül fungus gibi antitrombotik ve antikolesterol etkilere de sahiptir [29].

Basidiomycetes sınıfına mensup olan *Agaricus blazei* fungusu tıbbi öneminden ötürü dünyanın farklı bölgelerinde besin ya da çay olarak tüketilmektedir. Özellikle bu fungus fiziksel ve duygusal stresle savaşmada, bağışıklık sisteminin uyarılmasında, diyabet hastalarının yaşam kalitesini arttırmada ve kandaki kolesterol seviyesini düşürmede oldukça etkilidir. Sahip olduğu tüm bu özelliklerden dolayı da antioksidan ve antikarsinojen olarak da kullanılmaktadırlar [23]. Farmakolojik olarak aktif fungus bileşenleri olan polisakkaritler ya da peptideglikanlar, *in vivo* ya da *in vitro* çalışmalarda pek çok araştırmanın temel konusunu oluşturmaktadır. *A.blazei* fungusu sahip olduğu β -1,6 glukan ile antitümör aktivite göstermektedir. Ayrıca bu fungustan izole edilen glukomannan tümör oluşumunu inhibe etmektedir [31]. Aynı zamanda bu fungus antitümör, antimutajenik ve antiklastojenik özelliklere de sahiptir [10].

Basidiomycetes sınıfına mensup beyaz çürükçül bir fungus olan *Ganoderma lucidum* özellikle Çin, Japonya ve Kore gibi ülkelerde tıbbi amaçlı olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu fungus sahip olduğu triterpen ve polisakkarit gibi biyoaktif bileşenlerinden ötürü özellikle de hipertansiyon, diyabet, hepatit, kanser ve AIDS gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu fungusun daha çok polisakkaritleri ve triterpenleri çalışılmış olmakla birlikte, steroller, lektinleri ve proteinleri üzerinde yapılan çalışmalarda bulunmaktadır [41]. Dolayısıyla özellikle tıbbi açıdan öneme sahip olan beyaz çürükçül funguslardan elde edilen biyolojik olarak aktif olan bileşenler, genotoksik etkiyi azaltmakta ve antigenotoksik aktivite göstermektedir [8].

1.2. Çalışmanın Amacı

Son yıllarda kimyasalların genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırılmasında çeşitli prokaryotik ve ökaryotik sistemler kullanılmaktadır. Prokaryotik ve ökaryotik canlılarda genel hücre metabolizması birbirinden bazı farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle kimyasalların prokaryotik bakteri sistemleri ile test sonuçları ökaryotik canlılarda aynı kimyasalların olası etkileri konusunda güvenilir bilgiler veremez. Ökaryotik bir organizma olan sirke sineği *Drosophila melanogaster* kısa jenerasyon zamanlı, kültür ortamında çok sayıda üretilmesinin kolay ve ekonomik olması, genetik olarak kontrol edilebilen çok çeşitli morfolojik karakterlere sahip olması ve genetik olarak karakterize

edilebilen soylara sahip olması gibi avantajları nedeniyle birçok bileşimin mutajenik, genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bilindiği gibi ökaryotik canlılarda genel hücre mekanizması benzerdir. Ayrıca insan ve *Drosophila*'nın genetik olarak benzerliklere sahip olması onu bu tip çalışmalar için çok avantajlı yapmaktadır [42,43].

Bu çalışmada, Mitomisin-C ile indüklenmiş genotoksik etkiye karşı beyaz çürükçül funguslardan olan *Coriolus versicolor* ve *Pleurotus ostreatus*'un antigenotoksik aktivitesinin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılması amaçlanmıştır.

1.3. Çalışmada Kullanılan Organizmalar ile İlgili Genel Bilgiler

1.3.1. *Trametes versicolor* ve *Pleurotus ostreatus*

T. versicolor ve *P.ostreatus* beyaz çürükçül funguslar olup, Basidiomycetes sınıfına dahil, zorunlu aerob mikroorganizmalardır. Genellikle Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'nın ılımlı bölgelerindeki ağaçların gövdelerinde, dallarında ve ölü kütükler üzerinde bulunurlar. Literatürde *T.versicolor* için pek çok farklı isim kullanılmaktadır. *Coriolus versicolor*, *Boletus versicolor* ve *Polystistus versicolor*, en yaygın kullanılan isimlerdir. Doğada şapka formunda bulunurlar. *T.versicolor*'ın kenar kısmı dalgalı, yelpaze şeklindedir. Üst bölgesi kadifemsi bir yapıya sahiptir ve çeşitli renkler konsantrik bir zon oluşturmuştur. Üst kısım genellikle kahverengi, beyaz, gri yada mavimsi bir renge sahiptir. Beyaz renkli, dikdörgenimsi ve silindirik bir yapıya sahip olan sporları vardır. Hem *T.versicolor*'ın hem de *P.ostreatus*'un sıvı fermentasyonu sonucunda meyve ve spor formu oluşmaz ve funguslar pelet şeklinde ürer. *T.versicolor* ve *P.ostreatus* derin kültürde tipik olarak 25-27°C'de, 4-6 günde ürer [38, 39].



Şekil 1.1. *Trametes versicolor* (Şapka formu)



Şekil 1.2. *Pleurotus ostreatus* (Şapka formu)



Şekil 1.3. *T.versicolor*'ın sıvı besiyerinde çalkalamalı inkübasyon sonucunda oluşan pelet formu.

1.3.2. *Drosophila melanogaster*

Bu çalışmada *Drosophila melanogaster*'in farklı mutant soyları kullanılmıştır. İlk kez 1911 yılında Thomas Morgan tarafından deneysel çalışmalarda kullanılmış olan *Drosophila melanogaster*, kullanım açısından pek çok avantaja sahiptir [25,42,44-48]. Bunlar:

- Kısa generasyon zamanlı ökaryotik bir organizmadır. (Yaklaşık 25°C'de %40- 60 bağıl nemde 10 gündür.)
- Küçük organizmalar olduklarından laboratuarda kültür ortamında çok sayıda üretilmeleri oldukça kolay ve ekonomiktir.
- Holometabol canlılardır. Yani gelişimleri tam metamorfozludur.
- Genetik olarak kontrol edilebilen çok çeşitli morfolojik karakterlere ve mutant soylara sahiptir.
- Larvalarının tükrük bezi hücrelerinde kolayca tanınabilen dev kromozomlar bulunur. Bunlar sitogenetik çalışmalar için ideal yapılardır. Kromozom haritaları ve kromozom fonksiyonu analizlerinin yapılmasına imkan sağlamaktadır.
- İnsanlar için kanserojenik olan pek çok madde *Drosophila* testlerinde de pozitif sonuçlar vermektedir. Ayrıca promutajen ve prokarsinojenleri test etmek için ayrıca metabolik aktivasyona gerek yoktur.

Bilindiği gibi birçok bileşik doğrudan mutajenik ya da karsinojenik sahip değildir. Bu bileşikler memeli metabolizmasında karsinojenlere ya da mutajenlere çevrilebilir. Bu tür bileşiklere, promutajen ya da prokarsinojen denir [49].

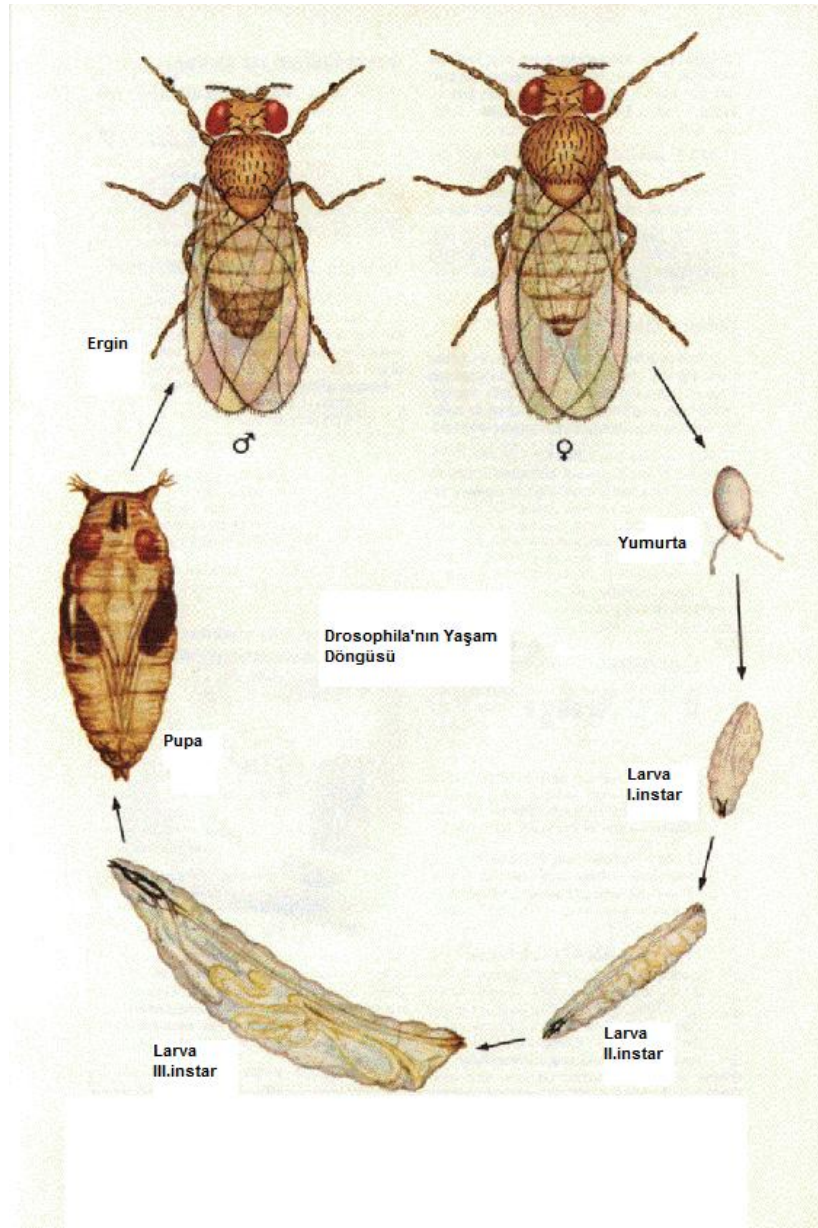
1.3.2.1. *Drosophila melanogaster*'in Sistematikteki Yeri

D.melanogaster, hayvanlar aleminin (Regnum: Animalia), *Insecta* sınıfına dahil olan Diptera takımının *Drosophilidae* familyası (sirke sinekleri) içinde yer alır. Larvaları ekşiyen meyveler üzerinde geliştiği için meyve sinekleri de denilen bu familya, genetikte deney hayvanı olarak kullanılan pek çok türü kapsar [43].

Alem	: Animalia
Şube	: Arthropoda
Altşube	: Mandibulata-Antennata
Sınıf	: İnsecta- Hexapoda
Alt sınıf	: Pterygota
Üst takım	: Mecopteroidea
Takım	: Diptera
Alt takım	: Brachycera
Aile	: Drosophilidae
Cins	: Drosophila
Tür	: <i>Drosophila melanogaster</i>

1.3.2.2. *Drosophila melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

Ergin *Drosophila*'nın döllenmiş yumurtadan üremesi iyi düzenlenmiş ve gelişimsel bakımdan programlı olayların sıkı bir genetik denetim altında olduğunu gösterir [50]. *Drosophila* hayat döngüsünde dört farklı evreye sahip holometabol bir böcektir. Bu evrelerin tipik sırası: yumurta (embriyonik), larva, pupa ve ergin şeklindedir [25]. Döllenme ve zigot oluşumunu takiben ergine gelişmesi süre bakımından ortam sıcaklığına bağımlılık gösterir [51]. Yumurtadan ergine geçiş, 25°C'de yaklaşık 10 gün alır [50]. Bir ergin dişi tüm yaşamı boyunca 300'e kadar varan sayıda yumurta bırakabilir. Genelde bunların %95'i olgunlaşıp açılabilir. Optimum şartlarda bir genetikçi yılda maksimum 30 generasyon elde edebilir. Diğer böceklerde olduğu gibi *Drosophila*'da da gelişme iki aşamada olur. Birincisi embriyonik dönemdir. Bu dönem yumurtanın döllenmesiyle başlar ve genç larvaların yumurtadan çıkmasına kadar devam eder. İkinci dönem ise post-embriyonik dönemdir ve genç larvanın yumurtadan çıktığı andan itibaren başlayarak, larvanın ergin hale gelinceye kadar geçirdiği bütün değişiklikleri içerir [43]. Ayrıca *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü ve ömür uzunluğu; sıcaklık, beslenme, popülasyon yoğunluğu, çiftleşme, radyasyon ve nem gibi çeşitli faktörler tarafından farklı şekillerde etkilenmektedir [52]. *Drosophila*'nın yaşam döngüsü Şekil 1.4.'de gösterilmektedir.



Şekil 1.4. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü [53]

1.3.2.3. Yumurta

Drosophila melanogaster dişileri pupadan çıktıktan 2-3 gün sonra yumurtlamaya başlarlar. Gelişimini tamamlamış bir yumurta dorsalde oval görünümlüdür ve boyu çeşitli türlerde farklılık göstermektedir. *D.melanogaster* yumurtasının boyu ortalama 0,5mm kadardır. Dişinin yaşamı boyunca yumurta üretimi sabit değildir, türlere göre 6. ile 10.

günler arasında en yüksek seviyeye çıkar ve geometrik olarak hızla düşer. Zigotun embriyonel değişimi yumurtadan larva çıkana kadar sürer ve bu süre 22 saattir. Yumurta folikül epiteli tarafından salgılanan ve yumurtayı koruyan korion ile çevrilidir. Mat beyaz renkte olan korion, ön dorsal uçta sayısı türlere göre farklı olabilen filament taşır. *D.melanogaster* yumurtasının iki filamenti vardır. Anterior ucunda dorsalden uzanan bu bir çift filament yumurtanın bırakıldığı yumuşak besi ortamına batmamasını sağlar [43]. Yumurtanı ön kutbunda korionun kabarması veya uzaması şeklinde gözlenen mikropil denilen bir çıkıntı vardır.

1.3.2.4. Larva

Döllenmeden yaklaşık 24 saat sonra, bir *Drosophila* yumurtası larvaya dönüşür [51]. Genç larva, korionu genellikle yumurtanın ön kutbundan iç basıncın yükselmesi ve kasların kontraksiyonu ile patlatarak çıkar [54]. Beyaz renkli ve saydam olan larvalar sürekli olarak beslenirler ve birkaç gün içerisinde besi ortamını delik deşik ederek, izler oluştururlar. Bu izler kültürün başarılı olduğunu yani besinin kullanıldığını gösteren kanıttır. Yumurtadan çıkan larva gelişmesini gömlek değiştirme ile sürdürür. İki gömlek değiştirme arasındaki peryota ‘instar’ denir. Larval faz iki defa gömlek değiştirme ile üç instara ayrılır. Yumurtadan çıkma ile ilk deri değiştirme I.instar olarak adlandırılır ve süresi bir gündür. İlk deri değiştirme ile ikinci deri değiştirme arası ise II.instar olarak adlandırılır ve süresi yine bir gündür. İkinci deri değiştirmeden sonra pupalaşmaya kadar III.instar olarak adlandırılır ve süresi yaklaşık olarak 2-3 gündür [50].

1.3.2.5. Pupa

Prepupal dönemin başlangıcında yani larva III. instarın sonunda iken bulunduğu kabın duvarında kuru bir bölgeye kadar tırmanır ve burada sarı-kahve renkte sabitleşerek pupalaşır. Pupa aşamasında bir erginin organları ve vücut formuna sahip bir bireyin gelişmesi için gerekli olan dönüşümler gerçekleşir [46] Pupa, ergin bir sineğe başkalaşarak (metamorfozla) dönüşür [50]. Pupanın rengi ergin sineğin çıkmasına yakın koyulaşarak kahverengiye dönüşür. Pupadan çıkmadan yaklaşık bir gün önce, kıvrılmış durumda olan kanatlar iki koyu eliptik yapı olarak açıkça görülebilir. Göz pigmentleri ise pupada bile fark edilecek ölçüde belirgindir [4].

1.3.2.6. Ergin

Yeni çıkan ergin bireyler ilk önce açık renkli ve uzun vücutludur. Fakat birkaç saat içinde koyulaşırlar ve başlangıçta kırışık olan kanatları açılarak normal ergin görünümüne bürünürler. Erkek ve dişiler birkaç saat içinde çiftleşebilecek duruma gelirler. Genç bireyler kur yapma davranışlarına eşleşmeye başlarlar. Dişiler virgin olmasına veya çiftleşmesine bağlı olmaksızın yumurta bırakırlar ancak döllenmemiş yumurtalar açılmaz. Dişiler pupadan çıktıktan sonra 2. veya 3. günde yumurtlamaya başlarlar [43].

