

**BAZI *PLANTAGO* EKSTRELERİNİN ANTİMUTAJENİK
ETKİLERİNİN *Salmonella/E.coli* WP2 TEST SİSTEMİYLE
BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION of ANTIMUTAGENIC EFFECTS of
SOME *PLANTAGO* EXTRACTS in THE *Salmonella/E.coli*
WP2 TEST SYSTEM**

SERPİL METİN

PROF.DR. NURAN DİRİL

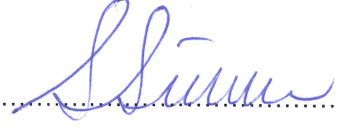
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

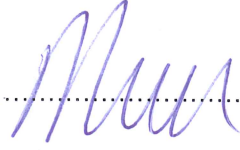
2018

SERPİL METİN' in hazırladığı "**Bazı Plantago Ekstrelerinin Antimutajenik Etkilerinin Salmonella/Escherichia coli WP2 Test Sistemiyle Belirlenmesi** " adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel SÜMER
Başkan

.....

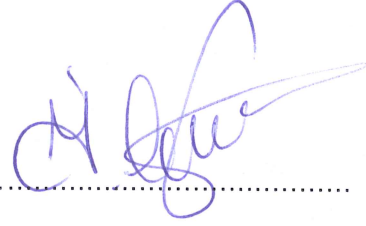
Prof. Dr. Nuran DİRİL
Danışman

.....

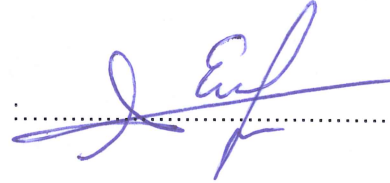
Prof. Dr. Hatice MERGEN
Üye

.....

Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU
Üye

.....

Dr. Öğrt. Üyesi Egemen FOTO
Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/Raporumun Haziran 2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

26/06/2020

(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Sapri METİN

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

01/06/2018

Serpil METİN

ÖZET

BAZI *Plantago* EKSTRELERİNİN ANTİMUTAJENİK ETKİLERİNİN *Salmonella*/*Escherichia coli* WP2 TEST SİSTEMİYLE BELİRLENMESİ

Serpil METİN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nuran DİRİL

Mayıs 2018, 70 Sayfa

İnsanlar yaşamları boyunca doğal ya da yapay birçok çevresel ajan ile karşılaşmaktadır. İnsan sağlığına az ya da çok zarar verebilecek bu ajanların zararlı etkilerine karşı, korunma veya bunların yok edilmesinde bazı bitkiler ve sekonder metabolitleri antimutajenik potansiyelleri nedeniyle ön plana çıkmaktadır. *Plantago* cinsi bitkiler, sekonder metabolit açısından zengin içeriğe sahip bir cins olarak bildirilmektedir. Bu çalışmada Türkiye’de yetişen *Plantago* cinsine ait beş (*Plantago major* subsp. *Plantago intermedia*, *Plantago major* subsp. *major*, *Plantago scabra*, *Plantago holostium*, *Plantago lagopus*) tür/ alt türün toprak üstü bitki kısımlarından elde edilen metanollü ekstraktların antimutajenik etkileri Ames testi sistemi ve *E.coli* WP2 test sistemi ile değerlendirilmiştir. Araştırma, Ames test sisteminde *Salmonella typhimurium* TA 98, TA100 ve TA 102 suşları, *E.coli* WP2 test sisteminde *E. coli* WP2 uvr A suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, en yüksek antimutajenik etkiye sahip bitki türünün TA 102, TA 100 ve *E.coli* WP2 suşları üzerine uygulanan tüm konsantrasyonlar için değişen oranlarda antimutajenik aktivite gösteren *Plantago major* subsp. *major* türü olduğu görülmektedir. Özellikle *Plantago major* subsp. *intermedia* (% 48 inhibisyon, 400 µg/plak konsantrasyon) ve *Plantago major* subsp. *major* (% 47 inhibisyon, 100 µg/plak

konsantrasyon; % 45 inhibisyon, 25 µg/plak konsantrasyon) ekstrelerinin *E.coli* WP2 suşu üzerindeki etkileri dikkat çekicidir. *Plantago scabra* türünden elde edilen ekstrelerin ise TA 100 suşunda uygulanan tüm konsantrasyonlarda (% 39 inhibisyon, 100 µg/plak konsantrasyon) orta derecede antimutajenik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. *Plantago lagopus* ekstreler, 400 µg/plak konsantrasyonda tüm *Salmonella typhimurium* suşları için zayıf antimutajenik etki gösterirken *Escherichia coli* WP2 uvr A suşunda bu konsantrasyonda % 29 inhibisyon değeri elde edilmiştir. *Plantago holosteum* ekstrelerin ise tüm suşlarda zayıf antimutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak *Plantago* bitkisine ait tür/alt türlerin antimutajenik aktivite taşıdıkları belirlenmiş olup, değişik parametreler açısından ileri çalışmaların yapılması önerilebilir.

Anahtar sözcükler: *Plantago* türleri, Ames testi, *E.coli* WP2 testi, Antimutajenite.

ABSTRACT

DETERMINATION of ANTIMUTAGENIC EFFECTS of SOME PLANTAGO EXTRACTS in THE *Salmonella/E.coli* WP2 TEST SYSTEM

Serpil METİN

Master of Science, Department of Biology

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Nuran DİRİL

May 2018, 70 Pages

Human beings encounter several natural or artificial environmental agents throughout their lives. In the protection against the detrimental effects of these agents that might endanger human health more or less, or in the extermination of such effects, some plants and secondary metabolites come to the fore because of their antimutagenic potential.

Plantago species are known to be rich in secondary metabolites. In this study, antimutagenic effects of methanol extracts that were obtained from the aerial parts of five types/subtypes that belong to *Plantago* species that grow in Turkey (*Plantago major* subsp. *Plantago intermedia*, *P.major major* subsp. *major*, *Plantago scabra*, *Plantago holosteum*, *Plantago lagopus*) were analysed with Ames test system and *E.coli* WP2 test system. The study has been carried out with the use of *Salmonella typhimurium* TA 98, TA100 and TA 102 strains in the Ames test system, and with the use of *Escherichia coli* WP2 *uvr A* strain in the *E.coli* WP2 test system. When the results obtained within the study were considered together, it was observed that the plant type that had maximum antimutagenic activity was *Plantago major* subsp. *major* that showed antimutagenic activity at varying rates in all concentrations that were applied on TA 102, TA 100 and *E.coli* WP2 strains. Especially the effects of *Plantago major* subsp. *intermedia* (48 % inhibition, 400 µg/plate concentration) and *Plantago major* subsp. *major* (47 %

inhibition, 100 µg/plate concentration; 45 % inhibition, 25 µg/plate concentration) extracts on the *E.coli* WP2 strain were remarkable. It was also determined that the extract obtained from *Plantago scabra* type had moderate antimutagenic activity in all concentrations applied on TA 100 strain (39 % maximum inhibition, 100 µg/plate concentration). While *Plantago lagopus* extract showed weak antimutagenic activity for all *Salmonella typhimurium* strains in 400 µg/plate concentration, 29 % inhibition was obtained in the *Escherichia coli* WP2 *uvr A* strain at this dose. It was observed that *Plantago holosteum* extract showed weak antimutagenic activity in all strains.

In conclusion, it was determined that species /subspecies that belong to *Plantago* carried antimutagenic activity, and further study could be suggested in terms of various parameters.

Keywords: *Plantago* species, Ames assay, *E. coli* WP2 assay, Antimutagenicity.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren değerli danışmanım sayın Prof. Dr. Nuran DİRİL'e, değerli bilgilerini, yardım ve önerilerini benden esirgemeyen, her zaman yol gösteren değerli hocam Dr. Fatma ZİLİFDAR'a, Tez Komitesi üyelerinden değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Egemen FOTO 'ya, bitki ekstralarının tedarik edilmesinde ve değerli bilgileriyle destek olan Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU'a ve değerli asistanı Dr. Yasin GENÇ'e; istatistiksel değerlendirme aşamasında bilgi ve destekleri için Prof. Dr. Serpil Aktaş ALTUNAY ve değerli asistanı Araş. Gör. Leyla BAKACAK'a, tüm bilgi, destek ve katkılarından dolayı değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Kadir AKAN'a, deneylerim aksamadan devam etmesini sağlayan Tek. Vedat MUTLU' ya, her zor zamanımda yanımda olan bana desteklerini hiç esirgemeyen bütün aileme ve arkadaşlarım Emine Atasoy ÇAMURTAŞ, Esra DEMİRCİOĞLU, Derya AKKURT, Hayriye AKEL'e ve canım kuzenim Selin TEKİN'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Serpil METİN

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Mutajenite ve Karsinojenite	4
2.2. Antimutajenite	5
2.3.Bitki Bileşikleri ve Terapötik Özellikleri	7
2.3.1.Sekonder Metabolitler.....	8
2.3.2.Fenolik Bileşikler.....	9
2.4. Plantaginaceae Familyası.....	13
2.4.1. <i>Plantago</i> Türlerinin Kullanım Alanları	13
2.4.2.Türkiye’ de <i>Plantago</i> Bitkisi	15
2.5. Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Test Sistemleri	21
2.5.1. Ames Test Sistemi	22
2.5.1.1. Histidin mutasyonu	23
2.5.1.1. <i>rfa</i> mutasyonu	24
2.5.1.1. R faktörü	25
2.5.2. <i>Escherichia coli</i> WP2 Test Sistemi	25
3. MATERYAL VE METOD.....	26
3.1. Çalışmada Kullanılan Test Suşları.....	26
3.2. Çalışmada Kullanılan Bitki Ekstreleri	26
3. 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3. 3. 2. Pozitif Mutajenler	27
3. 3. 3. Diğer Kimyasal Maddeler.....	27
3. 4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Besi Ortamları	27
3.5. Çalışmada Kullanılacak Suşların Üretilmesi	30
3.5.1. <i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşunun üreme durumunun belirlenmesi	30

3.5.1. <i>S.typhimurium</i> suşlarının üretilmesi	31
3.6. Çalışmada Kullanılacak Suşların Saklanması.....	31
3.7. Çalışmada Kullanılan Test Suşlarının Genetik Kontrolü	31
3.7.1. Histidin Gereksinim Kontrolü	31
3.7.2. Triptofan Gereksinimi Kontrolü	32
3.7.3. Biyotin Gereksinim Kontrolü	32
3.7.4. <i>rfa</i> (<i>Rough A</i>) Mutasyonu Varlığının Kontrolü	32
3.7.5. <i>uvrB</i> ve <i>uvrA</i> Mutasyonu Kontrolü.....	33
3.7.6. pKM101 Plazmit Varlığının Kontrolü	33
3.7.7.Kendiliğinden Geri Dönen Koloni Sayısının Kontrolü	36
3.8.Ames Test Sistemi	36
3.8.1. Sitotoksite Testi	36
3.8.2. Antimutajenite Testi	37
3.9. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	37
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Ames test sisteminde kullanılan <i>Salmonella</i> suşlarının genotipik özellikleri [17].....	23
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan <i>Plantago</i> cinsine ait beş adet bitki ekstresinin toplandığı yer, otörü ve herbaryum numarası	26
Çizelge 4. 1. <i>P. major subsp. major</i> bitkisine ait ekstresinin farklı konsantrasyonlarının <i>S. typhimurium</i> suşları ve <i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	39
Çizelge 4. 2. <i>P. major subsp. intermedia</i> bitkisine ait ekstresinin farklı konsantrasyonlarının <i>S. typhimurium</i> suşları ve <i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	41
Çizelge 4. 4 . <i>P. lagopus</i> bitkisine ait ekstresinin farklı konsantrasyonlarının <i>S. typhimurium</i> suşları ve suşları ve <i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	45
Çizelge 4. 5. <i>P. holosteam</i> bitkisine ait ekstresinin farklı konsantrasyonlarının <i>S. typhimurium</i> suşları ve <i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Antimutajenlerin etki mekanizmaları	6
Şekil 2.2. Bitkilerdeki primer ve sekonder metabolitler özetlenerek verilmiştir	8
Şekil 2. 3. Fenolik bileşiklerin genel yapısı ve bazı türevleri	10
Şekil 2. 4. <i>Plantago major</i> subsp. <i>major</i> bitkisi	16
Şekil 2. 5. <i>Plantago major</i> subsp. <i>intermedia</i> bitkisi	17
Şekil 2. 6. <i>Plantago scabra</i> bitkisi.....	19
Şekil 2. 7. <i>Plantago lagopus</i> bitkisi.....	20
Şekil 2. 8. <i>Plantago holostium</i> bitkisi	21
Şekil 2. 9. <i>S. typhimurium</i> TA98 suşunun genetik işaretlerinin kontrolü.....	34
Şekil 2. 10. <i>S. typhimurium</i> TA98 suşunun genetik işaretlerinin kontrolü	35
Şekil 4. 1. <i>E. coli</i> WP2 test suşunun üreme eğrisi	38
Şekil 4. 2. <i>Plantago major</i> subsp. <i>major</i> bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının <i>S. typhimurium</i> suşları ve <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	40
Şekil 4. 3. <i>Plantago major</i> subsp. <i>intermedia</i> bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının <i>S. typhimurium</i> suşları ve <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşu üzerindeki antimutajenik etkileri ...	42
Şekil 4. 4. <i>Plantago scabra</i> bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının <i>S. typhimurium</i> suşları ve <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	44
Şekil 4. 5. <i>Plantago lagopus</i> bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının <i>S. typhimurium</i> suşları ve <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	46
Şekil 4. 6. <i>Plantago holostium</i> bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının <i>S. typhimurium</i> suşları <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	48

1. GİRİŞ

İnsanlar bilinen tarihle birlikte bitkileri farklı amaç ve nedenlerle çağlar boyunca çeşitli şekillerde kullanmıştır. İlkel insanlar, bitkileri besin ve şifa kaynağı olarak kullanmış, ayrıca zehirlenme gibi tecrübelerle ayırt etmeye başlamıştır. Bitkiler ve insanlar arasındaki bu ilişki tarihsel süreç içinde artmış ve günümüzde birçok bitki, sağlığın korunmasında ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaya devam etmiştir [1].

Bitkilerin kendilerini korumak için geliştirdikleri mekanizmalar tıbbi bitkilerin keşfinde ilham kaynağı olmuştur. Bitkilerin terapötik potansiyelinin belirlenmesinde insanlar kişisel deneyimlerinin yanında doğada hayvan davranışlarını gözlemleyerek de çeşitli bilgilere ulaşmışlardır. Örneğin vahşi hayvanlardaki yeme davranışları gözlemlenerek onların terapötik potansiyele sahip bitkileri tükettiği rastgele fark edilmiştir [2]. Bu gözlem bitkilerin terapötik amaçlar için kullanımının önünü açmıştır.

Farmakoloji endüstrisinde, yeni ilaç modellerinin gelişimi aşamasında biyolojik aktivitesi bilinen moleküllerden daha yüksek biyolojik aktiviteye ve daha az yan etkiye sahip ilaçların geliştirilmesi hedeflenir. Bitkiler hem yeni ilaç tasarımları için hammadde kaynağı olarak hem de özellikleri bilinen bileşenlerinin başka terapötik özelliklerinin olup olmadığının belirlenmesine olanak sağlayan etkin kaynaklar olarak öne çıkmaktadır. Bitkilerin tıbbi değeri biyolojik olarak aktif bileşenlerinin ilaca dönüşebilme potansiyeline bağlıdır. Bugün dünyada insan sağlığının korunması veya tedavi amaçlı reçetelenen ilaçların yaklaşık % 25'i bitkilerden elde edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre temel ve gerekli kabul edilen 252 ilaçtan % 11'i bitki kökenlidir. Günümüzde ticari kullanıma konu olan veya klinik araştırmalarda kullanılan anti-tümör ve anti-enfeksiyöz ilaçların % 60'ının bitkisel kökenli olduğu tahmin edilmektedir. Bunların da büyük çoğunluğu henüz yüksek maliyetli olması sebebiyle sentezlenememekte ve yabani bitkilerden elde edilmektedir. Bitkilerden elde edilen önemli ilaçlar arasında, *Digitalis* spp'sinden digoksin, *Cinchona* spp'den kinin ve kinidin, *Catharanthus roseus*'dan vinkristrine ve vinblastin, *Atropa belladonna*'dan atropin, *Papaver somniferum*' dan kodein ve morfin bulunmakta olup hala farklı bitkilerin terapötik özelliklerine ilişkin bilgi edinilmeye ve yeni kaynaklar araştırılmaya devam etmektedir [1,3,4].

İnsanlar bulundukları ortamda mutajenik/karsinojenik ajanlar ile sürekli karşı karşıyadır. Bu ajanların zararlı etkilerine karşı korunmada, koruyucu özellikleri olduğu bilinen bitkiler ve bitkilerden elde edilen sekonder metabolitler, antimutajenik potansiyelleri ile karşımıza çıkmaktadır.

Antimutajen ve antikarsinojen maddelerin, karsinojenitede bir veya daha fazla aşamayı inhibe ederek kanser oluşumunu önleyebilen ya da geciktirebilen maddeler olduklarını gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır [5]. Antimutajenik etkinin değerlendirildiği, *in vitro* çalışmalar yeni potansiyel antikarsinojenik maddelerin tanımlanmasında ilk aşama olarak kullanılmaktadır [6]. Bu açıdan antimutajenik etkinliğe sahip bitki ekstraktlarının araştırılması, mutasyonların neden olduğu kanser başta olmak üzere birçok hastalığı önleyebilecek bileşiklerin tanımlanmasını sağlaması açısından önemlidir [7].

Bitkilerin tıbbi özellikleri farmakolojik olarak aktif bileşikler üretebilmelerinden ileri gelmektedir. Bitkilerdeki aktif bileşikler fitokimyasallar olarak tanımlanan sekonder metabolitlerdir. Bunlar potansiyel terapötik etkinlikleri, sınırlı yan etkileri ve ekonomik uygunluğu nedeniyle dünyadaki bilimsel araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır. Sekonder metabolitlerin önemli bir grubunu oluşturan fenolik bileşiklerden olan flavonoidler bitkilerde en yaygın bulunan metabolitlerdir. Flavonoidlerin, biyotransformasyonda, düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu engellemede ve serbest radikallerin yok edilmesinde rolleri olduğu bilinmektedir [8].

Tüm dünyada oldukça geniş bir yayılım alanına sahip olan *Plantago* cinsi üzerinde yürütülen birçok çalışmada yüksek oranda fenolik içeriğe sahip olduğu bildirilmiştir. Fitokimyasal çalışmalarda *Plantago* cinsinin bu içerikleri sayesinde birçok alanda amaca yönelik olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir. Cins belirlenmiş antikanser, anti-inflamatuvar ve antioksidan gibi birçok etkileri nedeniyle tıbbi amaçlı çalışmalarda kullanılmış olup halen araştırmaya açık bir bitki topluluğudur [9-12]. Birçok araştırmacı bitki ekstraktlarındaki antioksidan bileşiklerin antigenotoksik etkilerinin de olabileceğini rapor edilmiştir[13]. Bu açıdan birçok türünde antioksidan özellik taşıdığı bildirilen *Plantago* cinsinin antimutajenik potansiyel taşıma ihtimali akla gelmektedir.

Türkiye’de yetişen tek *Plantago* cinsine ait 26 türün bulunduğu rapor edilmiş olup, *P.lanceolata* ve *P.major* başta olmak üzere birçok türünün terapötik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Yürütülen araştırma kapsamında *Plantago* cinsine ait 5 türün (*P. scabra*, *P. holosteam*, *P. lagopus*, *P. major* subsp. *intermedia*, *P. major* subsp. *major*) metanol

ekstrelerinin, *S. typhimurium* TA98,TA100, TA102 ve *E.coli* WP2 *uvrA* suşları kullanılarak Ames ve *E.coli* WP2 test sistemlerinde antimutajenik aktiviteleri değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİ

2.1. Mutajenite ve Karsinojenite

Sanayi devriminin ortaya çıkışıyla birlikte tarım ilaçlar, endüstriyel kimyasallar, sera gazı gibi çevreye salınan kimyasalların sayısında önemli bir artış saptanmıştır. İnsan genomu bu kimyasal ajanların yanı sıra UV, X ışınları gibi fiziksel ajanlarla dıştan ve hücrelerdeki metabolik olaylar sonucu üretilen reaktif oksijen türleri (ROT) , reaktif azot türleri (RNT) ile içten de hasara uğrama tehdidi altındadır [14-15].