Drosophila ergin yapılarının bir çoğu imaginal disklerden gelişir; bunlar erken larva gelişimi sırasında saptanır. İmaginal diskler ergin sinekte spesifik bir organ olarak farklılaşır. Bu ergin yapılar; ağız parçaları, antenler, gözler, kanatlar, halterler, bacaklar ve dış genital organları içerir. İmaginal disk hücreleri çevresindeki larva hücreleri farklılaşsa da larval gelişim süresince embriyonik bir durumda kalır. Diğer yapılardan olan sinir sistemi, barsak ve kütikül imaginal disklerden gelişmez. Her imaginal disk, birinci larva döneminde gelişir ve 20-50 hücreden oluşmuş duruma gelince, kendisine verilen göreve göre ergin yapıyı belirtmek üzere zaten programlanmış durumdadır. Bu andan sonra, her diskteki hücrelerin sayısı larva döneminin sonuna kadar mitotik bölünme ile artar ve böylece disk başına birkaç bin hücreye ulaşılır [50].

Ergin sinekler bazı özelliklerine bakılarak kolaylıkla ayırt edilebilirler. Dişinin abdomeni (karın bölgesi) 7 segmentli olup uzundur ve ucu sivridir. Erkeğin abdomeni ise 5 segmentli olup, kısmen kısa ve ucu küttür. Dişinin yaşlanması ve devamlı yumurta gelişiminden dolayı abdomen genişlerken, erkeğin abdomeni dişeye göre daha dardır. Ayrıca erkeklerin abdomen arkası siyahtır. Dişide ise açık ve koyu bantlar uç kısma kadar uzanır. Ayrıca erkek sineklerin birinci çift bacaklarında, Tarsus ekleminin bazal tarafında siyah ve kalın bir seri kıldan oluşan eşey tarağı bulunmaktadır. Dişilerde ise böyle bir yapı yoktur [46].

1.4. Genetik Toksikolojide Kullanılan Testler

Günümüzde genetik çalışmaların büyük bir bölümü genetik toksikoloji alanındadır [1]. Genetik toksikoloji hücre ve organizmada kalıtımın mekanizması ve genetik materyal üzerinde çeşitli kimyasalların ve radyasyonun etkilerini ortaya çıkarmaya çalışır [55]. Özellikle son yıllarda yeni genetik analizler geliştirilmektedir. Bu bağlamda gen

mutasyonları ile kromozomların sayısında ve yapısında meydana gelen değişimler, genetik toksikolojinin başlıca ilgi odağını oluşturmaktadır. Bu mutasyonların herhangi birini belirlemek amacıyla çok çeşitli *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri geliştirilmiştir. Sıklıkla kullanılan genotoksisite testleri arasında; *Allium* testi [56], mikronukleus testi [57], Salmonella testi [58], kardeş kromatid değişimi testi (SCE) [59], tek hücre jel elektroforezi ile (SCGE) ve *Drosophila* testlerini [60] sayabiliriz.

Model organizma olarak *Drosophila* kullanılarak çeşitli kimyasal maddelerin genotoksik ve antigenotoksik etkileri tespit edilebilir. Bu amaçla *Drosophila* testleri kullanılarak çeşitli maddelerin genotoksik veya antigenotoksik etkileri araştırılmaktadır [45,61].

1.4.1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Model organizma olarak *Drosophila*'yı kullanan testler arasında son yıllarda oldukça popüler olan testlerden biri de, mitotik rekombinasyon ve gen konversiyonu gibi kromozom hatalarının kesin tiplerini, delesyonları ve nokta mutasyonları gibi genetik konuların geniş bir alanda tanınmasına olanak sağlayan Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)'dir [62,63]. SMART diğer testlerle karşılaştırıldığında, daha hızlı, güvenilir ve ekonomik olması nedeniyle oldukça avantajlıdır[45,62].

SMART, kimyasal maddelerin somatik hücrelerde oluşturduğu mutasyonun genetik ölçümünün daha doğru sonuçlar vermesi bakımından oldukça üstün bir yöntemdir [64]. Bu amaçla iki farklı test sistemi geliştirilmiştir. Bunlar; kanat benek testi ve göz benek testidir. Günümüzde 400'den daha fazla bileşen *Drosophila melanogaster*'de SMART yöntemi kullanılarak test edilmektedir. Hem kanat benek testi, hem de göz benek testi hücre gruplarının düzenlendiği ilk embriyonik gelişim dönemini temel almaktadır. Somatik analizler, larvanın imajinal disklerinde mitotik olarak çoğalan hücre topluluğunun maruz kalma ihtimallerinden yararlanırlar. Eğer bir genetik değişim bu imajinal disk hücrelerinin birinde olursa bu değişim bütün torun hücrelerde görülecek ve mutant hücrelerin bir kolonisi oluşacaktır. Eğer farklılaşma fenotipte görülebilir bir değişime neden olursa, mutant hücre kolonisi erişkin sineklerin vücut yüzeyinde bir benek olarak tanınabilir. SMART analizler fenotipik olarak tanınabilen sineklerin gözlerinde veya kanatlarında

ortaya çıkan uygun gen işaretlerinin heterozigotluğunun kaybının tanınması ile geliştirilmektedir [61,62,65].

1.4.1.1. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi

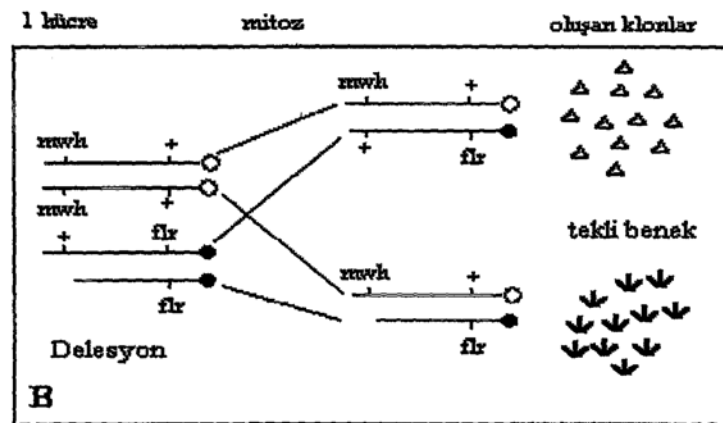
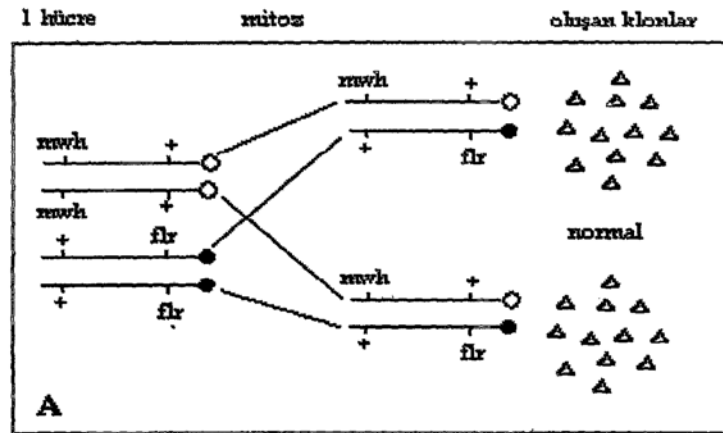
Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için fenotipte gözlemlenebilen uygun işaret genleri iki tanedir. Bu genlerden ilki çoklu kanat kılı (*mwh*) genidir. Bu mutant gen resesif bir gen olup, üçüncü kromozomun sol kolunun uca yakın bölümünde lokalize olmuştur (3-0.3). Homozigot olarak bulunduğu zaman hücre başına bir kanat kılı yerine çoklu kanat kıllarının oluşumuna neden olur. Diğer işaret geni *flare* (*flr³*) ise kanat kıllarının şeklini etkileyen resesif mutant bir gendir. Bu gen de yine üçüncü kromozomun sol kolunda fakat sentromere daha yakın (3-38.8) olarak yer alır. *flr³* geninin üç mutant aleli bilinmektedir ve hepside homozigot letaldir (*flr* için homozigot olan zigotlar ergine gelişemez). Fakat kanat imajinal disklerindeki homozigot hücreler yaşayabilir ve mutant kanat hücrelerine gelişir [8,42]. Homozigot letalite nedeniyle *flr* allelleri birçok inversiyonlar ve yine homozigot letal olan dominant işaret gen taşıyan dengeleyici bir kromozomla birlikte *flr³/TM3, Bd^S* stok olarak tutulur. Bu stokta kanat kenarları testere dişli şeklindedir [4,43].

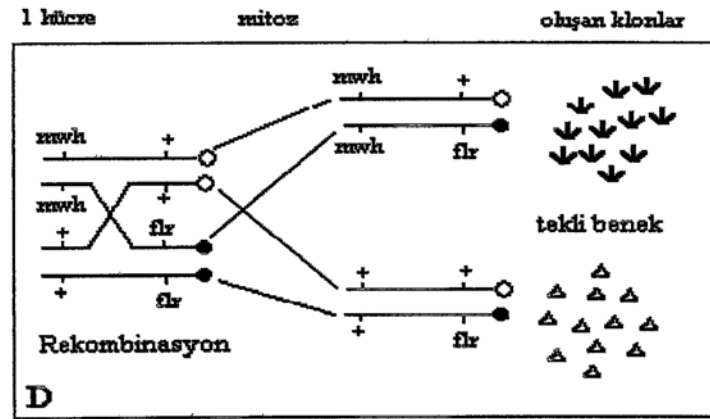
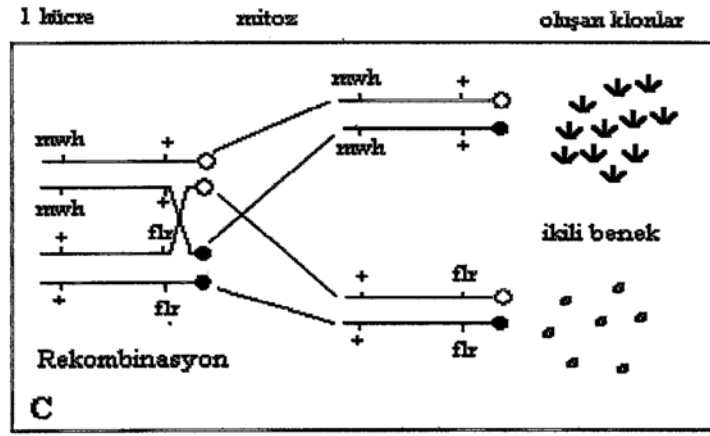
Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için iki ayrı çaprazlama kullanılmaktadır. Bunlardan biri standart çapraz (ST), diğeri de yüksek biyoaktivasyon çaprazı (YB) dır. Standart çapraz için *flr³/TM3, Bd^S* soyundan toplanan bakire dişiler *mwh* erkekleri ile çaprazlanır. Yüksek biyoaktivasyon çaprazında ise *ORR/ORR;flr³/TM3,Bd^S* soyunun bakire dişileri, *mwh* erkekleri ile çaprazlanır. Yüksek biyoaktivasyon çaprazında kullanılan bu soylar *Drosophila melanogaster*'in DDT'ye dirençli Oregon-R soyundan geliştirilmiştir ve yüksek sitokrom P450 seviyesine sahiptir [66].

Her iki çapraz sonucunda heterozigot larvalara olası mutajen uygulanır. Bu larvalardan gelişen ergin bireyler fenotipik olarak ayırt edilebilen iki farklı fenotipe sahiptir. (a) Trans-heterozigot sinekler (*mwh flr⁺/mwh⁺ flr* fenotipik olarak yabanıl tip kanatlara sahiptir). (b) Dengeleyici-heterozigot sinekler (*mwh flr⁺/ TM3,Bd^S* fenotipik olarak kanat kenarları testere dişlidir). Dengeleyici-heterozigot sineklerde çok sayıdaki inversiyonlar nedeniyle rekombinasyonlar engellenmiştir ve mutasyonlar nedeniyle sadece *mwh* tekli benekleri ortaya çıkar [67].

Kanat kıllarında beklenen somatik mutasyonları belirlemek amacıyla, ergin sineklerin kanatları kesilerek mikroskop altında taranır. Böylece mutasyon ya da mitotik

rekombinasyon sonucu heterozigotluğun kaybedilmesiyle ortaya çıkan mutant hücre klonları araştırılır [66]. Mutant hücre klonları farklı benek gruplarına ayrılarak kaydedilir. Tekli benekler *mwh* yada *flr* fenotipinde iken, ikili benekler *mwh* ve *flr* fenotiplerini birlikte taşımaktadır [65]. İstatistiksel analiz için benekler; küçük tekli benek, büyük tekli benek ve ikili benek olarak sınıflandırılır. Tekli benekler *mwh* veya *flr* fenotipindeki hücrelerden oluşur. Tekli benekler arasında 1-2 hücreli olanlar küçük tekli benekler olarak isimlendirilirken, 3 ve daha fazla sayıda hücre gruplarından oluşan beneklere ise büyük tekli benekler denir. İkili benekler ise *mwh* ve *flr* fenotipinin her ikisinin yan yana hücre gruplarında birlikte bulunduğu beneklerdir [45]. Beneklerin farklı tipleri farklı genetik mekanizmalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Tekli benekler nokta mutasyon, delesyon ve iki işaret gen (*mwh* ve *flr*) arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşurken, ikili benekler 3. kromozomun sentromeri ve *flr* geni arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır [45,60,68].





Şekil 1.5. Tekli ve ikili beneklerin oluşumuna neden olan farklı genotoksik olayları gösteren genetik mekanizmalar [69].**A:** Normal kanat kıllarının oluşumu, **B:** Delesyon sonucu tekli benek oluşumu, **C:** Mitotik rekombinasyon sonucu ikili benek oluşumu, **D:** Mitotik rekombinasyon sonucu tekli benek oluşumu

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Antigenotoksik Etkileri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Shon vd. [28] Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan, *Phellinus linteus*, *Phellinus igniarius* ve *Agrocybe cylindracea* funguslarının direkt etkili ve direkt etkili olmayan mutajenlere karşı antigenotoksik etkisini, *Salmonella typhimurium* kullanarak test etmişlerdir. Çalışmada 4-nitro-o-fenilendiamin (NDP) ve sodyum azide (NaN_3) adı verilen direkt etkili mutajenler kullanılmışken, direkt etkili olmayan mutajen olarak da 2-aminofluorene (2-AF) ve benzo[a] piren (B[a]P) kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *P. linteus*, *P. igniarius* ve *A. cylindracea* funguslarının glutatyon (GSH) seviyesini arttırmak suretiyle, glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesinin neden olduğu kanseri önlemede rol alabilecekleri ve antimutajenik aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir.

Lee vd. [71] yapmış oldukları bir çalışmada geleneksel kanser tedavisinde kullanılan ve antioksidant aktiviteye sahip olduğu bilinen, beyaz çürükçül bir fungus olan *Inonotus obliquus* fungusundan izole edilen bileşenlerin, ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etil-benzthiazoline-6-sülfonik asit]) katyon radikaline karşı önemli ölçüde radikal süpürücü etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca yapılan çalışma sonucunda bu bileşenlerin süperoksit radikal anyonlarına karşı daha az etkili oldukları gösterilmiştir.

Luiz vd. [14] *Agaricus blazei* fungusunun AB97/11 soyundan elde edilen organik ekstraktların, klastogenik ve antiklastogenik potansiyelini chinese hamster yabanıl tip ve DNA tamir eksikliği olan hücre soyları üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada kardeş kromatid değişim testi (SCE) yapılmış ve ayrıca kromozom aberasyonları araştırılmıştır. Fungustan elde edilen organik ekstraktlar saf etanol (EtOH) ve kloroform/metanol'dan elde edilmiştir. Çalışma sonucunda *Agaricus blazei* fungusunun AB97/11 soyundan izole edilen organik ekstraktların antimutajenik aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir.

Rosalia vd. [72] yapmış oldukları çalışmada *Ganoderma lucidum* fungusunun farelerde sarkoma 180'e karşı koruyucu etkisini göstermişlerdir. Çalışmada katı ortam fermantasyonundan elde edilen fungus miselinin antitümör aktivitesi araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda *Ganoderma lucidum* miselinin tüketimine bağlı olarak,

farelerde Sarkoma 180'e karşı direncin arttığı saptanmıştır. Çalışmayla birlikte bu fungusun bağışıklık sistemini düzenleyici etkiye sahip olduğu da rapor edilmiştir.

Elmastas vd. [9] yapmış oldukları bir çalışmada yenilebilir özelliğe sahip olan *Agaricus bisporus*, *Polyporus squamosus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lepista nuda*, *Russula delica*, *Boletus badius* ve *Verpa conica* funguslarının kurutulmuş metanolik ekstraktlarının serbest radikallerin uzaklaştırılması, süper oksit anyon radikallerinin uzaklaştırılması, toplam antioksidan aktivite ve metal şelatlama aktivitelerini kapsayan farklı sistemlerdeki antioksidan aktivitesini test etmişlerdir. Yapılan çalışma fungus türlerinin metanolik ekstraktlarının, çeşitli in vitro antioksidan sistemlerde önemli ölçüde antioksidan aktiviteye sahip olduğunu açık bir şekilde göstermiştir.

Menoli vd. [23] yapmış oldukları çalışmada *Agaricus blazei* fungusunun AB96/07, AB96/09 ve AB97/11 soylarından hazırlanan çaylarının mutajenik ve antimutajenik aktivitesini, Chinese hamster V79 hücrelerinde tek hücre jel elektroforezi (SCEG) ve mikronukleus testlerini kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda fungus çaylarının tek başına herhangi bir mutajenik etkiye sahip olmadığı ancak metil metanosülfonat (MMS)'ın genotoksik potansiyelini baskılayarak antimutajenik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Jayakumar vd. [27] erkek sıçanlarda karaciğer hasarına neden olan karbon tetra klorid (CCl₄) üzerine *Pleurotus ostreatus* fungusunun varsayılan antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Sıçanlara karın içerisine 4 günlük CCl₄ uygulaması, kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman glutamik oksaloasetik transaminaz (SGOT), glutamik pirüvat transaminaz (SGPT) ve alkalik fosfat (ALP) serum seviyelerini önemli ölçüde yükseltmiştir. CCl₄ uygulamasını takiben karaciğerde önemli ölçüde glutatyon (GSH) seviyesinin düştüğü, malondialdehit (MDA) seviyesinin ise yükseldiği rapor edilmiştir. *P. ostreatus* ekstraktlarının uygulanmasının ise, serumdaki SGOT, SGPT ve ALP seviyelerini tekrar eski normal durumuna getirdiği gözlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *P. ostreatus* ekstraktlarının sıçanlarda CCl₄'ün neden olduğu hepatotoksiteyi önemli ölçüde hafiflettiği saptanmıştır.

Miyaji vd. [73] beyaz çürükçül bir fungus olan *Lentinula edodes*'in sucul ekstraktlarının genotoksik ve antigenotoksik aktivitesini in vitro şartlarda Hep-2 hücrelerinde, Comet assay kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışmada fungusun üç farklı sıcaklıkta (4, 22 ve 60 °C), üç farklı konsantrasyonda (0.5, 1.0, 1.5 mg/mL) sucul ekstraktları hazırlanmış ve pozitif kontrol olarak metil metanosülfonat (MMS) kullanılmıştır. Çalışmada MMS'in neden olduğu genotoksikite üzerindeki koruyucu

etkisini test etmek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan fungus ekstraktları MMS uygulamasından önce, MMS ile eş zamanlı olarak ve MMS uygulamasından sonra olmak üzere üç şekilde uygulanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 22 +/- 2 °C’de, 1.0 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan ve MMS ile eş zamanlı olarak uygulanan sucül ekstraktların antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde 4 °C’de, 0.5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan ve MMS uygulamasından sonra uygulanan sucül ekstraktların da antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir.

2.2. *Drosophila melanogaster* İle Yapılan Antigenotoksisite Çalışmaları

Graf vd. [62] *Drosophila* kanat benek testi kullanarak yaptıkları çalışmada ürethanın genotoksik etkisini kahve ile metil ürenin ve sodyum nitrat karışımının genotoksik etkisinin askorbik asit ve kateşin ile inhibisyonlarını araştırmışlardır. Yapılan çalışmanın sonucunda, kahvenin ürethanın genotoksik etkisini, askorbik asit ve kateşininde metil ürenin ve sodyum nitratin genotoksik etkilerini önemli düzeyde azalttığını saptamışlardır.

Idaomar vd. [74] yaptıkları bir çalışmada, *Helichrysum italicum*, *Ledum groenlandicum* ve *Ravensara aromatica* isimli üç tıbbi bitkiden izole edilen temel yağların karışımının promutajen etkisi bilinen bir madde olan üretana karşı genotoksik ve antigenotoksik etkileri *Drosophila* kanat benek testi ile araştırmışlardır. Çalışmalar sonucunda test edilen yağların tek başına uygulanması sonucunda önemli bir genotoksik etki gözlenmezken, üretanla beraber uygulandıklarında, ürethanın neden olduğu mutasyonları azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu üç yağdan eşit oranlarda oluşturulan bir karışımın antigenotoksik etkisinin en yüksek değerde olduğu da tespit edilmiştir. Çalışmaların sonucunda kullanılan yağların antimutajenik etkilerinin sitokrom P-450 aktivasyon sistemleriyle, yağlarda bulunan bileşenlerin etkileşimleriyle açıklanmıştır.

Yesilada [75] yapmış olduğu bir çalışmada, *Drosophila melanogaster*’de somatik mutasyon ve rekombinasyon testini kullanarak etil methanosülfonat (EMS) ile indüklenmiş olan mutant kanat benekleri üzerine kinetin, giberellik asit (GA₃) ve indol asetik asit (IAA) adı verilen bitki büyüme hormonlarının etkisini araştırmıştır. Çalışmada GA₃ uygulamasının, EMS ile indüklenen bütün kanat beneklerini azalttığı gözlenmiştir. Kinetinin 10⁻³M konsantrasyonunun EMS ile indüklenen ikili beneklerin sayısını azalttığı, 10⁻⁴M konsantrasyonunun ise beneklerin bütün tiplerinin sayısını arttırdığı gözlenmiştir. Aynı konsantrasyonlarda ki IAA ise değişken sonuçlar vermiştir. Çalışma sonucunda bitki büyüme hormonlarının (özellikle GA₃’ün) bio-antimutajen olabileceği rapor edilmiştir.

Kaya vd [76] yaptıkları bir çalışmada, antioksidan özelliğe sahip olan askorbik asitin (vitamin C) mutajenlerin genotoksikitesisi üzerindeki hafifletici etkisini araştırmışlardır. Çalışmada *mwh* ve *flr*³çaprazı sonucu oluşan transheterozigot 3 günlük larvalar, kobalt klorid (CoCl₂), 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) ve potasyum di kromat (K₂Cr₂O₇) referans mutajen bileşenleriyle muamele edilmiştir. Larvalara uygulanan askorbik asidin üç farklı dozunun (25, 75 ve 250 mM) mutant kolonilerin frekansında önemli bir artışa neden olmadığı gözlenmiştir. Mutajen bileşenlerle askorbik asitin beraber uygulanmasında ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Askorbik asit K₂Cr₂O₇'nin genotoksik etkisini azaltıcı özellik gösterirken, 4-NQO mutajenik bileşenin genotoksikitesisi üzerinde hiçbir antigenotoksik etki göstermemiştir. Askorbik asidin, CoCl₂ ile birlikte uygulanmasında ise, CoCl₂'nin tek başına uygulanması sonucu gözlenen mutant kolonilerin frekansından daha yüksek değerde mutant koloni frekansı gözlenmiştir. Araştırmacılar bunu antioksidan özelliğe sahip olan vitamin C'nin, aktif oksijenin etkisini azaltmasına rağmen, Cu⁺², Mn⁺², Fe⁺², Fe⁺³ gibi metallerin askorbik asit varlığında daha tehlikeli hale gelmeleriyle açıklamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda araştırmacılar, in vivo modellerde askorbik asitin genotoksik görünmemesine rağmen, bazı şartlar altında genotoksik etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Takahashi vd. [77] yapmış oldukları bir çalışmada, çoğunluğu bitki kökenli olan pigmentlerin antigenotoksik etkisini, *Drosophila* DNA tamir testi kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada flavonoid, karatenoid, antosiyanin, anthraquinone ve β-diketone türevlerini içeren toplam 20 pigment test edilmiştir. Bu pigmentler MeIQ_x (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5f]quinoxaline), AFB₁ (aflatoksin B1), NDMA (N-nitrosodimetilamin), 2-AAF (2-asetilaminofluoren), DMBA (7,12-dimetilbenzo[*a*]antrasen), 4NQO (4-nitroquinolin N-oxide) ve MNU (N-metil-N-nitrosourea) karsinojenlerinin genotoksikitesisine karşı kullanılmıştır. Üçüncü instar dönemindeki *Drosophila* larvaları pigmentli veya pigmentsiz mutajenlerle muamele edilmişlerdir. Çalışma sonucunda bazı pigmentlerin önemli antigenotoksik aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Niikawa vd. [78] aspirinin antigenotoksik etki mekanizmasını açıklamak amacıyla, *Drosophila melanogaster*'de DNA tamir tesitini kullanarak aspirinin mitomisin-C (MMC)'nin genotoksikitesisi üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada aspirin, MMC ile birlikte, MMC uygulamasından önce ve MMC uygulamasından sonra olmak üzere 3 farklı şekilde uygulanmıştır. Çalışmalar sonucunda araştırmacılar, aspirinin MMC ile birlikte uygulanmasının, MMC'nin genotoksikitesisini etkili bir şekilde baskıladığını, MMC

uygulanmasından sonra ve önce uygulanmasının ise, MMC'nin genotoksisitesi üzerinde herhangi bir etki göstermediğini saptamışlardır.

Laohavechvanich vd. [79] 4 farklı yöresal biberin üretana karşı antimutajenik etkisini araştırmışlardır. Çalışmada her bir biberi su, yağ ve sirke de olmak üzere farklı şekilde hazırlanmıştır. Çalışma sonucunda biberin pek çok antimutajen kompleks karışımlar içerdiği belirtilmiştir.

Abraham [80] yapmış olduğu bir çalışmada *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testini (SMART) kullanarak kahvenin çeşitli mutajenik/karsinojenik kimyasal maddelerin siklofosfamid (CPH), dietilnitrozamin (DEN), mitomisin C (MMC), prokarbazin (PRO), üretan (URE)) genotoksisitesi üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda kahvenin birlikte uygulandığı CPH, DEN, MMC ve URE nedeni ile oluşan mutasyonlarda önemli bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır.

Costa ve Nepomuceno [81] yaptıkları bir çalışmada, vitamin (vitamin C, E ve B-karoten) ve mineral (bakır, selenyum ve çinko) karışımlarının, serbest radikallerin oluşuma neden olan kanserojen özellikte ki doksorubisin (DXR)'e karşı olan antigenotoksik etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada *Drosophila melanogaster*'in kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testini kullanmışlardır. Çalışmada hem standart hem de yüksek biyoaktivasyon çaprazı kurulmuştur. Her iki çapraz sonucu oluşan larvalar, vitamin/mineral karışımlarının çeşitli dozlarıyla beslenmişlerdir. Bunun sonucunda karışımların herhangi bir genotoksik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Multivitamin/mineral (MV) karışımının 0.125 mg/ml DXR ile beraber yada ön uygulama ile verildiğinde ise DXR'nin genotoksisitesinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda MV karışımının herhangi bir genotoksik etkiye sahip olmadığı ancak DXR'nin genotoksik etkisine karşı antigenotoksik etkili olduğu rapor edilmiştir.

Stamenkovic-Radak vd. [82] *Drosophila melanogaster*'de arı sütünün antitoksik ve antimutajenik etkisini araştırmışlardır. Kuvvetli mutajen olan metilmetan sülfonatın (MMS) tek başına veya arı sütü ile birlikte kombinlenerek organizmaya verilmiştir. MMS uygulamasından sonra eşeye bağlı resesif letal mutasyonlar ve kısır erkeklerin frekansında önemli bir artış gözlenmişken, MMS'nin arı sütü ile birlikte uygulanmasıyla bu frekanslarda azalma saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda arı sütünün antimutajenik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Furlanetto vd. [83] yaptıkları bir çalışmada sentetik vanilyanın (VA), N-etil-N-nitro-sourea (ENU), etilmethan sülfonat (EMS) ve mitomisin C (MMC) genotoksinleri tarafından meydana gelen letal hasarın tamiri üzerindeki etkisini *Drosophila*

melanogaster'de DNA tamir testini kullanarak test etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda VA'nın kimyasal ajanların toksisitesini hafifletebilen, kromozomlarda ve genlerde meydana gelen hasarı engelleyebilen özelliğinin olduğu gösterilmiştir.

Rizki vd. [84] *Drosophila melanogaster*'de kanat benek testini kullanarak, üç farklı selenyum bileşeninin (sodyum selenit, sodyum selenat ve selenik asit) genotoksik aktivitesini ve potasyum di kromat bileşeninin genotoksitesisi üzerindeki etkisini çalışmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda selenyum bileşenlerinin küçük tekli, büyük tekli ve ikili beneklerin hiç birinin frekansında herhangi bir artışa neden olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca sodyum selenitin, potasyum di kromatin neden olduğu klonların tümünü yok ederek antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu açıkça gösterilmiştir.

Lehmann vd. [85] *Drosophila melanogaster*'de kanat benek testini kullanarak tannik asitin (TA), çeşitli mutajenlerin mitomisin C (MMC), nitrojen mustard (HN2) ve metilmetan sülfonatın (MMS) neden olduğu somatik mutasyon ve rekombinasyon üzerindeki hafifletici etkisini araştırmışlardır. Tannik asitin tek başına uygulanması kendiliğinden oluşan tekli ve ikili beneklerin frekansında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Tannik asitin mutajenler ile beraber uygulanmasında ise genotoksinlerin tek başına uygulanması sonucu gözlenen kanat beneklerinin frekasında azalma olduğu saptanmıştır.

Negishi vd. [86] doğal klorofillerin *Drosophila melanogaster*'de antimutajenik ve antikarsinojenik etkisini test etmişlerdir. Çalışmada ıspanak ve klorelladan elde edilen klorofilin 4-nitroquinolin 1-oksit (4NQO)'in genotoksitesisi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda klorofilin 4NQO ile oluşan mutasyonu baskıladığı saptanmıştır.

Karekar vd. [87] vitamin E, kafeik asit ve glutatyonun antimutajenik etkilerini *Drosophila melanogaster*'de kanat benek testini kullanarak test etmişlerdir. Çalışmada mutajen olarak aflatoksin B₁ kullanılmıştır. Çalışma sonucunda E vitamininin herhangi bir antimutajenik etkisi görülmezken, kafeik asit ve glutatyonun aflatoksin B₁ tarafından indüklenen mutasyonlara antimutajenik etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Lashmarr vd. [88] tarafından yapılan bir çalışmada *Apis mellifera*'nın tomurcuklarından elde edilen ve halk arasında iltihap iyileştirici olarak kullanılan reçineli bir madde olan propolis'in antigenotoksik aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada hem standart hem de yüksek biyoaktivasyon çaprazı kurulmuş ve her ikisinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışma sonucunda bu maddenin anti-rekombinojenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca yine kullanılan dozların artışına bağlı olarak bu anti-rekombinojenik etkinin arttığı da rapor edilmiştir.

Fragiorgis vd. [89] *Drosophila melanogaster* üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, antioksidan özelliğe sahip olan askorbik asidin, antitümör etki gösteren doksorubisin (DXR)'in genotoksitesisi üzerindeki hafifletici etkisini araştırmışlardır. Çalışmada hem standart hem de yüksek biyoaktivasyon çaprazı kurulmuştur. 50 ve 100mM'lık 2 farklı konsantrasyonda uygulanan askorbik asidin tek başına benek frekansı üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Çalışma sonucunda askorbik asidin DXR tarafından oluşturulan serbest radikalleri ve muhtemel diğer reaktif metabolitleri engellediği belirtilmiştir. Askorbik asidin *Drosophila melanogaster*'in somatik hücreleri üzerindeki DXR'ye karşı olan bu koruyucu etkinin direkt olarak sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesiyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Beyaz Çürükçül Funguslar

Çalışmada *Basidiomycetes* sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan *Trametes versicolor* ATCC 2008001 ve *Pleurotus ostreatus* fungusları kullanılmıştır. Bu funguslar İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji/Biyoteknoloji laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Beyaz Çürükçül Fungusların Üretimi ve Saklanması

Çalışmada kullanılan fungusların devamlılığını sağlamak amacıyla, funguslar Sabouraud dekstrozu agar (SDA) plaklarında 30°C’de, 4-6 gün inkübe edildi ve 3-4 haftada bir taze besiyerine pasajlama yapıldı. Fungus kültürleri +4 °C’de buzdolabında saklandı.

3.3. Çalışmada Kullanılacak Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması

SDA ortamında üretilen fungus kültürlerinden fungus parçaları alınarak yatık agara pasajlama yapıldı ve 30°C’de 4-6 gün inkübe edildi. Yatık agarda üretilen fungus kültürlerine 10mL steril distile su eklenerek misel süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan misel süspansiyonları 5mL olacak şekilde steril koşullar altında, 100mL sabouraud dekstrozu sıvı besiyeri içeren 250mL’lik erlenlere eklendi ve 30°C’de 150 rpm’de çalkalamalı etüvde 5 gün inkübe edildi.