Genomda kendiliğinden, iç veya dış faktörlerin indüklemesi sonucu oluşan hasar onarılmadan kalırsa kalıtsal değişiklik olan mutasyonlar meydana gelmektedir. Bunlar gen ve kromozom düzeyinde olmak üzere kabaca iki kısma ayrılmaktadır. Kromozom düzeyinde mutasyonlar kromozomların sayı (öplöidi, anöplöidi) ve yapısında (delesyon, insersiyon) olan değişiklikleri içerirken; gen düzeyinde baz çifti değişimi (bir baz çiftinin diğeriyle yer değiştirmesi), delesyon (bir veya daha fazla baz çiftinin kaybı) ya da insersiyon (fazladan baz çiftlerinin eklenmesi) şeklinde nokta mutasyonları olabilmektedir [16-17]. Bu değişiklikler okuma çerçevesinde hatalara yol açmakta ve sonuç olarak da farklı amino asitlerin yapıya girmesine sebep olabilmektedir.

Mutasyonlarda hasarın olduğu yere bağlı olarak etki değeri değişmektedir. Oluşan mutasyonlar genellikle nötr, pozitif, ölümcül ya da öldürücü konsantrasyonun altında (subletal) olarak gruplandırılabilir. Eşey hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar gelecek nesillere aktarılırken, somatik hücre mutasyonları ise kanser dahil olmak üzere kalıtsal olmayan patolojik durumlar (kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar kronik inflamasyon, artrit, diyabet) oluşturarak etki etmektedir [16-18].

Mutajenite ile karsinojenite arasındaki bağlantı çok uzun zamandır bilinmektedir. Karsinojenik etki normal dokuların kanserojen faktörlere uzun süre maruz kalınması sonucu biriken mutasyonlar sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Birikim miktarının, yani mutasyon yükünün arttırmasının kanser oluşumu ile doğru orantılı olduğuna dair oldukça geçerli veriler bulunmaktadır [19].

Mutajenlerin etki mekanizmaları aydınlatıldıktan sonra karsinojenitenin oluşumu hakkında da fazla bilgi sahibi olunmaya başlanmıştır. Karsinojenitenin oluşum mekanizması oldukça karmaşık olup belirlenmesi de bir o kadar zor olmaktadır. Karsinojenitenin tek başına değerlendirilmesinde hayvan deneyleriyle mümkün olabilmekte ve oldukça güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Fakat yapılan *in vivo*

deneylerin çok fazla zaman kaybına sebep olması, yüksek maliyet, etik konular gibi nedenlerden dolayı pratik uygulamada problemlerle karşılaşmaktadır [20]. Bu açıdan karsinojenitenin değerlendirilmesinde mutajenite çalışmaları esas alınmaktadır.

Bu durum iki önemli nedene dayanarak yapılabilmektedir:

- Genetik kod ve bunun işleyiş sisteminin evrensel olması,
- Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişkinin anlamlı olması

Test edilen kanserojenlerin (135/158) yaklaşık % 85'inin aynı zamanda mutajen olduğu saptanmıştır [21-24].

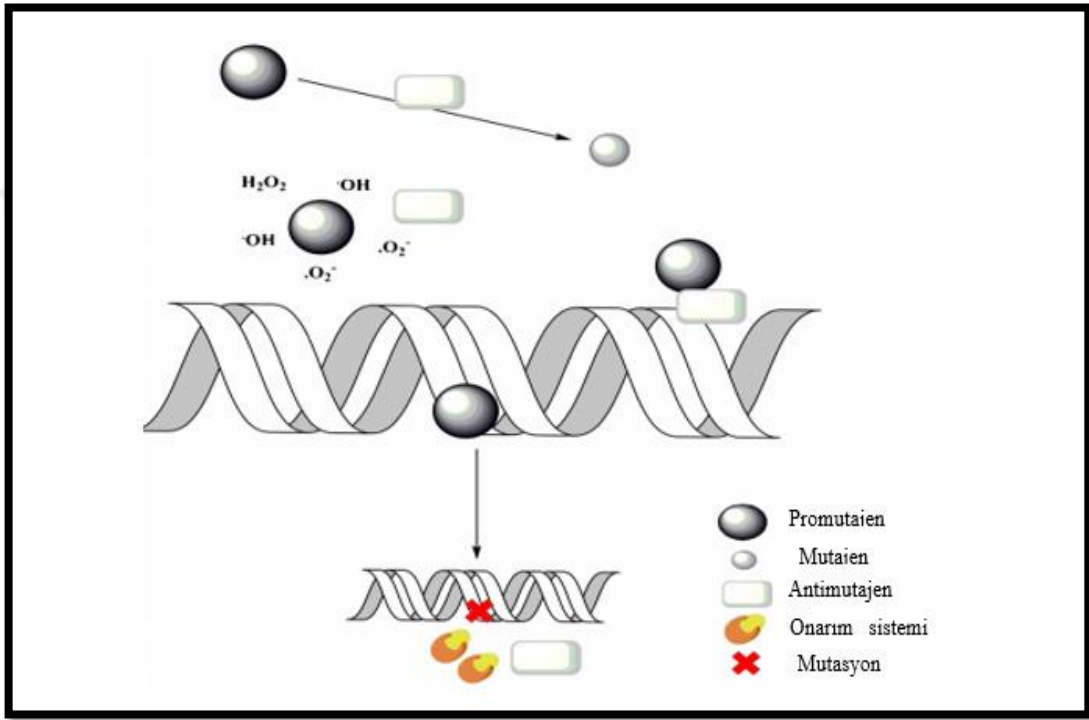
Yaşanılan çevrede bilinerek veya bilinmeden maruz kalınan fazla miktardaki mutajen ve karsinojen ajana karşı genomun korunması oldukça hayati önem taşımaktadır. Genomun korunması kendi onarım sistemleri dışında antioksidan, antimutajenik özelliğe sahip biyoaktif bileşenlerle desteklenerek sağlanabildiği bilinmektedir.

2.2. Antimutajenite

İlk kez Novick ve Szilard (1952) tarafından ortaya atılan “antimutajenite” terimi kendiliğinden veya indüklenen mutasyonların sıklığını veya oranını azaltan bileşikler olarak tanımlanmaktadır [25-26]. Şekil 2.1’de antimutajenlerin etki mekanizmaları gösterilmektedir [16]. Doğal ve sentetik yapıda olabilen bu bileşikler etki mekanizmasına göre genel olarak desmutajenler ve biyo-antimutajenler olarak iki grupta toplanmıştır [27].

Desmutajenler, mutajenik bir bileşiğin DNA ile etkileşimi gerçekleşmeden önce mutajenlerin aktivitesini tamamen veya kısmen ortadan kaldıran ajanlardır. Bu tip ajanlar mutajenleri DNA’ya ulaşmadan önce doğrudan etkileyerek onları inaktive edebilen kimyasal özelliklere sahiptirler. Desmutajenler, mutajenlerin hücre dışında kimyasal veya biyokimyasal modifikasyonlarına neden olurlar. Etkinliklerini promutajenik bir bileşiğin mutajenik bir bileşiğe dönüşümünü önleyerek; doğrudan mutajenik etki gösteren bileşiği inaktive ederek veya mutajen ve DNA arasındaki reaksiyonu engelleyerek gerçekleştirirler. Desmutajenlerin mutajenleri inaktive etmesi, genellikle metabolik aktivasyonlarında görev alan P-450 enzimlerini etkilemesi ile mümkün olabildiği bildirilmiştir [28].

Asıl antimutajenler olarak tanımlanan biyo-antimutajenler ise genellikle hücre içinde etkili olan ajanlar olup mutajenlerin DNA ile etkileşiminden sonraki süreci etkilerler. Bunlar, mutajenin DNA'ya bağlandıktan sonra DNA onarım sistemleri üzerinden etki gösteren antimutajenler olarak bilinirler. DNA replikasyonunun ve onarımının düzenleyicileri olarak hareket ederler. Biyo-antimutajenler, hem DNA'nın hatasız onarımını teşvik ederler hem de hasar gören onarım sistemlerinin çalışmasını önleyerek etki gösterirler [27-29].



Şekil 2. 1. Antimutajenlerin etki mekanizmaları [16]

Antimutajenik maddelerin özellikleri mutajenlerin kimyasal veya enzimatik olarak inaktivasyonu; mutajenlerin metabolik aktivasyonunun inhibisyonu; mutajenler tarafından üretilen serbest radikallerin atılması ve onarım mekanizmalarının modifikasyonu şeklinde sıralanabilmektedir [30-31].

Antimutajenlerin enzimler üzerindeki aktivitesinde sitokrom P-450 enzim ailesi üzerindeki etkileri dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalarda antimutajenik ve antikarsinojenik yapıdaki maddelerin sitokrom P-450'nin hem inhibitörü hem de indol-3-karbinol gibi bitki bileşenleriyle indükleyicisi olarak etki gösterdiği bildirilmiştir [30]. Promutajenlerin mutajenik etkisi, sitokrom P-450 enzim ailesi gibi faz I metabolik enzimleri tarafından gerçekleştirilen metabolik aktivasyona bağlıdır [16]. Örneğin

bitkisel bir bileşen olan luteolinin, CYP1A2'nin güçlü bir inhibitörü olduğu bildirilmiştir. Multifaktöriyel inhibisyonda enzimlerin substratı ile bitki bileşeni olan flavonoidin rekabeti sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir [32].

Serbest radikallerin biyomoleküller üzerinde meydana gelen oksidasyonları temizleyebilme veya bunları yakalayıp kararlı hale getirebilme özelliğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir [33]. Antioksidanların hücre membranındaki lipid peroksidasyonunda doymamış yağ asitlerine atak yapan oksijen veya hidroksil radikallerinin yok edilmesi gibi temel görevleri bulunduğu bilinmektedir [34]. Dolayısıyla antioksidanların mutasyon oluşumuna karşı koruyucu rolü bulunmaktadır. Bu yönüyle antioksidanlar antimutajenik potansiyele sahip ajanlar olarak gösterilmektedir [35].