3.4. Fungus Peletlerinin Üretimi

Hazırlanan fungus kültürleri homojenizatör kullanılarak steril koşullar altında düşük devirde homojenize edildi. 600 mL sabouraud dekstrozu sıvı besiyeri/1000 mL’lik erlenlere 6-8 mL homojenize edilmiş fungus kültürü ekildi ve çalkalamalı etüvde 30°C’de 150 rpm’de 5-6 gün inkübasyona bırakıldı. Fungus kültürleri çalkalamalı koşullarda pelet haline geldikten sonra peletler ortamdaki süzülerek alındı.

3.5. Fungus Peletlerinin Kurutulması

Çalkalamalı koşullar altında oluşan peletler ortamdan süzülerek alındıktan sonra, 30°C'ye ayarlanmış olan etüvde 4-5 gün süreyle kurumaya bırakıldı ve kuruyan fungus peletleri toz haline getirildi.

3.6. Çalışmada Kullanılan *Drosophila melanogaster* soyları

Bu çalışmada *Drosophila melanogaster* türüne ait farklı mutant soylar kullanılmıştır. Bu stoklar ve özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

- ***flr³/ln (3LR) TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34S} e^S Bd^S*** : Bu mutant soy flare (*flr³*) mutasyonunu taşımaktadır. *flr³* kanat kıllarının şeklini etkileyen resesif bir mutasyondur. Üçüncü kromozomun sol kolunda, sentromere daha yakın olarak yer alır (3-38.8). *flr³*'ün üç mutant aleli bilinmektedir ve hepside homozigot letaldir. Ancak kanat imaginal disklerindeki homozigot hücreler yaşayabilir ve mutant kanat hücrelerine gelişir. Homozigot letalite ile kanat kenarlarının testere dişi şeklinde olmasına neden olan dominant bir mutasyon olan *Bd^S* heterozigot olarak tutulur [42].
- ***mwh/mwh***: Bu mutant stok *mwh* (çoklu kanat kılı) mutasyonunu taşımaktadır. *mwh* mutasyonu üçüncü kromozomun sol kolun uca yakın bölümünde lokalize olmuştur (3-0.3). Homozigot *mwh* soyu olarak yaşatılabilir ve bu durumda kanat hücrelerinde hücre başına bir kanat kılı (trikom) olması gerekirken çok sayıda kanat kılı oluşur [42].

3.7. Çalışmada Kullanılan Çapraz

Çalışmada standart çapraz (ST) kuruldu. Standart çaprazı kurmak için *mwh* erkekleri ile *flr³/TM3, Bd^S* soyunun bakire dişileri kullanıldı [42].

3.8. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agar agar, dietil eter, propionik asit, gliserol, kloral hidrat Merck'ten; arap zamkı (gum arabic) Sigma'dan, *Drosophila* besiyeri Carolina Biological Supply Company'den temin edildi. Çalışmada kullanılan Mitomisin C ise Serva'dan temin edildi.

3.9. Deney Koşulları

Deneyde kullanılan stok *Drosophila* kültürleri ve kurulan deney sistemleri 25 $\pm$ 1 °C sıcaklık %40-60 bağıl nem ve sürekli karanlık koşullarda bulunan Biyoloji Bölümü'ndeki insektoryumda tutuldu. Çalışmalar sırasında sinekler sadece eşleştirme, aktarma, virjin toplama, larva toplama ve preparat hazırlama işlemleri için aydınlık ortama alındılar.

3.9.1. Besiyerinin Hazırlanması

Laboratuvarımızda stok kültürler standart *Drosophila* besiyerinde yaşatılmaktadır. Çalışmada Bozcuk tarafından geliştirilen standart besiyeri kullanıldı [4]. Standart *Drosophila* besiyeri toz şeker, mısır unu, bira mayası, agar, asit karışımı ve distile su kullanılarak hazırlanır. Propionik asit, orto fosforik asit ve distile sudan oluşan asit karışımı anti-fungal amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Besiyeri hazırlanırken, asit karışımı dışındaki tüm maddeler belirtilen ölçülerde karıştırılarak, kaynatılır ve 5-10 dk pişirilir. Daha sonra bu karışım ateşten indirilip belirtilen miktarlarda asit karışımı ilave edilerek iyice karıştırılır. Besiyeri henüz sıcakken stok yapmak için kullanılan, önceden steril edilmiş 250ml'lik şişeler 1,5-2cm kalınlığında dökülür. Daha sonra bu şişelerin üzerileri temiz kurutma kağıdı ile kapatılır ve besiyeri kurumaya bırakılır. Besiyeri yeteri kadar katılaştığında şişelerin ağızları hidrofor pamuk ve gazlı bezden yapılmış ve steril hale getirilmiş olan tamponlar ile kapatılır. Hazırlanmış olan besiyeri 2 gün içerisinde kullanılmalıdır, aksi takdirde besiyeri bozulur. Bu nedenle yapılan deneyler için, her defasında taze besiyerleri hazırlandı. Larva toplama aşamasında ise hazır besiyeri kullanıldı. 2.5 x 7.5 boyutlarında, düz tabanlı ve steril hale getirilmiş olan

tüplere 0.5'er gram hazır besiyeri konuldu. Bu besiyeri daha sonra distile su yada farklı dozlarda hazırlanan kimyasal madde eklenerek kullanıldı.

Çizelge 3.1. *Drosophila* besiyerinin içeriği (Bozcuk, 1976)

Kullanılan Madde	Miktar
Mısır unu	104gr
Toz şeker	94gr
Bira mayası	19gr
Agar agar	6gr
Distile su	1020mL
Asit karışımı	6mL*

*Asit karışımının içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *Drosophila* besiyerinden kullanılan asit karışımı (Bozcuk, 1976)

Kullanılan Madde	Miktar (mL)
Ortosphorik asit	83
Propiyonik asit	836
Distile Su	1081

3.9.2. Bayıltma Yöntemi

Deneyler sırasında erginlerin uçmasını engellemek ve daha kolay çalışabilmek için bayıltıldı. Bayıltma işleminde, kolay uygulanabilir ve ucuz olması nedeniyle eterizasyon

yöntemi kullanıldı. Bayıltma işlemini yapmak için, boş bir stok şişesi alınarak bayıltıcı olarak kullanılır. Pamuk tamponu çıkartılan kültür şişesi ani bir hareketle bayıltıcının ağzına ters çevrilerek kapatılır ve hafifçe vurularak içerisindeki sineklerin alttaki bayıltıcıya geçmesi sağlanır. Daha sonra bayıltıcının ağzı birkaç damla eter damlatılmış pamuk tampon ile kapatılır. Kısa sürede eter buharı ile bayıltılan sinekler temiz bir fayans üzerine alınarak gerekli çalışmalar yapılır.

3.9.3. Mitomisin C (MMC)'nin Hazırlanması ve Besiyerine Eklenmesi

Çalışmamızda Mitomisin C'nin genotoksik etkisini kanat benek testiyle belirlemek amacıyla, 0.025mM, 0.05mM ve 0.1mM olmak üzere üç farklı dozu kullanılmıştır. Önceden steril edilmiş 2.5×7.5 cm boyutlarında olan yeterli sayıdaki deney tüplerine 0.5 gr hazır besiyeri konuldu. Daha sonra farklı deney grupları oluşturmak amacıyla her tüpe 2.5 mL olmak üzere gruplara özgü test çözeltilerinden eklendi. Bu amaçla negatif kontrol grubunda sadece distile su kullanılırken, diğer gruplarda farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan Mitomisin C kullanıldı.

3.9.4. Kurutularak Toz Haline Getirilmiş Fungus Peletlerinin Besiyerine Eklenmesi

Çalışmamızda kurutarak toz haline getirdiğimiz beyaz çürükçül funguslardan *T.versicolor* ve *P.ostreatus*'un 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg olmak üzere üç farklı dozu kullanılmıştır. Fungus tozlarının Mitomisin C üzerindeki antigenotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, Mitomisin C'nin 0.05 mM'lık dozuna karşılık, fungus tozlarının üç farklı dozu test edilmiştir. Bunun için önceden steril edilmiş yeterli sayıdaki deney tüplerine, toplam 0.5gr hazır besiyeri içerisinde 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg olacak şekilde fungus tozları eklenmiştir.

3.10. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinin Uygulanması

Mitomisin C'nin genotoksik etkisini saptamak ve kurutularak toz haline getirilmiş fungus peletlerinin antigenotoksik etkisini SMART ile araştırmak için, standart (ST) çapraz kuruldu. Çaprazın atasal soyları sekiz saat süreyle taze besiyerine alınarak

yumurtlamaları sağlandı. Sekiz saatin sonunda atasoylar besiyerinden uzaklaştırıldı ve bu yumurtalardan çıkan 72±4 saatlik larvalar toplanarak, önceden gruplara göre hazırlanmış olan, besiyeri içeren tüplere sayılarak transfer edildi. Böylece negatif kontrol, pozitif kontrol olarak Mitomisin C ve Mitomisin C + fungus grupları oluşturuldu.

Hazırlanan test tüplerindeki larvalardan ergine gelişen bireylerden normal kanatlı olan trans-heterozigot (*mwh flr⁺ /mwh⁺ flr³*) bireyler kanat benek testi için kullanıldı. Bu sineklerin kanatları kesilerek Faure solüsyonunun (30 gr arap zımkı, 20 ml gliserol, 50 gr kloralhidrat ve 50 mL distile su) damlatıldığı lamalar üzerine yerleştirildi [42]. Kanatların dorsal ve ventral yüzeyleri tekli beneklerin ve ikili beneklerin varlığını saptamak için ışık mikroskopunda 400X büyütme ile tarandı.

Mikroskop incelemesinde gözlenen tekli benekler *mwh* ya da *flr* fenotipine sahip hücrelerden oluşurken, ikili beneklerde her iki işaret genin fenotipleri yan yana olan hücrelerde bulunur [42]. Mikroskopik incelemeler sırasında 1-2 hücreli tekli benekler küçük tekli benek olarak kaydedilirken, ikiden daha fazla hücreli benekler büyük tekli benekler olarak kaydedildi.

3.11. SMART Testi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Mikroskopik tarama sonucu gözlemlenmiş olan kanat benekleri; küçük tekli benekler, büyük tekli benekler ve ikili benekler olmak üzere sınıflandırıldı. Olası genotoksik ve antigenotoksik etkilerin değerlendirilebilmesi için deney gruplarının kanat başına düşen benek sayıları, kontrol gruplarının değerleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonucun pozitif, kısmen pozitif, yetersiz veya negatif olup olmadığına karar vermek için ise, bir çoklu karar verme prosedürü izlendi. Bu amaçla MICROSTA paket programı kullanılarak tek yönlü Kastenbaum-Bowman testi yapıldı. Antigenotoksik aktivitesi belirlenen fungusların MMC tarafından indüklenen kanat benek sıklığını inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı [74].

$$\frac{100(a-b)}{a}$$

Yukarıdaki formülde **a** MMC ile indüklenen benek sıklığını, **b** ise fungus tozlarının varlığında MMC ile indüklenen benek sıklığını göstermektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada beyaz çürükçül funguslardan olan *Trametes versicolor* ve *Pleurotus ostreatus*'un sıvı fermentasyonu sonucu oluşan ve kurutularak toz haline getirilmiş olan pelletlerinin, Mitomisin C ile oluşturulan mutasyona karşı antigenotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmada Bölüm 3'te anlatılan deney sistemleri kurulmuştur. Tüm gruplarda 72 ± 4 saatlik larvalardan ergine gelişen trans-heterozigot bireylerin kanatları, beneklerin varlığını tespit etmek için ışık mikroskopunda 400X büyütme ile incelenmiştir. Çalışmalar sırasında kanat benekleri, istatistik analizlerde kullanabilmek için sınıflandırılarak kaydedilmiştir. Buna göre benekler, tekli benekler (*mwh* veya *flr* fenotipinde) ve ikili benekler (*mwh* ve *flr* fenotipinde) olmak üzere sınıflandırılmıştır. Ayrıca tekli beneklerde kendi içerisinde küçük tekli benek (1-2 hücreli) ve büyük tekli benek (3 ve daha fazla hücreli) olmak üzere sınıflandırılmıştır.

4.1. *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Benek Testinden Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Mitomisin C'nin genotoksik etkisinin araştırılması

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan 0.025 mM, 0.05 mM ve 0.1 mM Mitomisin C (MMC) gruplarından elde edilen bulgular Çizelge 4.1'de görülmektedir.

Çizelge 4.1. MMC gruplarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

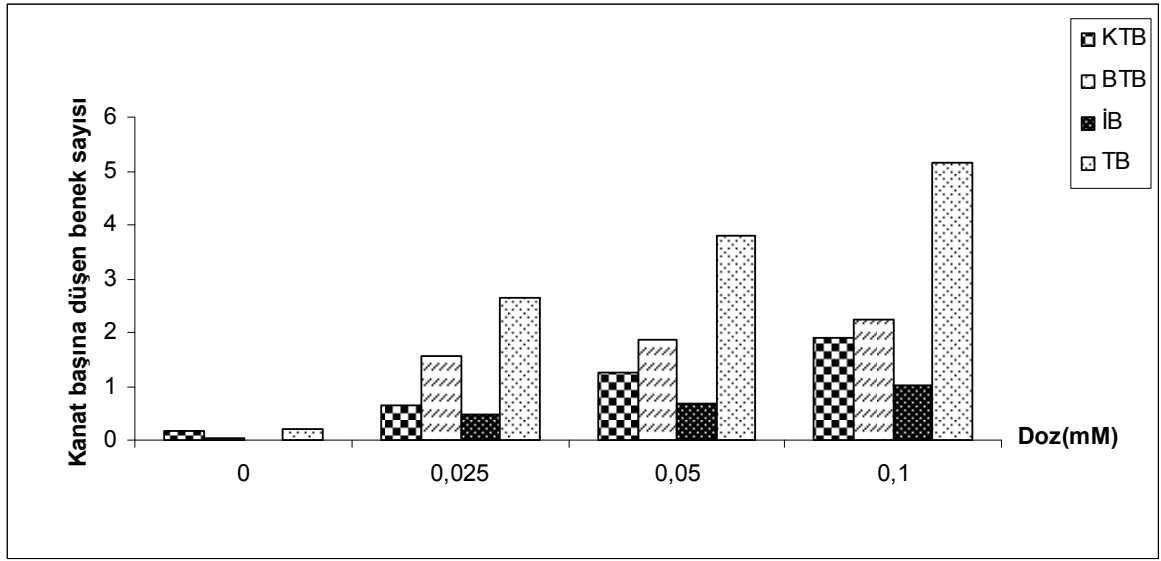
Uygulama grupları	Kanat sayısı	Benek/Kanat*	İstatistiksel Bulgular**		
		Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol					
0	90	0.18 (17)	0.03 (3)	0.01 (1)	0.22 (21)
MMC (mM)					
0.025	38	0.63 (24) +	1.55 (59) +	0.47 (18)+	2.65 (101) +
0.05	35	1.26 (44)+	1.86 (65)+	0.69 (24)+	3.81 (133) +
0.1	35	1.89 (66) +	2.23 (78) +	1.03 (36) +	5.15 (180) +

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würzler (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, kontrol grubuyla (0.5gr besiyeri+2.5 mL distile su) karşılaştırıldığında MMC'nin kullanılan tüm dozlarında (0.025 mM, 0.05 mM ve 0.1 mM) küçük tekli benekler, büyük tekli benekler, ikili benekler ve toplam benek sayıları bakımından pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, MMC'nin doz artışına bağlı olarak kanat başına düşen küçük tekli benek, büyük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sayıları artış göstermektedir. Dolayısıyla MMC'nin kullanılmış olan üç dozu da *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etki göstermektedir



Şekil 4.1. Farklı dozlarda MMC uygulanan (*mwh flr⁺/mwh⁺ flr3*) larvalarda çeşitli benek tiplerinin doza bağlı olarak indüksiyonu, KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek.

4.1.2. Fungusların genotoksik etkisinin araştırılması

Çalışmada MMC'nin genotoksik etkisine karşı fungusların antigenotoksik aktiviteye sahip olup olmadığını belirlemeden önce, kullanılan fungus dozlarının herhangi bir genotoksik etkiye sahip olup olmadığı araştırıldı. Bu bağlamda kullanılan her iki fungusun 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg olmak üzere toplam 3 farklı dozu kullanıldı. Bu dozlar *D.melanogaster*'de farklı funguslarla yapılan çalışmalar dikkate alınarak seçilmiştir [8].

4.1.2.1. *Trametes versicolor*'ın genotoksik etkisinin araştırılması

T.versicolor'ın 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg olmak üzere üç farklı dozu hazır besiyerine toplam besiyeri 0.5 gr olmak üzere eklenerek kullanılmıştır. *T.versicolor*'ın kullanılan dozlarından elde edilen veriler Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 *T.versicolor* gruplarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

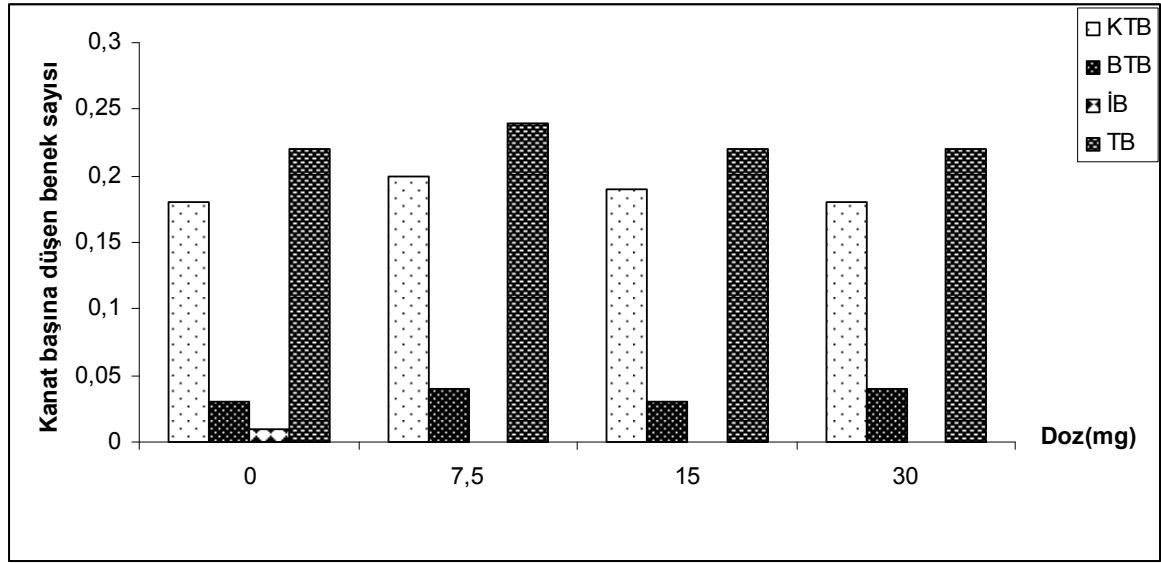
Uygulama grupları	Kanat sayısı	İstatistiksel Bulgular**			
		Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol					
0	90	0.18 (17)	0.03 (3)	0.01 (1)	0.22 (21)
<i>T.versicolor</i> (mg)					
7.5	75	0.20 (15) i	0.04 (3) i	0.00 (0) i	0.24 (18) -
15	70	0.19 (13) -	0.03 (2) i	0.00 (0) -	0.22 (15) -
30	80	0.18 (14) -	0.04 (3) i	0.00 (0) -	0.22 (17) -

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würgler (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda fungusun kullanılan tüm dozlarında, büyük tekli benekler için sonuç kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. *T.versicolor*'ın 15 ve 30 mg'lık dozunda da küçük tekli benek ve ikili benekler bakımından kontrol grubuna kıyasla azalma gözlenmiştir. Yine toplam benek sayısı bakımından tüm *T.versicolor* dozlarında kontrole kıyasla azalma gözlenmiştir.

Ayrıca Şekil 4.2'de görüldüğü gibi kontrol grubunda kanat başına düşen ikili benek sayısı 0.01 olarak gözlenmişken, *T.versicolor* fungusunun kullanılan her üç dozunda da ikili beneğe rastlanmamıştır. Yapılan çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda *T.versicolor* fungusunun kullanılan dozlarının *Drosophila melanogaster*'de herhangi bir genotoksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2. Farklı miktarlarda *T.versicolor* tozu içeren gruplarda gruplarda kanat başına düşen benek sayılarının karşılaştırılması. KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek.

4.1.2.2. *Pleurotus ostreatus*'un genotoksik etkisinin araştırılması

P.ostreatus'un 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg olmak üzere üç farklı dozu, toplam besiyeri 0.5 gr olmak üzere eklenerek kullanılmıştır. *P.ostreatus* gruplarında elde edilen veriler Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 *P.ostreatus* gruplarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

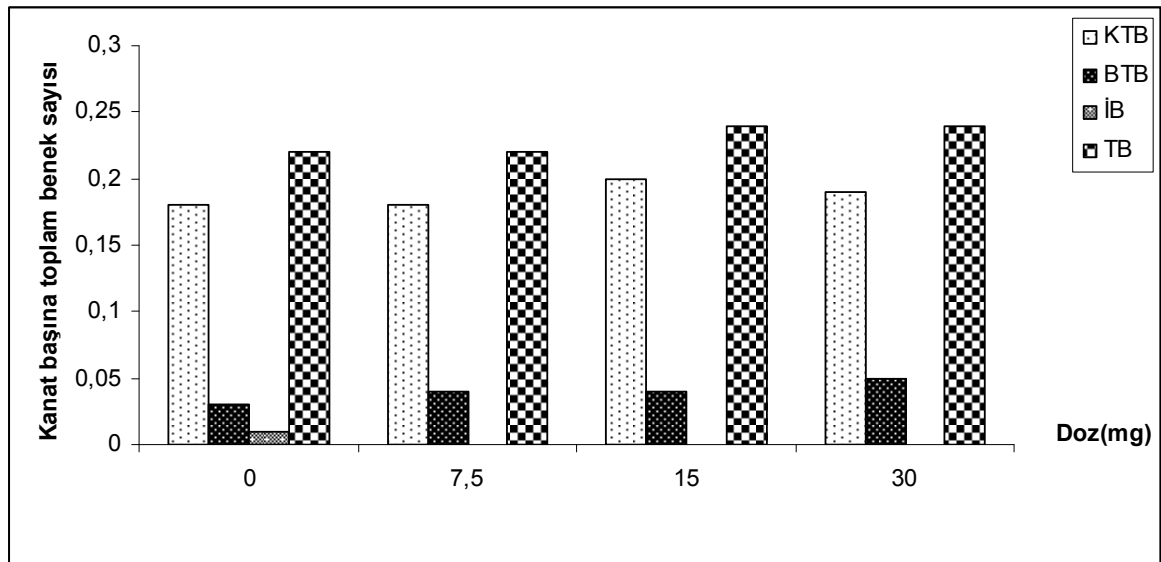
Uygulama grupları	Kanat sayısı	Benek/Kanat*	İstatistiksel Bulgular**		
		Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol					
0	90	0.18 (17)	0.03 (3)	0.01 (1)	0.22 (21)
<i>P.ostreatus</i> (mg)					
7.5	80	0.18 (14) -	0.04 (3) i	0.00 (0) -	0.22 (17) -
15	75	0.20 (15) i	0.04 (3) i	0.00 (0) -	0.24 (18) -
30	80	0.19 (15) -	0.05 (4) i	0.00 (0) -	0.24 (19) -

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würzler (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi fungusun kullanılan tüm dozlarında büyük tekli benekler için kontrol grubuna kıyasla farklılık gözlenmemiştir. İkili benekler bakımından tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla negatif sonuçlar elde edilirken, küçük tekli benekler bakımından 7.5 mg ve 30 mg fungus eklenen gruplarda negatif sonuçlar elde edilmiştir.

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi tüm benek tiplerinde kanat başına düşen benek sayısının, *P.ostreatus*’un dozlarına bağlı olmaksızın değişen sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubunda ikili beneklerin kanat başına düşen sayısı 0.01 olarak gözlenmişken, *P.ostreatus* fungusunun kullanılan her üç dozunda da ikili beneye rastlanmamıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda *Pleurotus ostreatus* fungusunun kullanılan dozlarının *Drosophila melanogaster*’de herhangi bir genotoksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Farklı miktarlarda *P.ostreatus* içeren gruplarda kanat başına düşen benek sayılarının karşılaştırılması. KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, IB; ikili benek, TB; toplam benek.

4.1.3. *Trametes versicolor*’ın MMC’ye karşı antigenotoksik aktivitesinin araştırılması

Çalışmada *T.versicolor*’ın MMC’ye karşı antigenotoksik etkisini belirlemek amacıyla 0.05 mM MMC ile fungusun üç farklı dozu birlikte uygulanmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.4’de görülmektedir.

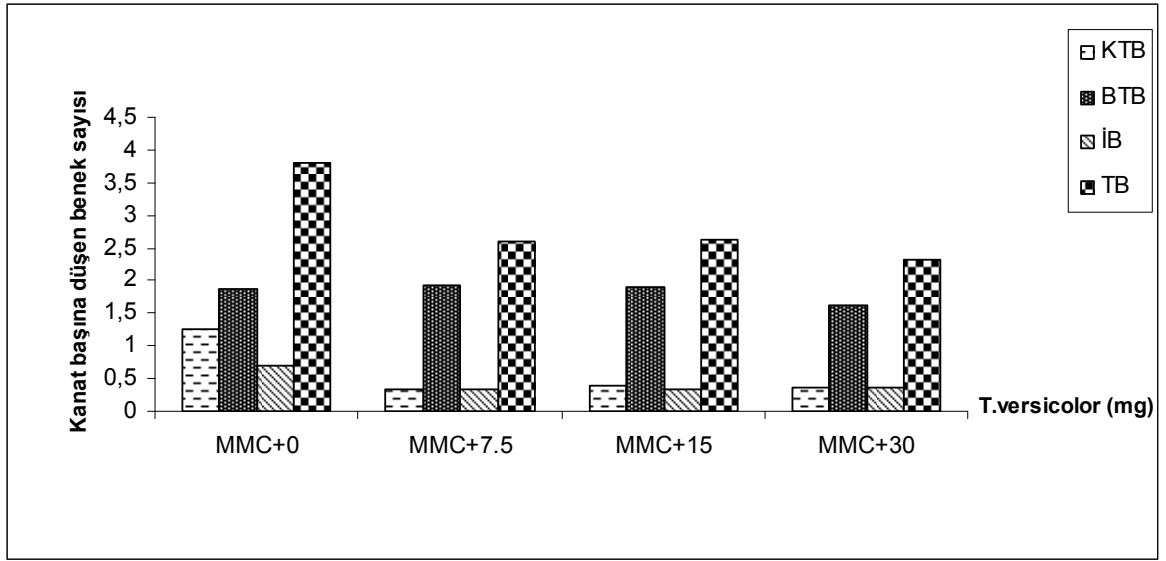
Çizelge 4.4 MMC+*T.versicolor* gruplarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Kanat sayısı	Benek/Kanat*		İstatistiksel Bulgular**		
		Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)	İnh.%
MMC						
0.05mM	35	1.26 (44)	1.86 (65)	0.69 (24)	3.81 (133)	
MMC + <i>T. versicolor</i>(mg)						
7.5	30	0.40 (12) -	1.17 (35) -	0.43 (13) -	2.00 (60) -	47.51
15	35	0.43 (15) -	1.20 (42) -	0.40 (14) -	2.03 (71) -	46.70
30	40	0.40 (16) -	0.85 (34) -	0.38 (15) -	1.63 (65) -	57.35

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würgler (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Genotoksik etkisi saptanan MMC'ye karşı *Trametes versicolor* fungusunun antigenotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla bu bölümdeki çalışmalar düzenlenmiştir. Bu amaçla *T.versicolor*'ın 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg olmak üzere üç farklı dozu, 0.05 mM MMC içeren besiyerine eklenmiştir. Tüm gruplarda 30-40 kanat, beneklerin varlığını araştırmak amacıyla taranmıştır. Benek sayılarına bakıldığında MMC grubuna kıyasla tüm MMC+ *T.versicolor* gruplarında tüm benek sayılarının azaldığı gözlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak negatif etki olarak yorumlanmıştır. Ayrıca *T.versicolor*'ın farklı dozlarıyla (7.5 mg, 15 mg ve 30 mg) 0.05 mM MMC'nin birlikte uygulanması sonucu MMC tarafından indüklenen benek sayılarını inhibisyon yüzdeleri karşılaştırıldığında, *T.versicolor*'ın 30 mg'lık dozunun uygulanması sonucu kullanılan diğer dozlardan (7.5 mg ve 15 mg) daha yüksek oranda inhibisyon yüzdesi gözlenmiştir. *T.versicolor*'ın 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg'lık dozlarının uygulanması sonucunda, MMC tarafından oluşturulan toplam benek sayılarının sırasıyla %47.51, %46.70 ve %57.35 oranında inhibe edildiği gözlenmiştir(Çizelge 4.4 ve Şekil4.4).



Şekil 4.4. MMC (0.05 mM) ile birlikte uygulanan *T.versicolor*'ın farklı dozlarının (7.5mg, 15mg ve 30mg) varlığında gözlenen çeşitli benek tiplerinin karşılaştırılması. KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek.

0.05 mM MMC uygulaması sonucu kanat başına düşen toplam benek sayısı 3.81 iken, 7.5 mg *T.versicolor* ile 0.05 mM MMC'nin birlikte uygulanması sonucu gözlenen, kanat başına düşen toplam benek sayısı 2.00'dır. Aynı şekilde 0.05 mM MMC ile birlikte *T.versicolor*'ın 15 mg'ının uygulanması sonucunda gözlenen, kanat başına toplam benek sayısı 2.03 iken, fungusun 30 mg'lık dozuyla birlikte uygulanması sonucu gözlenen kanat başına düşen toplam benek sayısı 1.63 olarak belirlenmiştir. Buna bağlı olarak uygulanan fungus dozlarına bağlı olmaksızın, her üç dozda da tüm benek tiplerinin sayısında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Dolayısıyla *Trametes versicolor* fungusunun MMC ile indüklenen benek sıklığını belirgin ölçüde azalttığı ve MMC'nin genotoksik etkisini ortadan kaldırarak, antigenotoksik aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

4.1.4. *Pleurotus ostreatus*'un MMC'ye karşı antigenotoksik aktivitesinin araştırılması

Çalışmada *P.ostreatus*'un MMC'ye karşı antigenotoksik etkisini belirlemek amacıyla 0.05 mM MMC ile fungusun üç farklı dozu (7.5 mg, 15 mg ve 30 mg) birlikte uygulanmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.5'de görülmektedir.

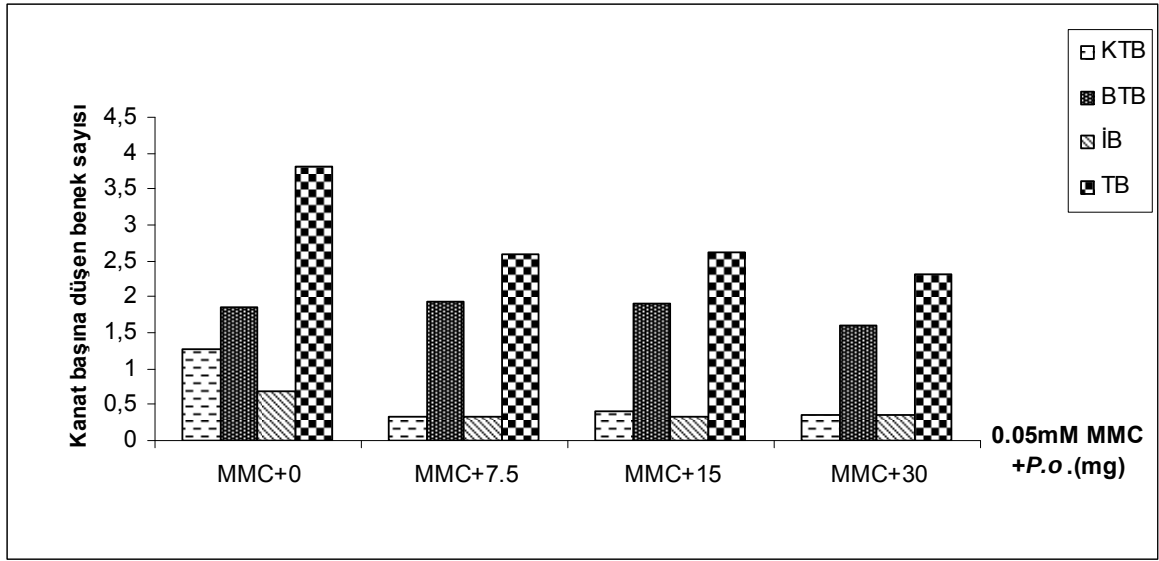
Çizelge 4.5 MMC+*P.ostreatus* gruplarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Kanat sayısı	Benek/Kanat*	İstatistiksel Bulgular**			
		Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)	İnh.%
MMC						
0.05mM	35	1.26 (44)	1.86 (65)	0.69 (24)	3.81 (133)	
MMC + <i>P. ostreatus</i>(mg)						
7.5	30	0.33 (10) -	1.93 (58) -	0.33 (10) -	2.60 (78)-	32
15	30	0.40 (12) -	1.90 (57) -	0.34 (10) -	2.63 (79) -	31
30	49	0.35 (17) -	1.61 (79) -	0.35 (17) -	2.31 (113) -	39.37

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würger (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Genotoksik etkisi saptanan MMC'ye karşı *Pleurotus ostreatus* fungusunun antigenotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla bu bölümdeki çalışmalar düzenlenmiştir. Bu amaçla *P.ostreatus*'un 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg olmak üzere üç farklı dozu, 0.05 mM MMC içeren besiyerine eklenmiştir. Tüm gruplarda 30-50 kanat, beneklerin varlığını araştırmak amacıyla taranmıştır. Benek sayılarına bakıldığında MMC grubuna kıyasla tüm MMC+ *T.versicolor* gruplarında kanat başına düşen toplam benek sayılarının azaldığı gözlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak negatif etki olarak yorumlanmıştır. Ayrıca *P.ostreatus*'un farklı dozlarıyla (7.5 mg, 15 mg ve 30 mg) 0.05 mM MMC'nin birlikte uygulanması sonucu MMC tarafından indüklenen benek sayılarını inhibisyon yüzdeleri karşılaştırıldığında, *P.ostreatus*'un 30 mg'lık dozunun uygulanması sonucu kullanılan diğer dozlardan (7.5 mg ve 15 mg) daha yüksek oranda inhibisyon yüzdesi gözlenmiştir. *P.ostreatus*'un 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg'lık dozlarının uygulanması sonucunda, MMC tarafından oluşturulan toplam benek sayılarının sırasıyla %32, %31 ve %39.37 oranında inhibe edildiği gözlenmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil4.5).