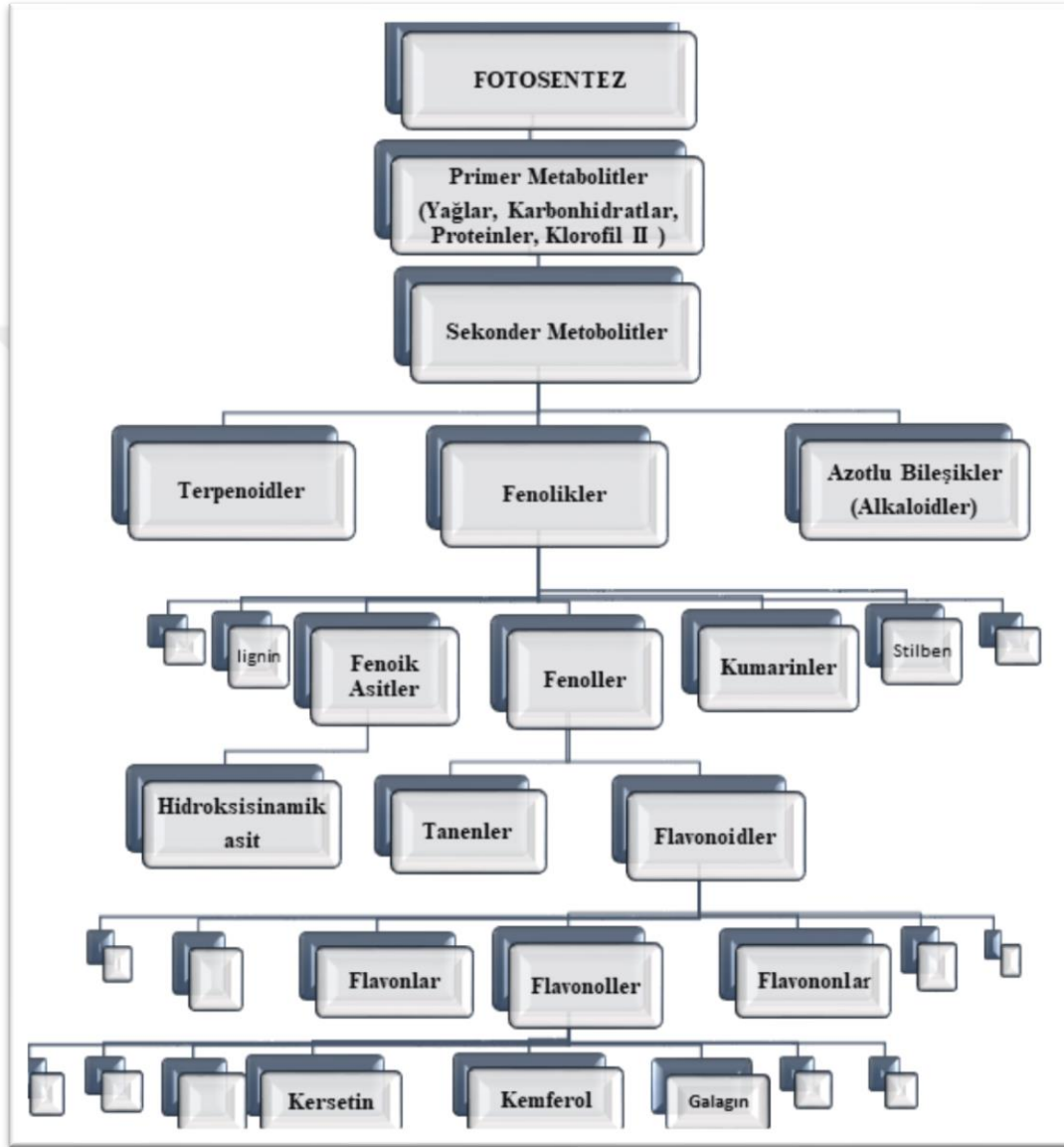
Mutajenik ve karsinojenik ajanlar yaşanan çevrede her yerde her zaman bulunmaktadır. Bu yüzden antimutajenik ajanların düzenli olarak alınması ile bu faktörlerin genotoksik etkisini azalttığı yönünde birçok çalışma bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda bitkiler veya bitkilerde üretilen çeşitli sekonder metabolitler, antimutajenik içeriklerin temel kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle bitkilerden elde edilen antimutajenlerin araştırılmasına karşı ilginin artarak devam ettiği bilinmektedir [36].

2.3.Bitki Bileşikleri ve Terapötik Özellikleri

Bitkilerden fayda sağlama fikri çok eski çağlara dayanmaktadır. Neandertallerin (bugünkü Irak'ta) 60.000 yıl önce bitkileri tıbbi amaçla kullandığına dair bilgiler bulunmaktadır [37]. Diğer taraftan yapılan arkeolojik kazılarda Antik Mısırlıların 3000-6000 yıl öncesinde bitkileri tedavi amacıyla kullandığına ilişkin kalıntılara rastlanmıştır. Özellikle bazı bitkisel içeriklerin sakinleştirici (sedatif) ve ağrı kesici (analjezik) olarak gastrointestinal sistem hastalıklarında kullanıldığı düşünülmektedir [38].

Bitkilerin terapötik özelliğine dair bilgiler geçmişten günümüze birikimle aktararak gelmiştir [37]. Antik çağlardan itibaren 8000'den fazla farklı bitki türünün, birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir [39]. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre, günümüzde tüm dünyadaki sağlık hizmetlerinin % 80'i bitki veya bitki kaynaklı bileşenlerden oluşmaktadır [40]. İlaç endüstrisinin temelini oluşturan bitkiler içerikleri sayesinde yeni, efektif kemoterapötik ajanların geliştirilmesinde öncü maddeler olarak halen araştırmalarda büyük öneme sahiptir. Özellikle kanser de dahil olmak üzere çeşitli kronik dejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli rolü olan mutasyonların önlenmesi

açısından antimutajenik özellikteki bitkilerin belirlenmesi son dönemde oldukça önem kazanmıştır. Bu açıdan potansiyel antimutajenik özelliklere sahip içeriklerinin tanımlanması ve bitki ekstraktlarının izole edilmesi önemlidir [13,35,40].



Şekil 2.2. Bitkilerdeki primer ve sekonder metabolitler özetlenerek verilmiştir [41-43].

2.3.1. Sekonder Metabolitler

Bitkiler, büyüme ve gelişmeleri sırasında çeşitli organik bileşikler üretirler. Bu maddeler primer ve sekonder metabolitler olarak iki grup altında toplanmaktadır. Bitkilerde fotosentez ürünü olarak elde edilen lipidler, nükleotidler, amino asitler ve organik asitler gibi maddeler primer metabolitler olup tüm bitkilerde bulunmaktadır. Sekonder

metabolitler ise sınırlı sayıdaki taksonomik grupta yer alan bitkiler tarafından primer metabolitlerin biyosentetik yolu üzerinden dolaylı olarak sentezlenmektedir. Bitkilerdeki alkaloidler, flavonoidler, saponinler, terpenoidler, steroidler, glikozitler, tanenler, uçucu yağlar ise sekonder metabolitleri oluşturmaktadır. Şekil 2.1.'de bitkilerdeki primer ve sekonder metabolitler özetlenerek verilmiştir [41-43].

Bitkilerde sekonder metabolit çeşitliliğini etkileyen birçok faktör vardır. Bu konuda bitkinin genetik yapısının önemli olmasının yanında çeşitli biyotik ve abiyotik ajanlar da genotipte modifikasyonlara neden olabilmektedir. Bitkinin büyüme, strese karşı savunma ve üreme ile ilişkili fizyolojik gereksinimleri nedeniyle bitki biyokimyasında değişiklikler oluşmaktadır. Aynı zamanda, su, ışık, besin yetersizliği, sıcaklık gibi çeşitli çevresel stres, kirlilik veya patojen organizmalarda farklılaşmaya katkı sağlamaktadır. Yaklaşık 250.000 çeşidi bulunan sekonder metabolitler biyosentetik kökenine bağlı olarak terpenoidler, alkaloidler ve fenolik bileşikler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılabilir [43-44].

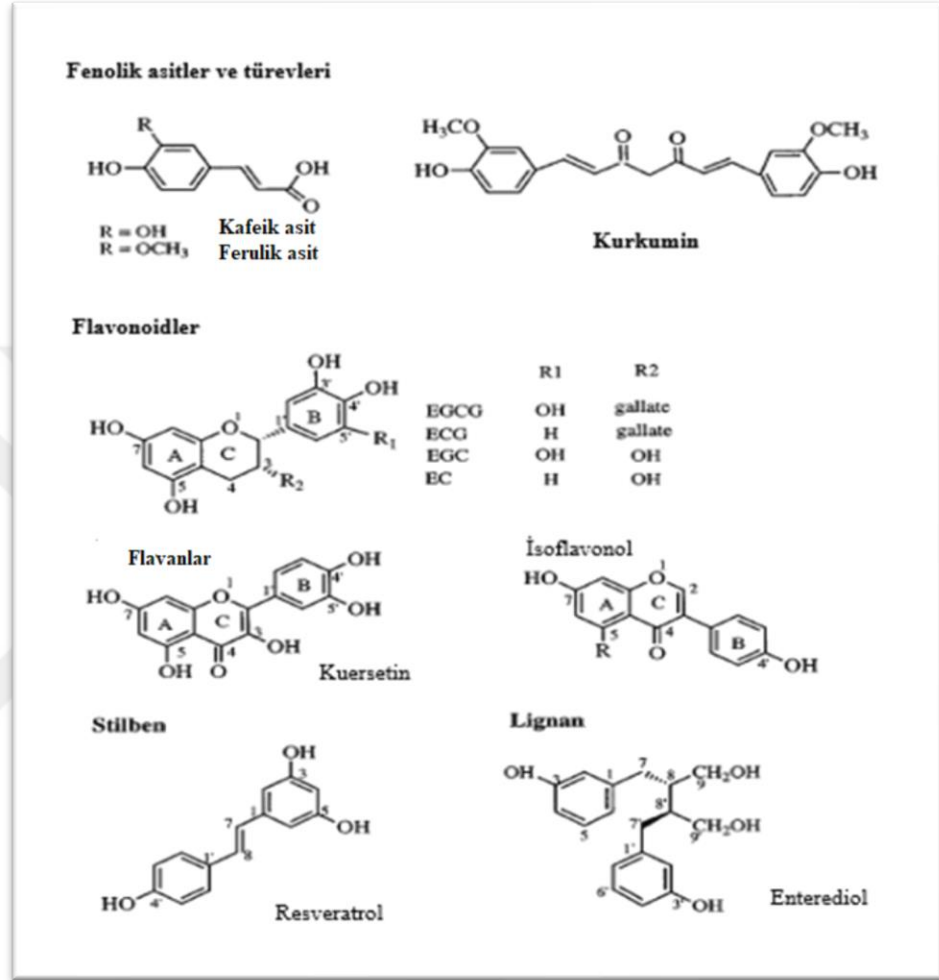
Terpenoidler asetat / mevalonat yolunun gliseraldehit 3-fosfat / piruvat yolağında oluşan beş karbonlu bileşiklerdir. Bitki terpenoidlerinin çoğu preditörlere karşı toksin salgılayarak, bitkiyi koruma özelliğine sahiptir. Terpenoidlerin antiviral, anthelmintik, antibakteriyel, antispazmodik, antimalaryal, anti-inflamatuar özellikleri olduğu rapor edilmiştir.