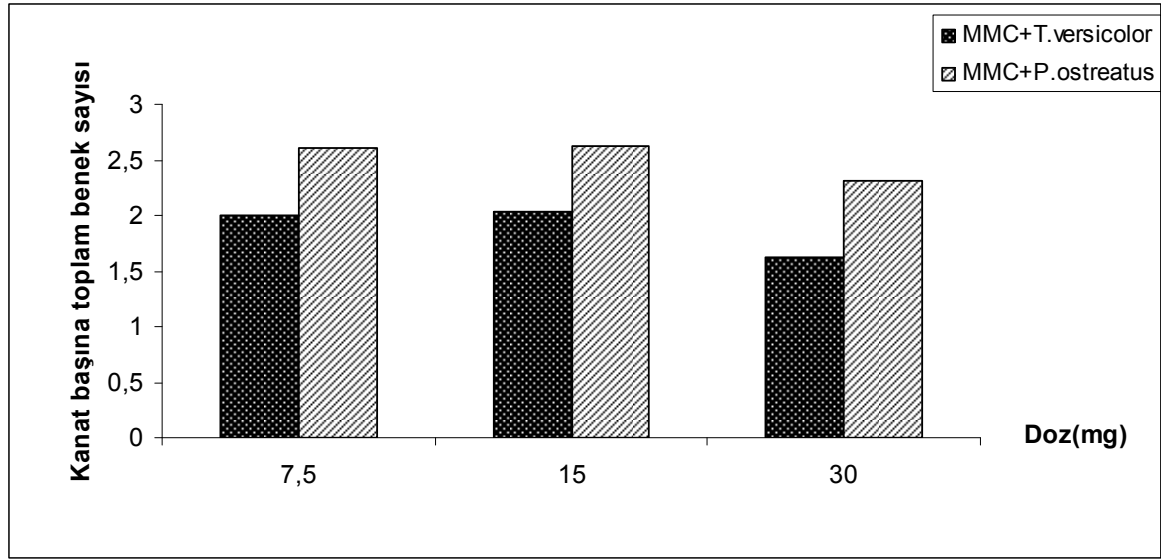


Şekil 4.5. MMC (0.05 mM) ile birlikte uygulanan *P.ostreatus*'un farklı dozlarının varlığında (7.5mg, 15mg ve 30mg) gözlenen çeşitli benek tiplerinin karşılaştırılması. KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, IB; ikili benek, TB; toplam benek.

0.05 mM MMC ile farklı dozlarda *P.ostreatus* fungus tozlarının beraber uygulanması sonucunda, 0.05 mM MMC kontrol grubunda gözlenen toplam benek sayılarından daha az sayıda benek oluşumu gözlenmiştir. 0.05 mM MMC uygulaması sonucu kanat başına düşen toplam benek sayısı 3.81 iken, 7.5 mg *P.ostreatus* ile 0.05 mM

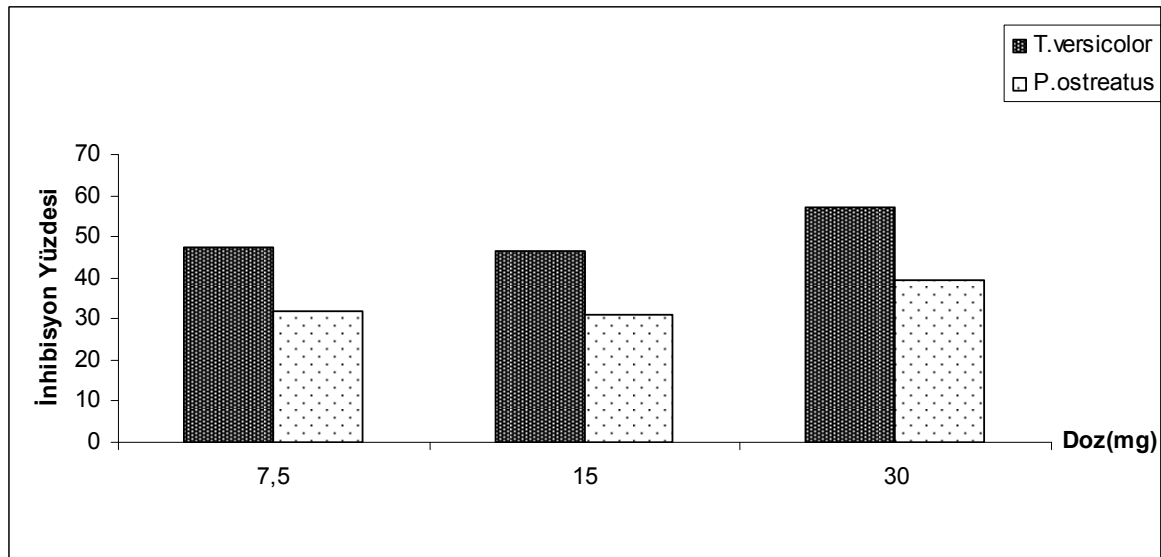
MMC'nin birlikte uygulanması sonucu gözlenen, kanat başına düşen toplam benek sayısı 2.06'dır. Aynı şekilde *P.ostreatus*'un 15 mg'lık dozunun 0.05 mM MMC ile birlikte uygulanması sonucunda gözlenen, kanat başına düşen toplam benek sayısı 2.63 iken, fungusun 30 mg'lık dozuyla 0.05 mM MMC'nin birlikte uygulanması sonucu gözlenen kanat başına düşen toplam benek sayısı 2.31 olarak belirlenmiştir.

Ayrıca Şekil 4.6'de görüldüğü gibi MMC ile *T.versicolor*'ın farklı dozlarının birlikte uygulanması sonucu gözlenen kanat başına düşen toplam benek sayısı, *P.ostreatus*'un aynı dozlarının MMC ile birlikte uygulanması sonucu gözlenen kanat başına düşen toplam benek sayısından daha azdır.



Şekil 4.6. 0.05 mM MMC ile birlikte, *T.versicolor* ve *P.ostreatus*'un farklı dozlarının (7.5 mg, 15mg ve 30mg) uygulanması sonucu gözlenen toplam benek sayılarının karşılaştırılması. MMC+*T.versicolor*; 0.05mM MMC ve *T. versicolor*'ın birlikte uygulanması sonucu gözlenen toplam benek sayısı, MMC+*P.ostreatus*; 0.05mM MMC ve *P.ostreatus*'un birlikte uygulanması sonucu gözlenen toplam benek sayısı.

Şekil 4.7'de *T.versicolor* ve *P.ostreatus* funguslarının MMC tarafından indüklenen toplam benek sayısını inhibe etme yüzdeleri görülmektedir.



Şekil 4.7. *T.versicolor* ve *P.ostreatus*'un farklı dozlarının (7.5mg, 15mg ve 30mg) uygulanması sonucu gözlenen MMC tarafından indüklenen kanat başına düşen toplam benek sayılarını inhibe etme yüzdelerinin karşılaştırılması. *T.versicolor*; *T.versicolor*'ın MMC tarafından indüklenen toplam benek sayısını inhibe etme yüzdesi, *P.ostreatus*; *P.ostreatus*'un MMC tarafından indüklenen toplam benek sayısını inhibe etme yüzdesi.

Elde edilen sonuçlara göre 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg *T.versicolor* uygulamasının MMC tarafından indüklenen toplam benek sayılarını inhibe etme yüzdeleri sırasıyla %47.51, %46.70 ve %57.35 olarak bulunmuştur. Aynı dozlarda uygulanan *P.ostreatus*'un MMC tarafından indüklenen toplam benek sayılarını inhibe etme yüzdeleri ise sırasıyla %32, %31 ve %39.37 olarak gözlenmiştir. Dolayısıyla *T.versicolor*'ın kullanılan tüm dozlarının MMC tarafından indüklenen toplam benek sayısını, aynı dozlarda uygulanan *P.ostreatus*'a göre daha yüksek oranda inhibe ettiği gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Besinler ile alınan bir çok bileşen, karsinojenlerin oluşturduğu genotoksik etkiyi azaltmakta ve antigenotoksik aktivite göstermektedir [5,6,7]. Bu bağlamda özellikle funguslardan elde edilen ve biyolojik olarak aktif olan çeşitli bileşenler, antigenotoksik aktivite göstermektedir. Dolayısıyla çeşitli mutajenlerle oluşan genotoksik etki, bu fungusların antigenotoksik aktivitesine bağlı olarak azalmaktadır [8].

Bu çalışmada, Mitomisin-C ile indüklenmiş genotoksik etkiye karşı beyaz çürükçül funguslardan olan *Trametes versicolor* ve *Pleurotus ostreatus*’un antigenotoksik aktivitesi *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılmıştır. Çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullandığımız MMC’nin 0.025 mM, 0.05 mM ve 0.1 mM olmak üzere üç farklı dozu kullanılmıştır. Ayrıca *T.versicolor* ve *P.ostreatus* funguslarının da 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg’lık dozları kullanılmıştır.

Mitomisin-C (MMC) *Streptomyces caespitosus*’tan elde edilen, karsinojenik ‘kiron’ ve ‘oktan’ grupları ve ‘azoürüdin’ halkası taşıyan sitotoksik bir antibiyotiktir. Mitomisin-C önceleri antibakteriyel olarak kullanılmasına karşın, son yıllarda gastrointestinal sistem; akciğer, meme ve mesane kanserlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. MMC’nin metabolizasyonu sonucu oluşan metabolitleri genotoksik etkilere neden olmaktadır. Mitomisin-C radikaller üreterek ve DNA alkilasyonu ile DNA iplikçiklerinde kırılmalara yol açarak replikasyonu engellemekte ve nokta mutasyonlarına neden olmaktadır. Ayrıca hücre döngüsünün G1 ve S fazlarında DNA’yı etkileyerek bölünmeyi bloke etmek gibi genotoksik etkiler de göstermektedir [90,91,92].

Çalışmamızın daha önce yürütülen çalışmalardan en önemli farkı, kullandığımız fungusların antigenotoksik etkisini belirleyebilmek amacıyla model organizma olarak *Drosophila melanogaster*’in kullanılmasıdır. Zira fungusların antigenotoksik aktivitesine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmasına karşın, literatürde bu bağlamda SMART testinin kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Ayrıca ilk kez bu çalışmayla *Trametes versicolor* fungusunun antigenotoksik aktivitesi SMART ile araştırılmıştır. Bu çalışmada MMC, bilinen genotoksik etkileri nedeniyle kendi koşullarımızda *D.melanogaster* SMART testinin çalıştığını göstermek amacıyla pozitif kontrol grubu olarak seçilmiştir. MMC’nin pozitif kontrol grubu olarak kullanıldığı bir çok çalışma rapor edilmiştir [93].

Çalışmada kullanılan SMART testi yüksek ökaryotik organizmaların somatik hücrelerinde heterozigotluğun kaybedilmesi ilkesine dayanan hızlı, ekonomik, somatik

mutasyon ve rekombinasyonlara duyarlı *in vivo* bir testtir [94]. Bu test sistemi çeşitli avantajları nedeniyle tercih edilen standart bir yöntemdir [95]. Bu test olası mutajenlerin neden olacağı genotoksik etkileri mutant hücre klonları olarak tespit etmeye olanak sağlar. Mutant hücre klonları, ergin sineğin kanatlarında delesyonlar, nokta mutasyonlar ve mitotik rekombinasyon sonucu ortaya çıkar ve tekli benek ve ikili benek olarak sınıflandırılır. Tekli benekler *mwh* veya *flr* fenotipindeki hücrelerden oluşur. Tekli benekler arasında 1-2 hücreli olanlar küçük tekli benekler olarak isimlendirilirken, 3 ve daha fazla sayıda hücre gruplarından oluşan beneklere ise büyük tekli benekler denir. İkili benekler ise *mwh* ve *flr* fenotipinin her ikisinin yan yana hücre gruplarında birlikte bulunduğu beneklerdir [45]. Beneklerin farklı tipleri farklı genetik mekanizmalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Tekli benekler nokta mutasyon, delesyon ve iki işaret gen (*mwh* ve *flr*) arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşurken, ikili benekler 3. kromozomun sentromeri ve *flr* geni arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır [45,61,68].

Çalışmada standart çapraz kurulmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi MMC’nin kullanılan tüm dozlarında tüm benek tipleri ve toplam benek sayıları bakımından pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre MMC, kullandığımız tüm dozlarda (0.025 mM, 0.05 mM ve 0.1 mM) ve tüm benek çeşitlerinde kanat başına düşen benek sayısını kontrole göre önemli ölçüde arttırmıştır. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi bu artış doz artışına paralel olarak bulunmuştur. Kanat başına düşen toplam benek sayısı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kontrol grubunda kanat başına düşen toplam benek sayısı 0.22 iken, 0.025mM, 0.05mM ve 0.1mM MMC uygulanması sonucu kanat başına düşen toplam benek sayısı sırasıyla 2.65, 3.81 ve 5.15 olarak bulunmuştur.

Çalışmada kullandığımız beyaz çürükçül fungusların antigenotoksik aktivitelerini saptamadan önce herhangi bir genotoksik etkiye sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla, fungusların 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg olmak üzere üç farklı dozu kullanılmıştır. Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda toplam benek sayıları bakımından her iki fungus içinde toplam benek sayıları bakımından sonuçlar negatif olarak yorumlanmış ve kontrol grubuyla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubunda kanat başına düşen toplam benek sayısı 0.22 olarak gözlenmişken, *T.versicolor*’ın 7.5mg, 15mg ve 30mg’lık dozlarının uygulanması sonucu kanat başına düşen toplam benek sayıları sırasıyla 0.24, 0.22 ve 0.22 olarak gözlenmiştir. Aynı şekilde *P.ostreatus*’un aynı dozlarının uygulanması sonucu kanat başına düşen toplam benek sayısı sırasıyla 0.22, 0.24 ve 0.24 olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak kullanılan fungusların hiçbir

dozunun *Drosophila melanogaster*'de herhangi bir genotoksik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir [8].

Beyaz çürükçül fungusların antigenotoksik aktivitesini belirlemeye yönelik çeşitli çalışmalar vardır [8,71,96]. Ancak SMART testinin kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Bu çalışmalardan biri Taira vd. [8] tarafından rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada araştırmacılar, yenilebilir özellikteki beyaz çürükçül funguslardan *Agrocybe cylindracea*, *Lentinula edodes* ve *Pleurotus ostreatus* funguslarının çeşitli mutajenlerin genotoksitesisi üzerindeki hafifletici etkisini, SMART ve *Drosophila* DNA tamir testini kullanarak ortaya koymuşlardır. DNA tamir testi için *Drosophila* larvaları, 100mg kurutulmuş fungus tozu yada buna eşdeğer miktardaki suda çözünebilen fungusun ekstraktı varlığında, 2.5 ml distile su ve 0.75 gr besiyeri ile hazırlanan besiyeriyle beslenmişlerdir. SMART testinde ise üçüncü instar dönemindeki larvalar, toplam 6.5 gr besiyerinde 200 mg kurutulmuş fungus tozu ya da buna eşdeğer miktardaki suda çözünebilen fungus ekstraktının varlığında yada yokluğunda, mutajenlerin çeşitli miktarlarıyla beslenmişlerdir. Yapılan çalışmada fungus tozlarıyla birlikte, 2-AAF (2-asetilaminofluoren), aflotoksin B1, DMBA (7,12-dimetilbenzo[*a*]antrasen), MelQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5*f*]quinoxaline), MNU (*N*-metil-*N*-nitrosourea), NDMA (*N*-nitrosodimetilamin) ve 4NQO (4-nitroquinolin *N*-oxide) mutajenleri de test edilmiştir [8]. Bu çalışma bizim çalışmamızla benzer olmakla birlikte, bu çalışmadan farklı olarak *P.ostreatus* ve *T.versicolor* fungusları kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada fungusların toplam 6.5 gr besiyerinde 200 mg olacak şekilde tek bir dozu uygulanmışken, bizim çalışmamızda bu çalışmada kullanılan dozun yanı sıra, bu dozun yarısı ve iki katına karşılık gelen dozları da üçüncü instar dönemindeki larvalara uygulanmıştır. Ayrıca çalışmamızda bu çalışmada kullanılmayan ve oldukça yüksek genotoksik etkiye sahip olan Mitomisin C kullanılmıştır.