Alkaloidler esas olarak amino asitlerden sentezlenir. Bu azot içeren bileşikler, çeşitli otçul hayvanlardan bitkileri koruma özelliğinin yanı sıra farmakolojik olarak da önemli özelliklere sahiptir. Terapötik olarak antispazmodik, antimalaryal, analjezik, diüretik etkinliklerinin bulunduğu bildirilmiştir [43].

2.3.2.Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, bitkilerin morfolojik gelişimleri, fizyolojik süreçleri ve üremedeki etkileri nedeniyle en önemli sekonder metabolit gruplarından biridir. Yapılarında çok fazla fenolik halka içermeleri nedeniyle polifenoller olarak da adlandırılmaktadırlar. Bu fitokimyasallar pentoz fosfat yolu, şikimik asit ve malonik asit yolunun sentez ürünleridir. Fenolik bileşikler geniş biyolojik spektrumları ve moleküler yapılarından dolayı yaygın olarak bilinen bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerde ana çekirdek, en az bir fenol halkasındaki hidroksil, metil veya asetil gibi birden fazla grubun genellikle hidrojen ile yer değiştirmesi sonucu oluşmaktadır. Polifenollerin 8000'den fazla farklı bileşiği bilinmekte

olup bunlar 10 farklı genel sınıfa ayrılabilir. Molekül ağırlığı 30.000 Da'dan büyük olan bu bileşikler hem insan hem hayvan besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Şekil 2.3'te fenolik bileşiklerin ana yapısı, türevlerinden bazı örnekler ve kimyasal yapıları görülmektedir.



Şekil 2. 3. Fenolik bileşiklerin genel yapısı ve bazı türevleri [41]

Fenolik bileşiklerin temel görevleri arasında bitkiyi patojen ve herbivorlara karşı koruma ve bitkiye mekanik destek verme sayılabilir. Bitkiye antioksidan, antimikrobiyal, antimutajenik aktivitelerle medikal bitki olabilme özelliği sağlayan bu aktif maddeler elagik asit, epikateşin, epigallokateşin gallat gibi türevlerinin antimutajenik etkisinin bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca doğal antioksidanların da çoğu fenolik bileşiklerdir [45,47-48].

P vitamini türevi olarak bilinen flavonoidler fenolik bileşiklerin bilinen en geniş sınıfıdır. Genel özellikleri ilk defa 1936 yılında Rusznyak ve Szent-Gyorgyi tarafından yapılan

Çalışma ile tanımlanan flavonoidler latince "flavus" kelimesinden türemiştir [49]. Flavonoidler bitki kısımlarının sarı, turuncu ve çiçeklerin kırmızı tonları gibi farklı renklerinden sorumlu olan biyolojik pigmentlerdir [50].

Flavonoidal bileşiklerin hepsi aynı temel iskelet üzerine yapılanmış olup altı karbon atomlu iki halka (halka A ve C) ve üç karbon atomlu (halka B) bir heterosiklik halkadan oluşurlar. Yaygın olarak ortak bir benzo--pironla karakterize edilen polifenolik bir gruptur. Ana omurgaya ilave ekler sayesinde, modifikasyonla oluşan 5000'in üzerinde bileşiği bildirilmiştir. Flavonlar, flavanoller (kateşinler), izoflavonlar, flavonoller, flavanonlar, tanenler ve antosiyaninler bunlardan bazılarıdır [50].

Flavonoidler bitki metabolizmasında savunma, sinyal gönderme, patogenez ve simbiyotik yaşam gibi çeşitli önemli rollere sahiptirler. Bu bileşikler iek renginin oluşumu ve farklı stres faktörlerine karşı metabolizmanın reaksiyon oluşturması, mikroorganizmalar tarafından oluşabilecek enfeksiyon veya böcek zararlarına karşı savunmada görevlidir. Ayrıca azot fiksasyon sürecinde ve oksinler ile sitokininler bitki büyüme hormonları ile reaksiyona girerek bitkinin gelişiminde rol oynamaktadır. Farmakolojik olarak ise antikanser, antimutajenik, antiinflamatuvar, anti-oksidan, antiproliferatif ve anti-aterojenik faaliyetlere sahip olduğu rapor edilmiştir [50-51].

İnsanlar biyotransformasyonunu karaciğer ve ince bağırsakta gerçekleştirdikleri flavonoidleri meyve ve sebze olarak tükettikleri bitkilerden almaktadırlar. Laboratuvar alışmaları, epidemiyolojik araştırmalar ve insan üzerinde yapılan klinik çalışmalardan elde edilen veriler bu bileşiklerin kanserden korunmada farklı tip gen ve enzimler arasındaki ilişkide önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Antioksidan etkileri olduğu bilinen flavonoidlerin, oksijen radikallerinin inaktivasyonu, elektrofillerin bağlanması; GST gibi faz II'deki konjuge edici enzimlerin indüksiyonu; apoptoz hızının artışı; hücre çoğalması inhibisyonu; lipid peroksidasyon inhibisyonu; anjiyogenez inhibisyonu; DNA oksidasyon inhibisyonu gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu ortaya konulmuştur [52].

Flavonoidlerin biyoaktivitesi hem yapılarına hem de hedef dokunun yapısına bağlıdır. Bu durumun flavonoidlerde bulunan karbonil grubu ve konjuge çift bağlarda bulunan kararlı elektron dağılımı ve de sahip oldukları birden fazla hidroksil grubuna bağlı olduğu rapor edilmiştir. Flavonoidlerin kimyasal yapısının bitkiye güçlü antioksidan özellik, luteolin, kemferol gibi fenolik grupların da antimutajenik aktivite kazandırdığı *in vitro* koşullarda

yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Corcoran ve ark. (2012) tarafından yürütülen bir çalışmada antosiyaninin protein kinaz aktivesi ile insan gastrik adenokarsinoma hücresi üzerinde konsantrasyon ve zamana bağlı apoptotik etkiye neden olduğu fakat normal sinir kök hücrelerinin canlılığını arttırdığı bildirilmiştir [53].

Ayrıca flavonoid içeriğin elektrofilik mutajenlerle reaksiyona girerek veya güçlü nükleofilik merkezler sağlayarak DNA'yı mutajenin elektrofilik metabolitinden doğrudan koruyabildiği de rapor edilmiştir. Bu çalışmalar ışığında flavonoid içerikli bitkilerin antikanser ajanı olarak umut vadettiği düşünülmektedir [54]. Bununla birlikte yapılan birçok çalışmada belirli düzeyde flavonoid alımının koroner kalp hastalığı ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimini önleyici etkileri olduğu bildirilmiştir [51, 52, 55].

Flavonoidler kolayca okside olabilen bileşiklerdir. Bu işlemin γ -piron halkasının açılması ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bugüne kadar, flavonoidlerin elektrokimyasal potansiyelleri ölçülmemiş olmakla birlikte reaksiyon potansiyelleri tahmin edilebilmektedir. Flavonoidlerin elektron transferi için yüksek eğilimleri güçlü serbest radikal toplayıcı olmalarını sağlamaktadır. Ayrıca serbest radikallerin ortaya çıkmasına yol açan birçok işlemi katalize eden ağır metal iyonlarını bağlayarak serbest radikal oluşumunu engelleyebildiği rapor edilmiştir. Bu durum flavonoidlerin ağır metallerin iki değerlikli (Cu^{++} , Zn^{++}) iyonlara karşı güçlü bir afinitesi olması ile açıklanmıştır. Flavonoidlerin, halka sistemindeki hidroksil grubu ve elektron yapısının, dördüncü periyodun geçiş elementlerinin d₃-elektronları ile ligandlar oluşturduğu düşünülmektedir. Bu özellik flavonoidlere terapötik ajan olarak önemli bileşikler olmalarını sağlamaktadır [56].

Bazı flavonoidlerin ise Ames test sistemi ile taramalarda mutajen özelliğe sahip olduğu da rapor edilmiştir. Bununla birlikte, bu etki benzer maddeler bulunanlardan daha az belirgindir. Mutajenik etkinin, flavonoidlerdeki benzopiren yapının bazlar arasında interkalasyonuna neden olabildiği düşünülmektedir. Bu durum nükleozidler ve flavonoidler arasındaki benzerliğe bağlanmaktadır. Ancak orta konsantrasyonlarda flavonoidlerin kullanıldığı *in vivo* çalışmalarda ciddi bir yan etki gözlemlenmediği bildirilmiştir.

Flavonoidler doğal zarlarda ATPazlar, fosfolipaz, prostaglandin siklooksijenaz ve lipooksijenaz gibi enzimlerin inhibisyonuna sebep olabilmektedir. Bu durum iyonofobik antibiyotikler gibi zarda oligomer yığınının delinerek por oluşmasına neden olur. Por

oluşturan antibiyotikler zarın içine yerleşmiş dimerler oluşturur ve her iki yan kısımdan çıkıntı yaparak belirli iyonların geçebilmesi için yeterli genişlikte bir açıklık bırakır. Flavonoidlerin polaritesinin de böyle bir mekanizmaya izin verdiği bildirilmiştir [56].

2.4. Plantaginaceae Familyası

Plantaginaceae familyası, dünyada tropik ılıman bölgelerdeki otlak alanlarda geniş yayılım gösteren bir bitkidir. Familyanın 92 cinsine ait 2000 türünün bulunduğu bildirilmiştir [57]. Plantaginaceae familyası tek veya çok yıllık bitki grubunda otsu bitkiler olarak tanımlanır. Ortalama boy uzunlukları 10- 30 cm arasında olup 90 cm'ye kadar uzanan türleri de bulunmaktadır. Plantaginaceae familyası *Plantago*, *Coronopus*, *Albicans*, *Psyllium*, *Littorella* ve *Bougueria* olmak üzere altı sınıfa ayrılmaktadır [58].

Plantago L. cinsi içerdiği yaklaşık 265 türle *Plantaginaceae* familyasının en büyük cinsidir. *Plantago* cinsi yaklaşık 4000 yıl önce taş devrinde tarım alanlarının belirlenmesinden sonra İskandinav ülkelerinde tanımlanmış ve Avrupa'dan insanlar tarafından tüm dünyaya yayılmıştır. Avrupa'nın her yerinde bulunmasından dolayı Hintliler tarafından 'beyaz adamın ayak izi' olarak adlandırılmıştır. İsmi Latince *planta* yani bitki kelimesinden cinse uyarlanmıştır . Türleri kök, yaprak, brakte, başak karakterleri temel alınarak ayırt edilip tanımlanmıştır. *Plantago* cinsi geniş bir yelpazedeki toprak asitliğine (pH 4.2-7.8) sahip çayırılık alanlar üzerinde doğal olarak yetişebilmektedir. *Plantago* yaprakları % 56,19 kadar yüksek oranda linolenik asitle içermektedir. Ayrıca fenoller, flavonoidler ve tanen içeriğinde yapraklarda yüksek oranda bulunmaktadır. Türlerinde yoğun oranda kafeik asit ve türevleri (fenil etanoit glikozitleri) bulunmaktadır Cins yaprak kısımlarında bulunan biyolojik aktif maddelerden dolayı birçok yaygın hastalık ve zararlılarından bitkinin kendini koruyabilme özelliği yanında kuraklığa karşı da oldukça toleranslı bir yapıya sahiptir. Yaprakları hem insan hem de hayvan besininde kullanılmakta olup özellikle mineral açısından zengin bir besin kaynağıdır [59,60].

2.4.1. *Plantago* Türlerinin Kullanım Alanları

Fitokimyasal çalışmalar, *Plantago* türlerinin fenilpropanoid glikozitleri, iridoidler, triterpenler, flavonoidler ve fenolik asitler gibi terapötik açıdan önemli bileşenlere sahip olduğunu göstermiştir. *Plantago* cinsi, tüm dünyada besin olarak kullanılabildiği gibi ilaç ham maddesi olarak kullanılan türlerini de içermektedir. Türlerinin tıbbi değeri kısmen tohumlarından çıkarılan polisakaritlerin terapötik ajan olarak ilaç yapımı, toksinlerin arındırılması gibi birçok alanda kullanılabilmesinden gelmektedir. *Plantago* türlerinin

geleneksel kullanımında etkili olan biyoaktif moleküllerinin farmakolojik olarak doğruluğu belirlenmiş olsa da, çalışma mekanizmaları hala belirsizliğini korumaktadır [61].

Günümüzde antikanser ajanı olarak kullanılan etken maddelerin % 60'ından daha fazlası bitkilerden elde edilmektedir [62]. NAPRALERT veri tabanında *Plantago* türlerinin birçok ülkede kanser tedavisinde kullanımına dair veriler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda cinsin bazı türlerinin kanser gelişimini önlediğine dair hipotezler bulunmaktadır. *Plantago* cinsinin 18 türünde yüksek oranda bulunan flavonoid içerik incelediğinde luteolin-7-O-glukozit bileşenin baskın olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiğin antitümöral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Etki mekanizması tam olarak anlaşılamasa da glikolitik enzimler veya protein sentezi gibi çeşitli metabolik yolları ve topoizomerez I ve II'nin fonksiyonunu etkilediği ileri sürülmektedir [11].

Plantago cinsi yaygın olarak müsilaj kaynağı olarak kullanılmakta olup özellikle yaprakları % 8 oranında müsilaj içermektedir. Müsilaj su ile yavaş yavaş hidratlaşarak sindirim hareketini düzenleyen viskoz jel şeklinde müshil etkisi yapar. Bu amaçla *Plantago* müsilajı ishali tedavi etmede ticari olarak kullanılmaktadır [60]. Sheikh ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada Arap Zambkı (*Acacia senegal*) ve *Plantago* tohumları müsilajının farklı konsantrasyonları ile tavuk göğsünün raf ömrünü uzatmak amacıyla kaplanmıştır. Uygun koşullarda bekletilen örnekler değerlendirildiğinde % 25 *Plantago* bitkisi ile muamele edilen numunelerde, muamele edilmeyen kontrol grubuna göre daha az bakteri ürettiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile *Plantago* bitkisinin antibakteriyel özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir [63].

Plantago lanceolata kuru ağırlığının % 9'u kadar fenilpropanoit glikozitleri içermektedir. Bu bileşikler biyolojik açıdan aktif olup bitkiye antimikrobiyal, antifungal etkiler ile *in vitro* koşullarda antitümör aktivite ve de güçlü bir süperoksit anyonu gibi davranarak antioksidan özellik kazandırdığı bildirilmiştir [60].

P. lanceolata 'nın etanol ekstresinin histamin asetilkolin, baryum ve potasyum iyonlarının neden olduğu kasılmaları inhibe ederek antispazmodik etkiye sebep olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bitki bileşiklerinden luteolin, plantamajozit, akteozit, katalpol, izoakteozit, lavandulifoliozit ve okubinin ince bağırsakta aynı etkiye sebep olduğu raporlanmıştır [64].

Plantago asiatica'nın (*Plantaginis Herba*) toprak üstü kısımları, antik zamanlardan beri, diüretik, antienflamatuar ve astım ilacı olarak Çin ve Japonya'da kullanılmıştır. 'Plantaginis Herba' önemli bir ham ilaç olarak Japon Farmakopesi XI'de listelenmiştir ve bunun sulu özütü de ilaç olarak kullanılmaktadır. Plantaginis Herba'nın fenolik bileşiklerinin enzim önleme faaliyetleri c-AMP fosfodiesteraz üzerinde denenmiş ve bunların antibakteriyel ve immünosupressif gibi bazı biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir [65].

P. asiatica tohumlarının içeriğindeki polisakkaritin lipit absorpsiyonunda azalmaya neden olduğu ayrıca kandaki kolesterol, trigliserit değerinde ve karaciğerdeki lipit ve kolesterol seviyelerinde azaltma etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca *P. asiatica* tohumlarında bulunan polisakkaritin lipit metabolizması üzerinde ve kolon hastalıklarına karşı korunmada etkili olabileceği belirtilmiştir [66].

Plantago albicans bitki türüne has olan gallik asit, metilgallat, tri, tetra, penta-galloil- β -kemferol-3-O-p-soforo piranozit, kersetin-3-O-p-glukopiranozit-7-O- α -ramnipranozit, kemferol ve kersetin gibi birçok sekonder bileşen sayesinde siklofosamid ilacının genotoksisitesine karşı koruyucu bir rol oynadığı bildirilmiştir [67].

Plantago ovata, *Plantago psyllium* ve *Plantago indica* türleri, balgam söktürücü, antibakteriyel, diüretik, romatizma ve gut ağrıları tedavisinde ve bronşit tedavisinde geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Bitki çayı olarak da boğaz ağrısı, kuru öksürük ve ülser için yararlı olduğu bildirilmiştir [68].

Şeker alkollerini olan sorbitol (sinonimi: D-glusitol) *Plantago* cinsinde yaklaşık % 2 oranında bulunmakta ve bitkide kuraklık veya tuzluluk gibi stres koşullarında birikmektedir. Sorbitol % 60-70 sakaroz tatlılığına sahiptir ve besinsel olarak lezzet arttırmada kullanıldığı bildirilmiştir [60].

Plantago psyllium, hem suda çözünebilen hem de çözünemeyen fiberleri (lif) sayesinde iyi bir besin kaynağı ve gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. *P. ovata*, *P. psyllium*, *P. indica* bitki tohumlarında bulunan yüksek lif oranı, yüksek su tutma ve jelleşme özelliğindedir. Yapılan çalışmalarda *P. psyllium*'un laksatif aktiviteye sahip olduğu ayrıca kolesterol ve potansiyel kolon kanseri riskini azalttığı raporlanmıştır [69].

2.4.2. Türkiye' de *Plantago* Bitkisi

Plantaginaceae familyası, Türkçede sinirotugiller olarak adlandırılmıştır. *Plantago anatolica* (kırdakaraotu) ve *Plantago euphratica* (toklubaşı) türleri endemik olmak üzere

familyanın Türkiye’de 26 türü yetişmektedir [70-71]. Bitki Türkiye’de meralar ve çayırarda doğal olarak kendiliğinden yetişmektedir.

Fitokimyasal açıdan çok fazla aktif içeriğe sahip olduğu bilinen türün yerel halk tarafından tedavi amacıyla kullanılmasının yanı sıra insan ve hayvan besini olarak kullanıldığı bilinmektedir [72]. Türkiye’de bu aileye ait *Plantago coronopus* L., *Plantago major* L., *Plantago media* L. and *Plantago lanceolata* L. türleri geleneksel tedavide sıkça kullanılmaktadır [73]. Ülkemizde *Plantago lanceolata* hepatoprotektif yani karaciğeri korumada kullanılmaktadır [74].

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan *Plantago* tür/alttür ise şunlardır:

Plantago scabra

Plantago holosteum

Plantago lagopus → *Plantago major* subsp. *intermedia*

Plantago major → *Plantago major* subsp. *major*



Şekil 2. 4. *Plantago major* subsp. *major* bitkisi



Şekil 2. 5. *Plantago major* subsp. *intermedia* bitkisi

Plantago major L. geniş yapraklara sahip olduğu için İngiliz ayağı, büyük mürgen, iyileşme bıçağı, saman yemi ve beyaz adamın ayak izi gibi birçok isimle adlandırılmaktadır. Avrupa kıtası orijinli olup başta Amerika, Türkiye, Afganistan, Pakistan, Filistin ve Hindistan olmak üzere neredeyse tüm dünyada yaygın bir dağılım göstermektedir. Ilıman ve dağlık bölgelerde 600-3500 m yüksekliğe kadar yetiştiği bilinmektedir. Çayır-mera alanları, tarlalar, boş araziler, yol kenarı ve hendeklerde yaygın olarak bulunabilmektedir [4]. *Plantago major* L. yaklaşık 15 cm uzunluğunda küçük, uzun ömürlü bir bitkidir, ancak büyüyebilme özelliği bulunduğu habitatlarına bağlı olarak değişmektedir. *Plantago major*'un, dolgun, tüylü ve dikey otsu gövdesi bulunmaktadır.