Taira vd. [8] tarafından yapılan bu çalışmada *A. cylindracea* ve *P. ostreatus* funguslarının kurutulmasıyla elde edilen tozlar, test edilen her bir mutajen tarafından oluşturulan DNA hasarını baskılayıcı özellik gösterirken, *L. edodes*'in yalnızca aflatoksin B1, NDMA, MNU ve 4NQO mutajenlerinin oluşturduğu DNA hasarı üzerine inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda *Agrocybe* genusuna dahil olan fungusların antirekombinojenik aktivite içeren, antigenotoksik etkiye sahip olan bileşenleri içerdiği belirtilmiştir. *A.cylindracea* fungusunda bulunan antigenotoksik faktörlerin muhtemel olarak peptidler yada proteinler olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca *Drosophila melanogaster* dışında farklı organizmalar üzerinde de, beyaz çürükçül fungusların antigenotoksik aktivitesini belirlemeye yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Buna bağılı olarak pek çok beyaz çürükçül fungusun içerdığı çeşitli bileşenlerden ötürü antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [8,31,71].

Çalışmamızda kullanılan beyaz çürükçül fungusların antigenotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla, genotoksik etkisi saptanan MMC'nin 0.05 mM'lık dozuna karşılık *T.versicolor* ve *P.ostreatus* funguslarının üç farklı dozu (7.5 mg, 15 mg ve 30 mg) kullanılmıştır. Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi *T.versicolor* dozlarının ayrı ayrı 0.05mM MMC ile birlikte uygulanması sonucunda kanat başına düşen küçük tekli benek, büyük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sayısı bakımından 0.05 mM MMC'nin uygulandığı kontrol grubundan daha az sayıda benek oluşumu gözlenmiştir. 0.05 mM MMC uygulanması sonucu kanat başına düşen toplam benek sayısı 3.81 olarak gözlenmişken, fungusun 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg'lık dozlarının 0.05 mM MMC ile birlikte uygulanması sonucu kanat başına düşen toplam benek sayıları sırasıyla 2.00, 2.03, 1.63 olarak gözlenmiştir. Buna bağılı olarak uygulanan fungus dozlarına bağılı olmaksızın, her üç dozda da tüm benek tiplerinin sayısında 0.05 mM MMC grubuyla karşılaştırıldığında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda MMC ile beraber uygulanan tüm fungus dozlarında, Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi tüm benek tipleri için sonuçlar negatif olarak yorumlanmıştır. Dolayısıyla *Trametes versicolor* fungusunun MMC ile indüklenen benek sıklığını belirgin ölçüde azalttığı ve MMC'nin genotoksik etkisini ortadan kaldırarak, antigenotoksik aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.4'de antigenotoksik etkisi belirlenen *T.versicolor* fungusunun kullanılan dozlarının MMC tarafından indüklenen benekleri inhibe ettiği görülmektedir. En yüksek inhibisyon yüzdesi, fungusun 30 mg'lık dozunun kullanılmasıyla gözlenmiştir. Bu bağlamda 0.05mM MMC ile birlikte 30mg'lık fungus dozunun uygulanması sonucu, MMC tarafından oluşturulan kanat başına düşen toplam benek sayısının %57.35 oranında inhibe edildiği gözlenmiştir. Buna karşılık 0.05mM MMC ile birlikte fungusun 7.5 mg ve 30 mg'lık dozlarının beraber uygulanması, MMC tarafından oluşturulan kanat başına düşen toplam benek sayılarını sırasıyla %47.51 ve %46.7 oranında inhibe etmektedir. Dolayısıyla fungusun 7.5 mg ve 15mg'lık dozlarının MMC tarafından indüklenen benekleri inhibe etme yüzdeleri birbirine oldukça yakinken, en yüksek inhibisyon yüzdesi 30mg'lık dozun kullanılması sonucu gözlenmiştir. Sonuç olarak 0.05 mM MMC ile indüklenen toplam benek sayısını en yüksek oranda inhibe eden *T.versicolor* dozu 30 mg olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi *P.ostreatus* dozlarının ayrı ayrı 0.05 mM MMC ile birlikte uygulanması sonucunda kanat başına düşen toplam benek sayısı bakımından 0.05

mM MMC'nin uygulandığı kontrol grubundan daha az sayıda benek oluşumu gözlenmiştir. 0.05 mM MMC uygulanması sonucu kanat başına düşen toplam benek sayısı 3.81 olarak gözlenmişken, fungusun 7.5 mg, 15 mg ve 30 mg'lık dozlarının 0.05 mM MMC ile birlikte uygulanması sonucu kanat başına düşen toplam benek sayıları sırasıyla 2.00, 2.03, 1.63 olarak gözlenmiştir. Ayrıca 0.05 mM MMC uygulanması sonucu kanat başına düşen büyük tekli benek sayısı 1.86 olarak gözlenmişken, *P.ostreatus*'un 7.5 mg ve 15 mg'lık dozlarıyla 0.05 mM MMC'nin birlikte uygulanması sonucu kanat başına düşen büyük tekli benek sayıları sırasıyla 1.93 ve 1.90 olarak gözlenmiştir. Bu değerler 0.05mM MMC grubunda gözlenen büyük tekli benek sayısından daha fazla olmasına rağmen, yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda büyük tekli benekler için sonuçlar negatif olarak yorumlanmıştır. Dolayısıyla *Pleurotus ostreatus* fungusunun MMC'nin genotoksik etkisini ortadan kaldırarak, antigenotoksik aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

T.versicolor ve *P.ostreatus* funguslarının farklı dozlarıyla 0.05 mM MMC'nin birlikte uygulanması sonucu MMC tarafından indüklenen benek sayılarını inhibisyon yüzdeleri karşılaştırıldığında, Şekil 4.8'de görüldüğü gibi *T.versicolor*'ın kullanılan tüm dozlarının MMC tarafından oluşturulan kanat başına düşen toplam benek sayısını aynı dozlarda uygulanan *P.ostreatus*'a göre daha yüksek oranda inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca Şekil 4.6'da görüldüğü gibi MMC ile *T.versicolor*'ın farklı dozlarının birlikte uygulanması sonucu gözlenen kanat başına düşen toplam benek sayısı, *P.ostreatus*'un aynı dozlarının MMC ile birlikte uygulanması sonucu gözlenen kanat başına düşen toplam benek sayısından daha azdır. Buna bağlı olarak *T.versicolor* fungusunun, *P.ostreatus*'a göre MMC'nin neden olduğu genotoksik etkiye karşı, daha yüksek oranda antigenotoksik aktivite gösterdiğini söyleyebiliriz.

Mitomisin-C ve metabolik aktivasyon sonucu genotoksik olabilen promutajenlerin olumsuz etkilerinin, sentetik yada doğal çeşitli moleküllerle engellenebildiği, farklı test sistemlerinde gösterilmiştir. Bu etkilerin, tamir mekanizmaların indüklenmesi, genotoksinlere bağlanıp, DNA'ya bağlanmalarını engelleme veya enzim aktivitelerini inhibe ederek metabolizmalarını bloke etme gibi çeşitli şekillerde engellemesi antigenotoksisite ve bu aktiviteleri gösteren moleküller ise antigenotoksik ajan veya antimutajen olarak değerlendirilir [79,90]. Bu bağlamda tıbbi açıdan önemli olan çeşitli biyopolimerleri içeren fungusların, MMC gibi çeşitli mutajenlerin etkisine bağlı olarak ortaya çıkan DNA iplikçiklerindeki kırılmaları engelledikleri ve buna paralel olarak gelişen nokta mutasyonlarını da önleyebildiklerini söyleyebiliriz.

Bilindiği gibi DNA polimeraz β , tamir mekanizmasında görev alan ve kesip-çıkarma tamiri sonucu DNA zincirinde meydana gelen boşlukları doldurabilme yeteneğine sahip olan önemli bir enzimdir. Linoleik asit in vitro koşullarda DNA polimeraz β ile etkileşime girebilme yeteneğine sahip olması bakımından büyük önem taşımaktadır. Linoleik asit enzim aktivitesi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahiptir ve bu etkiye bağlı olarak da DNA'da meydana gelen hasarları azaltmaktadır. Dolayısıyla yapılan çalışmalarla pek çok beyaz çürükçül fungusun linoleik asit içeriğiyle antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [14].

T.versicolor miselinin ekstraksiyonundan elde edilen PSK ve PSP ile yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Özellikle Asya ülkelerinde mide, akciğer ve özafagus gibi çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde radyoterapi ve kemoterapiye ek olarak hem PSP hem de PSK yoğun olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar PSK ve PSP'nin herhangi bir mutajenik aktiviteye sahip olmadığını göstermektedir [97].

T.versicolor'ın tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemeye yönelik çeşitli çalışmalarda yapılmıştır. Bu bağlamda Harhaji vd. [70] yapmış oldukları bir çalışmada, beyaz çürükçül özelliğe sahip olan *Trametes versicolor* fungusunun polifenol ve terpenoid içerikli metanol ekstraktının, hem *in vivo*, hem de *in vitro* şartlarda B16 fare melanoma hücreleri üzerinde ki antitümör etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda metanol ekstraktın direkt olarak hem tümör hücrelerinin çoğalmasını engellediği hem de tümör hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olduğu saptanırken, indirekt olarak da makrofajları uyarmak suretiyle antitümör aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızda beyaz çürükçül funguslardan *T.versicolor* ve *P.ostreatus*'un antigenotoksik aktiviteleri *Drosophila melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılmıştır. Buna bağlı olarak her iki fungusun da MMC tarafından indüklenen benek sıklığını belirgin ölçüde azalttığı ve antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Özellikle biyoteknolojik açıdan da büyük önem taşıyan *T.versicolor*'ın, *P.ostreatus*'tan daha yüksek oranda antigenotoksik aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışma pek çok fungusun, besinsel değerlerinin yanı sıra tıbbi açıdan da büyük önem taşıdığını göstermektedir.

Sonuç olarak özellikle beyaz çürükçül funguslardan elde edilen ve antigenotoksik etkiye sahip olan polimerlerin, değerlendirilmesi ve karakterizasyonu üzerindeki etkili araştırmalar öncülüğünde, insan sağlığında bu polimerlerin uygulanmasını mümkün kılmaktadır. Sahip olduğu enzim sistemleri ve genetik mekanizmaları nedeniyle en çok tercih edilen model organizmalardan biri olan *D. melanogaster* ile yapılan bu çalışmanın

insan sağlığı açısından göz önüne alınması gerektiği kanaatine ulaşılmış olup, konunun daha iyi aydınlatılması bakımından ileri düzeyde çalışmalar yapılması önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] H.Ü Lüleyp, *Moleküler Genetiğin Esasları*, Nobel Kitabevi, 2008, s.112.
- [2] N. Gürbüz, *Antimutajenler ve Antikarsinojenler (Kanser gelişiminin Kimyasal Bileşenlerle Önlenmesi)*, **Türkiye Klinikleri J Med Sci.**, (2006) 26:312-318.
- [3] R. Bruni, D. Rossi, M. Muzzoli, C. Romagnoli, G. Paganetto, E. Besco, F. Choquecillo, K. Peralta, W.S. Lora, G. Sacchetti, *Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of Maytenus krukovi bark*, **Fitoterapia**, (2006) 538-545.
- [4] E.E. Doğan, *Bazı Astrozon Grubu Tekstil Boyalarının Genotoksik Etkisinin Drosophila melanogaster Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) İle Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, 2002.
- [5] T. Negishi, S. Arimoto, C. Nishizaki, H. Hayatsu, *Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2)*, **Carcinogenesis**, 10 (1989) 145-149
- [6] S.A. Kobayashi, N. Inada, Y. Sato, C. Sugiyama, K. Okamoto, H. Hayatsu, T. Negishi, *Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on the mutation, DNA strand cleavage and DNA adduct formation by heterocyclic amines*, **Food Chem.**, 51 (2003) 5150-5153.
- [7] Y.K. Kakamura, K. Kawai, H. Furukawa, T. Matsuo, K. Shimoi, I. Tomita, Y. Nakamura, *Suppressing effect of S-methyl methanethiosulfonate and diphenyl disulfide on mitomycin C-induced somatic mutation and recombination in Drosophila melanogaster and micronuclei in mice*, **Mutation Research**, 385 (1997) 41-46.
- [8] K. Taira, Y. Miyashita, K. Okamoto, S. Arimoto, E. Takahashi, T. Negishi, *Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom Agrocybe cylindracea*, **Mutation Research**, 586 (2005) 115-123.
- [9] M. Elmastas, O. Isildak, I. Turkecul, N. Temur, *Determination of antioxidant activity compounds in wild edible mushrooms*, **Journal of Composition and Analysis**, 20 (2007) 337-345
- [10] J.P.F. Angeli, L.R. Ribeiro, M.L.C. Gonzaga, S. De A. Soares, M.P.S.N. Ricardo, M.S. Tsuboy, R. Stidl, S. Knasmueller, R.E. Linhares and M.S. Mantovani, *Protective effects of β -glukan extracted from Agaricus brasiliensis againsts chemically induced DNA damage human lymphocytes*, **Cell Biol Toxicol**, 2006; 285-291.
- [11] R.P.Z. Furlani, H.T. Godoy, *Nutritional value of edible mushroom*, **Ciencia e tecnologia e tecnologia de alimentos**, 27 (2007) 154-157.
- [12] J. Wetter, C. Hajdu, J. Györfi, P. Maszlavér P., *Mineral composition of the cultivated mushrooms Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus and Lentinula edodes*, **Acta Alimentaria**, 34 (2005) 441-451.
- [13] C. Israilides, D. Kleitsas, D. Arapoglou, A. Philippoussis, H. Pratsinis, A. Ebringerova, V. Hribalova, S.E. Harding, *In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom Lentinula edodes*, **Phytomedicine**, Makale yayında.
- [14] R.C. Luiz, B.Q. Jordao, A.F. da Eira, L.R. Ribeiro, M.S. Mantovani, *Mechanism of anticlastogenicity of Agaricus blazei Murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid Exchange assays*, **Mutation Research**, 528 (2003) 75-79.
- [15] Z.R. Gutierrez, M.S. Mantovani, A.F. Eira, L.R. Ribeiro, B.Q. Jordao, *Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of a Agaricus blazei Murrill in vitro*, **Toxicology in vitro**, 18 (2004) 301-309.
- [16] S.C. Yıldırım, 'Beyaz Çürükçül Funguslarla Tekstil Boyalarının Renginin Giderilmesi' İnönü Üniversitesi, Doktora Tezi, 2007.