Plantago major'un üç alt türü tanımlanmış olup bunlar *P.major* subsp. *major*, *P. major* subsp. *intermedia* ve *P. major* subsp. *winteri* 'dir. İlk iki alttür en çok bilinenidir. Morfolojik olarak benzer olmasına rağmen farklı habitatta yetişmeleri nedeniyle ile ayrı kabul edilir. Üçüncü alt tür literatürde bildirilmiştir ancak bu alttürler üzerinde çok fazla araştırma bulunmamaktadır.

Yürütülen çalışma kapsamında *P.major*'un *Plantago major* subsp. *intermedia* ve *Plantago major* subsp. *major* alt türleri çalışmaya dahil edilmiştir. İki alt tür farklı sitotipe sahiptir. Sitotipler ve kapsül başına tohum sayısı taksonomik kimliğin göstergesi olarak kullanılmaktadır. *P. major*'un alt türlerinin evrimi kromozomal olarak yeniden düzenlenmesinin sonucudur. Çoğu *P. major* karyotipleri *P. major* subsp. *intermedia* 'dan daha simetriktir. Morfolojik karakterler ve yaşam alanı, iki alt tür arasında ayrımı oluşturmaktadır. *P. major* subsp. *major* kış şartlarında soğuğa dayanıklı ve çim alanlarda, patikalarda, ekili alanlarda daha fazla bulunabilmektedir. Buna karşın *P. major* subsp.

intermedia kış şartlarında soğuğa daha az tolerans göstermekte olup ve denize yakın yerlerde daha fazla bulunabilmektedir. *P. major* subsp. *major*, *P. major* subsp. *intermedia* ile karşılaştırıldığında daha geniş yapraklara sahiptir ve kapsül başına birkaç tane tohum (4-15) üretirken, *P. major* subsp. *intermedia* daha dar yaprakları vardır ve genellikle her bir kapsülde çok sayıda küçük tohum (12-25) üretir [75].

P. major' un yaprak, kök, tohum gibi farklı kısımları terapötik amaçlı kullanılabilir. *Plantago* türlerinde yapraklar % 56,19'e kadar yüksek oranlarda esansiyel yağ asidi olan linolenik asit içerebilmektedir. *P. major* tohumlarında ise bu oran % 25,41'dir. Asit türün antioksidan özellik kazanmasını sağlamaktadır. Bunun dışında tohumları çeşitli gastrointestinal bozukluklar, böbrek sorunları, astım tedavisinde kullanılmaktadır; kökleri ise ateş ve kabızlık tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Kobeasy ve ark. (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada *P. major* yaprak ve tohumlarının etanolik, sıcak ve soğuk su ekstraktlarının antioksidan aktivitesi değerlendirildiğinde yapraklarının etanolik ekstraktında % 74'lük ve sıcak su özütünün ise % 54,6 oranında tümör hücresi üzerinde etki ederek apoptozisine yol açtığı bildirilmiştir [59].

P. major'un alkol ekstraktlarındaki bileşiklerin *Candida albicans* 'in üremesini inhibe ettiği, sulu alkol ekstresinin oksidatif hasar oluşturulmuş mitokondride *in vitro* koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [76].

P. major 'un polisakkarid, lipid, plantago asit türevleri, flavonoid ve diğer fenolik bileşikler, iridoid glikozit, terpenoid, alkaloid, oleanolik asit ve ursolik asit gibi bazı organik asitler şeklinde biyolojik olarak aktif bileşikler içermektedir. Bu metabolitlerin çeşitli terapötik potansiyellere sahip olduğu bilinmektedir. *Plantago major* türünün kimyasal analizinde aukubin glikozidi açısından zengin olduğu bildirilmiştir. Aukubin glikozidinin güçlü bir anti-toksin olduğu bildirilmiştir. Bu türde ayrıca askorbik asit, apigenin, baykalein, benzoik asit, klorojenik asit, sitrik asit, ferulik asit, oleanolik asit, salisilik asit ve ursolik asit gibi çok etkili bileşenler bulunmaktadır. *P. major*'un insanlarda lenfosit proliferasyonunu etkileyerek immün sistemi tetikleyici özelliğe sahip olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra bitkinin farklı kısımlarından üretilen ekstraktları cilt hastalıklarının tedavisinde, inflamasyon, sindirim ve solunum yolu hastalıkları, enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde diüretik, antiviral, anti-inflamatuar, anti-helmintik, analjezik, analeptik, antihistaminik olarak kullanılmaktadır [4,12,59,76,77].

Plantago major yüzyıllar boyunca bitkisel ilaç olarak tüm dünyada kullanılmıştır. Ekstreleri ve izole edilen bileşiklerin kronik kabızlığı iyileştirme ve ishal gibi bağırsak sorunları, böbrek, mesane ve hemoroid problemlerini hafiflettiği bildirilmiştir. Yetiştikleri yerlerde yöre halkı tarafından bitkisel çay, salata ve sebze olarak çeşitli şekillerde tüketilmektedir[59]. Dünya Sağlık Örgütü tarafından laksatif ajan olarak, hiperkolesterolemiyi tedavi etme ve kan şekerini düzenlenme açısından kullanım için onay verilmiş önemli bir tıbbi bitkidir. Fakat türün tüketiminin şişkinlik ve alerjik reaksiyonlar da dahil olmak üzere yan etkilere sahip olduğu da bildirilmiştir. Tür ayrıca karbamazepin, lityum, varfarin, demir takviyeleri, mineraller ve vitamin B12 takviyeleri ile etkileşime girme gibi yan etkilerde göstermektedir [68]. Dolayısıyla tüketimine dikkat edilmesi gerekmekte olup orta seviyede alerjik özellik taşımaktadır.

P.major' den dünyada çok sayıda ülke tedavi amacıyla yararlanmaktadır. Yunanistan'da böbrek taşı tedavisinde, Hindistan'da menstrüel bozukluklarda, Güney Afrika'da gebelik sorunlarında, Panama'da renal, mesane ve göz enfeksiyonlarında, İran ve Hindistan'da üriner sistem enfeksiyonlarında, kalp ve dolaşım hastalıklarında, hematolojik rahatsızlıklarda, Vietnam'da diüretik, Türkiye'de laksatif olarak, Brezilya'da hemoroit tedavisinde, Brezilya ve Amerika'da analjezik, Kanarya Adaları, Şili, Venezuela'da tümör tedavisi, Arjantin'de antihelmitik, antimalaria, ABD ve Hindistan'da panzehir olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2. 6. *Plantago scabra* bitkisi

P. scabra diğer *Plantago* türlerinden yapısal olarak farklılık taşımaktadır. Gövdesi dik dallardan oluşan yükselici kısa tüysü yapıya sahip olup tüm sepalleri eşit uzunlukta, korolla tüpü serttir. Alt kısımda bulunan brakteler geniş damarsı yapıda ve tabanı oval

emberseldir. En yukarda bulunan brakteler büyük ve yassı olup bitkinin üzerinde sert, kısa yapıda çok sayıda salgı tüyü bulunmaktadır [78]. Ana bileşeni olarak düşük konsantrasyonlarda aukubin beraberinde plantarenalozid olduğu bildirilmiştir. Sinonimi olan *Psyllium*'un içeriğinde bartsiozid olduğu belirlenmiş ve bunun önemli bir kemosistematik belirteç olarak işlev g rd  u bildirilmiştir [58]



Şekil 2. 7. *Plantago lagopus* bitkisi

Türkiye'de başta Ege ve Akdeniz Bölgelerinde yetişen *Plantago lagopus* 2000 m y ksekl  e kadar olan yol kenarlarında, ayır ve kayalık alanlar yanında, sahil kenarında yetişmektedir. Boyu yeti ti i alana bağlı olarak 5 cm'den 45 cm kadar uzayabilmekte olup tek yıllık bitkidir.

Biyolojik aktif maddeler açısından *Plantago lagopus*' nin toprak üstü kısımlarının fitokimyasal analizlerde terapötik bakımdan zengin bir polifenol kaynağa ve biyolojik polimerlere sahip olduğu bildirilmiştir. T r n aktivitesi polifenolik bileşiklere bağlı olabilir. Yapılan alı malarda, *P. lagopus*'un amojozid, luteolin-7-O-monoglukozit, rozmarinik asit ve klorojenik asit, iridoid glukozitleri katalpol, harpagozid (2), aukubin, 10-benzoilkatalpol ve 6 - hidroksigenipozid gibi önemli tıbbi özelliği bulunan fenolik içeriğe sahip olduğu bildirilmiştir . Türkiye'de halk arasında laksatif ve ağrı kesici olarak kullanılmaktadır [79-80].



Şekil 2. 8. *Plantago holosteum* bitkisi

Sinonimi *P. carinata* veya *P. subulata* olarak bilinmektedir. *Plantago* cinsine ait tek yıllık türdür. Ortalama 15-40 cm kadar uzayabilmekte de olup çiçeklenme dönemi mayıs ayından h3aziran ayına kadar devam etmektedir. Morfolojik olarak diğer *Plantago* türleri ile karşılaştırıldığında bu türlerin yapraklarından daha dar ve şeritsi yapraklara sahiptir. Yaprak genişliği genellikle 1mm'dir. Gövde kısmı odunsu ve yoğun bir şekilde dallanmıştır. Dağlık alanlarda yayılım gösterdiği bilinmektedir. *P. holosteum* türünün adlandırılması Iamónico ve ark. tarafından yapılmıştır. Ancak bu türün taksonomisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Çoğu modern taksonomik sınıflandırma, *P. holosteum*'u ayrı bir tür olarak kabul eder,ö ancak taksonomik sınıflandırmalarda bu ismi *P. subulata*'nın eşanlamlısı olarak kabul etmektedir [81].

Türkiye'de Kırklareli, Bursa, Kastamonu, İzmir, Kütahya, Eskişehir, Ankara, Isparta, Konya illerinde doğal olarak yetişmektedir [82].

2.5. Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Test Sistemleri

Bileşiklerin mutajenik/antimutajenik etkilerinin değerlendirilmesinde uzun zamanlı testlerin pahalı ve fazla kaynak gerektirmesi, uzun sürmesi gibi nedenlerden dolayı kısa zamanlı testler tercih edilmektedir. Bu testler mutajenler/antimutajenlerin taramasında hızlı ve gözlem araçlarının ucuz olması tercih sebebi olmaktadır. Kısa zamanlı testlerin öngörücü tahminleri uzun vadeli hayvan biyolojik testler ile eşdeğer olarak değerlendirilmektedir. Kısa zamanlı testler olarak SOS kromo test, mikronükleus testi, kromozom anomali testi, Ames testi ve komet testi sayılabilmektedir. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan test ise Ames testidir [83-86].