- [17] A. Mishra, S. Kumar, *Cyanobacterial biomass as N-supplement to agro-waste for hyber-production of laccase from Pleurotus ostreatus in solid state fermentation*, **Process Biochemistry**, 42 (2007) 681-685.
- [18] T.B. Ng, *Peptides and proteins from fungi*, **Peptides**, 25 (2004) 1055-1073.
- [19] M. Walter, K. Wilson, L. Boul, C. Ford, D. McFadden, B. Chong, J. Pinfold, *Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by Trametes versicolor*, **International Biodeterioration & Biodegration**, 56: (2005) 51-57.
- [20] A.M. Farnet, G. Gil, E. Fere, *Effects of pollutants on laccase activities of Marasmius quercophilus, a white-rot fungus isolated from a Mediterranean schlerophyllous litter*, **Chemosphere**, 70 (2008) 895-900.
- [21] F. Kuru, *Katı Substrat Fermentasyonu İle Lakkaz Üretimi*, İnönü Üniversitesi, Yüksek lisans Tezi, 2007.
- [22] M. Zhang, S W Cui, P.C.K. Cheung and Q Wang, *Antitümör polyssaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, sctuctural characteristics and antitümör activity*, **Trends in Food Science & Technology**, 18 (2007) 4-19.
- [23] R.C.R.N Menoli, M.S Mantovani, L.R. Ribeiro, G. Speit, B.Q Jordoa, *Antimutagenic effect of the mushroom Agaricus blazei Murrill extracts on V79 cells*, **Mutation Research**, 496 (2001) 5-13.
- [24] A. Aktümsek, C. Öztürk, G. Kaşık, *Agaricus bisporus (Lange) Sing. 'un Yağ Asidi Bileşimi*, **Tr. J. of Biology**, 22 (1998) 75-79.
- [25] Y. Gui, A. Grant, *Join effects of density deponce and toxicant exposure on Drosophila melanogaster populations*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 70 (2008) 236-243.
- [26] Y.H Shon, K.Y.S Nam, *Antimutagenecity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes*, **Journal of Ethnopharmacology**, 77 (2001) 103-109.
- [27] T. Jayakumar, E. Ramesh, P. Geraldine, *Antioxidant activity of the oyster mushroom, Pleurotus ostreatus, on CCL₄-induced liver injury in rats, , Food and Chemical Toxicology*, 44 (2006) 1989-1996.
- [28] J. Sandula, G. Kogan, M. Kacurakova, E. Machova, *Microbial (1 →3)- β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity*, **Carbohydrate Polymers**, 38 (1999) 247-253.
- [29] T. Kiho, I. Yoshida, K. Nagai, S. Ukai, C. Hara, *(1-3)-alphanad-glucan from an alkaline extract of Agrocybe cylindracea, and antitumor activity of its O-(carboxymethyl)ated derivatives*, **Carbohydr. Research**, 189 (1989) 273-279.
- [30] M.S. Mantovani, M.F. Bellini, J.P.F. Angeli, R.J. Oliveria, A.F. Silva, L.R. Riberio, *β-Glucans in promoting health: Prevention againts mutation and cancer*, **Mutation Research**, 658 (2008) 154-161.
- [31] L. Fan, H. Pan, A.T. Soccol, A. Pandey and C.R. Soccol, *Advances in mushroom research in the last decade*, **Food Technol. Biotechnol.**, 44 (3) 303-311 (2006).
- [32] P. Mattila, A.M. Lampi, R. Ronkainen, J. Toivo, V. Piironen, *Sterol and vitamin D₂ contents in some wild and cultivated mushrooms*, **Food Chemistry**, 76 (2002) 293-298.
- [33] V.J. Jasinghe, C.O. Perera, S.S. Sablani, *Kinetics of the conversion of ergosterol in edible mushrooms*, **Journal of Food Engineering**, 79 (2007) 864-869.
- [34] H.K.J. Yeung, P.M.Y. Or, *Effects of polysaccharide peptides from COV-1 strain of Coriolus versicolor on glutathione and glutathione-related enzymes in the mouse*, **Food and Chemical Toxicology**, 45 (2007) 953-961.
- [35] N.J. Dubost, O.U. Boxin, R.B. Beelman, *Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity*, **Food Chemistry**, 105 (2007) 727-735.

- [36] T. Kiho, S. Sobue, S. Ukai, *Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of Agrocybe cylindracea*, **Carbohydr. Res.**, 251 (1994) 81-87.
- [37] W.G. Kim, I.K. Lee, J.P. Kim, I.J. Ryoo, H. Koshino, I.D. Yoo, *New indole derivatives with free radical scavenging activity from Agrocybe cylindracea*, **J. Nat. Prod.**, 60 (1997) 721-723.
- [38] J. Cui, Y. Chisti, *Polysaccharopeptides of Coriolus versicolor: physiological activity, uses, and production*, **Biotechnology Advances**, 21 (2003) 109-122.
- [39] S.L. Chan, J.H.K. Yeung, *Polysaccharide peptides from COV-1 strain of Coriolus versicolor induce hyperalgesia via inflammatory mediator release in mouse*, **Life Science**, 78 (2006) 2463-2470.
- [40] R.M.M. Gern, E. Wisbeck, J.R. Rampinelli, J.L. Ninow, S.A. Furlan, *Alternative medium for production of Pleurotus ostreatus biomass and potential antitumor polysaccharides*, **Biosource Technology**, 99 (2008) 76-82.
- [41] R. Russell M. Paterson, *Ganoderma- A therapeutic fungal biofactory*, **Phytochemistry**, 67 (2006) 1985-2001.
- [42] J.G. Rincon ve U. Graf, *Drosophila melanogaster somatic mutation and recombination test as a biomonitor*, **Plenum Press**, New York, (1995) 169-179.
- [43] L. Özata, *Bazı tekstil boyalarının Drosophila melanogaster üzerinde toksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması*, İnönü Üniversitesi, Doktora Tezi, 2006.
- [44] U. Graf ve F.E.Würgler, *The somatic white-ivory eye spot does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster*, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 27 (1996) 219-226.
- [45] R. Sarıkaya, Ş. Çakır, *Genotoxicity testing of four food preservatives and their combination in the Drosophila melanogaster*, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 20 (2005) 424-430.
- [46] B. Falakalı, 'Drosophila Genetiği', Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:134, İzmir, 1989, s. 1-10.
- [47] M. Sato, Y. Kitada, T. Tabata, *Larval cells become imaginal cells under the control of homothorax prior to metamorphosis in the Drosophila tracheal system*, **Developmental Biology**, 318 (2008) 247-257.
- [48] M. Lehmann, A. Franco de Souza Prudente Vilar, K.S.P. Reguly, M. L. Andrade, H. H. R, *Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutation*, **Mutat. Res.**, (2003), 539.
- [49] G.R. Hoffman, *Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons*, **Pergamon Press**, New York (1991) 201-217.
- [50] A. N. Bozcuk, *Genetik*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2000, s.269.
- [51] D. Hamamcı, *Drosophila melanogaster Oregon Yabanıl Tipi Vestigial Mutantı Arasında Ömür Uzunluğu; Antioksidatif Enzimlerin ve ACE Vitamin Kompleksinin Yaşlanma İle Olan İlişkileri*, İnönü Üniversitesi, Yüksek lisans Tezi, 1993.
- [52] L. Osaba, M.J.Rey, A. Aguirre, A. Alonso ve U. Graff, *Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of Drosophila melanogaster role of nitrosation*, **Mutation Research**, 518 (2002) 95-106.
- [53] [http:// www.seop.yale.edu](http://www.seop.yale.edu)
- [54] A. Demirsoy, *Yaşamın Temel Kuralları: Omurgasızlar, cilt II*, Hacettepe Üniversitesi Yayını, Ankara, 1982, s.41.
- [55] G. R. Hoffman, *Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons*, **Pergamon Pres**, New York, 1991, s. 201-217.

- [56] M. Kuraśa, J. Nowakowskaa, E. Śliwińskab, R. Pilarskid, R. Ilasza, T. Tykarskaa, A. Zobelc and K. Gulewiczd, *Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of Allium Test induced by bark water extract of Uncaria tomentosa (Willd.) DC*, **J. Ethnopharmacol.**, 107(2):211-21, (2006).
- [57] A.D. Pereiraa, S.F. Andradeb, M.S.O. Swertsaa and E.L. Maistroc, *First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test*, **Food Chem. Toxicol.**, 46(7): 2580-4, (2008).
- [58] A.C. Bulmer, K. Ried, J.S. Coombes, J.T. Blanchfield, I. Toth and K.-H. Wagner, *The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test*, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 629 (2007) 122-132.
- [59] G.M. Alink, J.T.K. Quika, E.J.M. Penders, A. Spenkelink, S.G.P. Rotteveel, J.L. Maas and W. Hoogenboezem, *Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (Umbra pygmaea L.) after exposure to Rhine water, as assessed by use of the SCE and Comet assays: A comparison between 1978 and 2005*, **Mutation Research**, 631 (2007) 93-100.
- [60] T. Watanabe, T. Kasai, M. Arima, K. Okumura, N. Kawabe and T. Hirayama, *Genotoxicity in vivo of phenazine and aminophenazines assayed in the wing spot test and the DNA-repair test with Drosophila melanogaster*, **Mutation Research/Genetic Toxicology**, 369 (1996) 75-80.
- [61] M.E.H. Pulido, S.L. Hernandez, I.D. Garcia, I.P. Canales, L.C. Partida, C.R. Ortiz, S.F. Maya, *Genotoxicity of triasulfuron in the wing spot test of Drosophila melanogaster is modulated by winter wheat seedlings*, **Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Article in Pres.
- [62] U. Graf, S.K. Abraham, J.G. Rincon, F.E. Würzler, *Antigenotoxicity studies in Drosophila melanogaster*, **Mutation Research**, 402 (1998) 203-209.
- [63] B. Kaya, A. Yanikoğlu, A. Creus, R. Marcos, *Genotoxicity testing of five herbicides in the Drosophila wing spot test*, **Mutation Research**, 465 (2000) 77-84.
- [64] S. Ekebaş, *Bazı Kimyasal Maddelerin Mutajenik Etkisinin Drosophila'da Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Araştırılması*, Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 1998.
- [65] J.G. Rincon, J. Espinosa, U. Graf, *Analysis of the in vivo nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of Drosophila melanogaster*, **Mutation Research**, 412 (1998) 69-81.
- [66] V.S. Amaral, R.M. Silva, M.L. Reguly, H.H.R. Andrade, *Drosophila wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin*, **Mutation Research**, 583 (2005) 67-74.
- [67] U. Graf ve N.Van Schaik, *Improved high bioaktivatation cross for the wing somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster*, **Mutation Research**, 271, (1992) 59-67.
- [68] Ş. Çakır, R. Sarıkaya, *Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the Drosophila wing spot test*, **Food and Chemical Toxicology**, 43 (2005) 443-450.
- [69] J.G.Rincon, U. Graf, *Drosophila melanogaster somatic mutation and recombination test as a biomonitor,biomonitors and biomarkers as indicators of environmantal change edited by F.M. butter worth et.al*, **Plenum Pres**, NEW YORK, (1995), S.169-179.
- [70] L.J. Harhaji, S. Mijatovic, D.M. Ivanic, I. Stojanovic, M. Momcilovic, V. Maksimovic, S. Tufegdzic, Z. Marjanovic, M.M. Stojkovic, Z. Vucinic, S.S. Grujicic, *Anti-tumor effect of Coriolus versicolor methanol extract againts Mouse B16 melanoma cells: In vitro and in vivo study*, **Food and Chemical Toxicology**, 46 (2008) 1825-1833.

- [71] I.K. Lee, Y.S. Kim, Y.W. Jang, J.Y. Jung and B.S. Yun, *New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom Inonotus obliquus*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 17 (2007) 6678-6681.
- [72] L.C. Fernandes, J.H.C. Lima, B.C. Figueiredo, R. Di Bernardi, A.N. Moreno, F. Leifa, C.R. Soccol, *High immunomodulatory and preventive effects against sarcoma 180 in mice fed with Ling Zhi or Reishi mushroom Ganoderma lucidum (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae) mycelium*, **International Journal of Medicinal Mushroom**, (2008), 37-48.
- [73] C.K. Miyajii, B.Q. Jordao, L.R. Riberio, A.F. Eira, I.M.S Colus, *Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (Lentinula edodes (Berkeley) Pegler) using the Comet assay*, **Genetics and Molecular Biology**, 27 (2004) 108-114.
- [74] M. Idaomar, R. El Hamss, F. Bakkali, N. Mezzoug, A. Zhiri, D. Baudoux, A. Munoz-Serrano, V. Liemens, A. Alonso-Moraga, *Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of Drosophila melanogaster*, **Mutation Research**, 513 (2002) 61-68.
- [75] E. Yeşilada, *The Effect of Kinetin, Gibberellic Acid and Indole Acetic Acid on EMS-Induced Somatic Mutation and Recombination in Drosophila melanogaster*, **Turk J Biol**, 24 (2000) 279-284.
- [76] B. Kaya, A. Creus, A. Velazquez, A. Yanikoğlu, R. Marcos, *Genotoxicity is modulated by ascorbic acid Studies using the wing spot test in Drosophila*, **Mutation Research**, 520 (2002) 93-101.
- [77] E. Takahashi, T.H. Marczylo, T. Watanabe, S. Nagai, H. Hayatsu, T. Negishi, *Preventive effects of anthraquinone food pigments on the DNA damage induced by carcinogens in Drosophila*, **Mutation Research**, 480-481 (2001) 139-145.
- [78] M. Niikawa, H. Nagase, *Effect of aspirin on DNA damage induced by MMC in Drosophila*, **Biomedicine&Pharmacotherapy**, 61 (2007) 250-253.
- [79] P. Laohavechvanich, K. Kangsadalampai, N. Tirawanchai, A.J. Ketterman, *Effect of different Thai traditional processing of various hot chili peppers on urethane-induced somatic mutation and recombination in Drosophila melanogaster: Assesment of the role of glutathione transferase activity*, **Food and Chemical Toxicology**, 44 (2006) 1348-1354.
- [80] S.K. Abraham, *Antigenotoxicity of coffee in the Drosophila assay for somatic mutation and recombination*, **Mutagenesis**, 9 (1994) 383-386.
- [81] W.F. Costa, J.C. Nepomuceno, *Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of Drosophila melanogaster*, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 47 (2006) 18-24.
- [82] M. Stamenkovic-Radak, T. Savic, M. Vicentic, M. Andelkovic, *Antigenotoxic effects of royal jelly in the sex linked recessive lethal test with Drosophila melanogaster*, **Acta Veterinaria-Beograd**, 55 (2005) 301-306.
- [83] M. Furlanetto, M. Sinigaglia, V.S. Amaral, R.R. Dihl, H.H.R. de Andrade, *Effect of vanillin on toxicant-induced lethality in the Drosophila melanogaster DNA repair test*, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 48 (2007) 67-70.
- [84] M. Rizki, S. Armani, A. Creus, N. Xamena, *Antigenotoxic properties of selenium: Studies in the wing spot test in Drosophila*, **Environmental and Molecular mutagenesis**, 37 (2001) 70-75.
- [85] M. Lehmann, U. Graf, M.L. Regulý, H.H.R. de Andrade, *Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of Drosophila melanogaster*, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 36 (2000) 195-200.

- [86] T. Negishi, H. Rai, H. Hayatsu, *Antigenotoxic activity of natural chlorophylls*, **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 376 (1997) 97-100.
- [87] V. Karekar, S. Joshi, S.L. Shinde, *Antimutagenic profile of tree antioxidant in the Ames assay and the Drosophila melanogaster wing spot test*, **Mutation Research**, 468 (2000) 183-194.
- [88] B. Lassmar, B.Valadares, *Antirecombinagenic activity of propolis against recombinagenic activity of doxorubicin in Drosophila melanogaster*, **Genetics and Molecular Biology**, 25 (2002) 3-5.
- [89] E.J. Fragiorge, M.A. Spano, L.M.G. Antunes, *Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of Drosophila melanogaster*, **Genetics and Molecular Biology**, 30 (2007) 2.
- [90] X.Y. Wu, J.J. Qian, Y. Lin, M.H. Zheng, *Hepatitis B virus X protein disrupts DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C induced ATR dependent intra-S-phase checkpoint*, **European Journal of Cancer**, (2008), Article in pres.
- [91] M.K.S. Heran, R. Baird, G.K. Blair, E.D. Skarsgard, *Topical mitomycin-C for recalcitrant esophageal strictures: a novel endoscopic/fluoroscopic technique for safe endoluminal delivery*, **Journal of Pediatric Surgery**, (2008) 43, 815-818.
- [92] M.B. Yehoyada, J. Gautier, *The DNA damage response during an unperturbed S-phase*, **DNA Repair**, 6 (2007) 914-922.
- [94] E. Demir, S. Kocaoğlu, B. Kaya, *Genotoxicity testing of four benzyl derivatives in the Drosophila wing spot test*, **Food and Chemical Toxicology**, 46 (2008) 1034-1041.
- [95] E.R. Carmona, E. Kossatz, A. Creus, R. Marcos, *Genotoxic evaluation of two mercury compounds in the Drosophila wing spot test*, **Chemosphere**, 70 (2008) 1910-1914.
- [96] C.B.S. Lau, C.Y. Ho, C.F. Kim, K.N. Leung, K.P. Fung, T.F. Tse, H.H.L. Chan, M.S.S. Chow, *Cytotoxic activities of Coriolus versicolor (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis*, **Life Sciences**, 75 (2004) 797-808.
- [97] [http://www. icnet.uk](http://www.icnet.uk)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aygöl KILIÇ
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara- 03.08.1983
Mesleği ve Ünvanı : Biyolog

EĞİTİM DURUMU

İlkokul : Fırat İlköğretim Okulu (Malatya, 1990-1995)
Ortaokul : Fırat İlköğretim Okulu (Malatya, 1995-1998)
Lise : Hacı Ahmet Akıncı Lisesi (Malatya, 1998-2000)
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü (Malatya, 2001-2005)
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı (Malatya, 2005-)

Bilimsel Faaliyetler

1. XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2002, İnönü Üniversitesi, MALATYA (Görevli)
2. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası/AYDIN
3. Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, 3-4 Mayıs 2007, İnönü Üniversitesi, MALATYA
4. VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 10-13 Eylül 2007, İnönü Üniversitesi, MALATYA