Kısa zamanlı testler, ileri ve geri mutasyon testleri olarak gruplandırılabilir. Bunlarda ileri mutasyon testleri genellikle ilaç hassasiyetinden ilaç direncini belirlemeye kadar geniş bir hedefe sahiptir. Bu testler birçok mutajenik etki türünü belirleyebilmekte, fakat etkiye sebep olan mekanizmaların saptanması noktasında yetersiz olduğu görülmektedir.

Mutajenik/antimutajenik etkiye sahip bileşiklerin *in vivo* olarak deney hayvanları üzerinde test edilmesi daha etkin sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır. Ancak bu tür çalışmaların sonuçlandırılması, hem çok uzun zaman gerektirmekte hem de yüksek maliyetli olabilmektedir. Özellikle bakteriyel geri mutasyon testleri kolay uygulanabilir olması ve birçok maddeyi aynı anda tarama imkanı vermesi nedeniyle kimyasalların güvenliği ve ilaç geliştirmenin ilk aşamasında mutajenik/antimutajenik potansiyelinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Geri mutasyon testlerinde kullanılan bakteriler DNA'sının belirli bir lokusunda (amino asit okzotrofisi) mutasyon taşımaktadır. Bir mutajen varlığında, bakterilerin mutasyonları geri dönüşümlü olabilmekte ve kendi amino asitlerini sentezleyebilir hale gelmektedir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan primer test *in vitro* Ames testidir [14].

İnsanlarda klinik araştırmadan önce ilaç adaylarının genotoksitesinin bir dizi test çalışmaları yapılarak güvenliği değerlendirilmektedir. Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) S2R1 kılavuzluğunda desteklenen batari test sistemleri bu potansiyelin tanımlanmasında en uygun sistem olarak görülmektedir. Bu testler bakteride gen düzeyinde mutasyonları, memeli hücresinde *in vitro* kromozomal anomaliler gibi birçok testi içermektedir. Sistemde birkaç testin birlikte uygulanarak kimyasalların oluşturabileceği farklı hasar tiplerinin değerlendirilmesi sağlanmaktadır. Aday bir kimyasalın mutajenik veya antimutajenik etkisinin belirlenmesinde ise genellikle ilk aşamada bakteriyel geri mutasyon testi kullanılmaktadır [86].

2.5.1. Ames Test Sistemi

Ames testi kimyasallar aracılığıyla tetiklenen mutasyonların genomik düzeyde değerlendirilmesinde en sık ve ilk başvuru bakteriyel geri mutasyon testidir [87]. Testin çok sayıda kimyasal aynı anda ve kısa sürede taranmasına olanak vermesinin yanında kimyasal karsinojenler ile DNA arasındaki reaksiyonun baz düzeyinde (çerçeve kayması mutasyonları veya baz-çifti substitüsyonları) tahmininde öngörü sağlamak gibi avantajları bulunmaktadır. Bu yüzden faz-I klinik denemelerinden öncede yapılması gerekli testlerin başında gelmektedir [17,87-88].

Test, LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonla histidin aminoasidini sentezleyemeyen *S. typhimurium* (*his*-) mutant suşlarının (TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537...) kullanılmasıyla gerçekleştirilmekte olup suşların genotipik özellikleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir. Suşların her biri 10 enzimatik kademedan oluşan histidin operonun farklı noktasındaki gen üzerinde mutasyon taşımaktadır. Mutasyonlardan her biri farklı etki mekanizmalarına sahip mutajenlerin karakterizasyonu belirlenmesini sağlamaktadır [17,89].

Test sisteminin temelinde; mutajen özelliğe sahip maddeler *S.typhimurium* (*his*-) mutantlarının DNA'sını etkileyerek *his* operonunda geri mutasyonlara neden olmak suretiyle *his*⁺ suşlar haline getirmesine dayanmaktadır.

Çalışmada kullanılan *S.typhimurium* ve *E.coli* WP2 *uvrA* test suşlarının genel özellikleri aşağıda özetlenmiştir;

Çizelge 2. 1. Ames test sisteminde kullanılan *Salmonella* suşlarının genotipik özellikleri [17]

Suşlar		Genotipik Özellikleri			DNA Dizileri	
	Mutasyon	Bio chlO uvrB gal	Plasmid	LPS Hasarı	DNA'daki hedef bölge	Geri Dönüşüm Mekanizması
TA98	hisD3052	Delesyon	pKM101	rfa	.G-C-G-C-G-C.	Çerçeve Kayması
TA1538			yok			
TA100	hisG46		pKM101		.G-G-G.	Baz Çifti Değişimi
TA1535			yok			
TA102	hisG428	Atasal	pKM101+ pAQ1		TAA (ochre)	Transisyon/Transversiyon
TA104			yok			
TA1537	hisC3076	Delesyon	yok			C-C-C dizi yakınına +1

2.5.1.1. Histidin mutasyonu

Test sisteminde kullanılan *S. typhimurium* suşunun her biri histidin operonunun çeşitli bölgelerinde baz değişimi, nokta mutasyonu ya da çerçeve kaymasına neden olan insersiyon veya delesyon tipi gen mutasyonları taşımaktadır. Bu mutasyonlar suşların yaşayabilmesi için elzem olan histidini üretememesine sebep olmaktadır. Testte farklı

genetik mutasyonlara sahip (TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537...) test suşlarının kullanılmasıyla, test kimyasalının sebep olabileceği mutasyonların gen düzeyindeki mekanizmaları belirlenebilmektedir [17].

TA1535 ve TA100 suşları HisG46 mutasyonu varlığında bir lösin'in (GAG / CTC) bir proline (GGG / CCC) dönüşmesinden elde edilmiştir. Bu mutasyon, baz değişimine neden olan mutajenler tarafından geri dönüştürülmektedir. TA1538 ve TA98 suşlarında taşınan *HisD3052* mutasyonunda ise histidin sentezinden sorumlu *hisD* geninde sekiz GC tekrar bölgesinde bir baz eksilmesiyle çerçeve kayması meydana gelmiştir. Bu durum suşların çerçeve kaymasına neden olan mutajenler tarafından geri döndürülebilmektedir. Böylece buna sebep olan mutajenlerin belirlenmesi sağlanabilmektedir [17].

TA 1537 suşunun *hisC307* mutasyonu, C-C-C- tekrar sekans bölgesi yakınına bir baz eklemesi ile oluşan çerçeve kayması gerçekleşmektedir. Bu suş *hisD3052* tarafından kolaylıkla belirlenemeyen çerçeve kaymasına sebep olan mutajenlerin belirlenmesinde etkindir. TA 97 bulunan *hisD6610* mutasyonu (C-C-C-C-C-C-) 6 sitozinden bir bazın çıkması sonucunda çerçeve kayması ile oluşmaktadır. Bu suşun çerçeve kayma mutasyonlarına sebep olan mutajenlere TA 1537'den daha hassas olduğu düşünülmektedir. TA 102 ve TA 104 suşları hariç diğer suşlar GC baz çifti içeren DNA hedef bölgelerine hassasiyet içeren mutajenleri tanımlarken bu suşlar AT baz çiftinin olduğu *hisG428* mutasyonlu bölgenin tanımlanması için geliştirilmiştir. TA 102 suşunda gen dizisinin 839 -853 pozisyonları arasında atasal suş dizilimi A-G-A-G-C-A-A-G-C-A-A-G-A-G-C iken A-G-A-G-C-A-A-G-T-A-A-G-A-G-C dizisine dönüştürülmüştür. 847. pozisyonundaki sitozin mutasyonla timine dönüştürülerek ochre (dur) kodonu oluşturulmuştur. TA 102 suşunda diğerlerinden farklı olarak mutasyon bölgesinin 30 çoklu kopyasını taşıyan pAQ1 plazmidi bulunmaktadır. Plazmid tetrasiklin direnç markırı plazmitin varlığının belirtecidir [17,24]. TA 102 suşunda bulunan *HisG428* mutasyonu, TAA, bir ochre mutasyonudur. TAA bölgesini içeren *hisG* gen mutasyonu hem transisyon hem de transversiyonun olduğu altı olası baz çifti değişikliğine ve oksidatif hasara neden olan mutajenler tarafından geri döndürülür. Buna ek olarak, bleomisin ve mitomisin C gibi çapraz bağlayıcı maddeleri TA102 suşu tarafından tespit edilebilmektedir [17].

2.5.1.1. *rfa* mutasyonu

Tüm suşlar lipopolisakkarit hücre duvarını kodlayan gende (*rfa*) mutasyon taşır. Böylece daha büyük moleküllerin hücre içine nüfuz etmesine, dolayısıyla bakteri DNA'sını etkilemesine sebep olur [17].

2.5.1.1. *uvrB/ uvrA* mutasyonu

S. typhimurium suşlarında ve *E.coli* WP2 suşunda var olan bu mutasyon, DNA kesip çıkarma onarım sistemi ile ilgili enzimi kodlayan *uvrB/uvrA* genindeki delesyonla oluşmaktadır. Onarım sisteminde hata taşıyan suşun hata oranı yüksek (SOS) onarım sistemini çalıştırarak daha fazla mutajene karşı hassasiyetinin artırılması sağlanmıştır. Fakat *S. typhimurium* suşlarında bu mutasyon oluşturulurken tamamen tesadüfi olarak H vitamini olarak da bilinen biyotin sentezinden sorumlu gen bölgesinin delesyonu da söz konusu olmuştur. Bu yüzden *S. typhimurium* suşları biyotin açısından da okzotrof hale gelmiştir [17].

2.5.1.1. R faktörü

S. typhimurium suşlarında mutajen maddelere olan hassasiyetin artırılması amacıyla SOS onarım sistemine ait genlerin çoklu kopyalarını taşıyan pKM 101 plazmiti eklenerek mutant bakteri suşlarının mutajenlere karşı hassasiyeti geliştirilmiştir. Plazmitin belirteci olarak ampisilin direnç geni konulmuştur. TA102 suşunda ise oksidatif mutajenlerin tespitinde kullanılan ve tetrasiklin dirençlilik geni taşıyan pAQ1 plazmiti eklenmiştir [17].

2.5.2. *Escherichia coli* WP2 Test Sistemi

E. coli WP2 testi bir Ames testi analogudur. Bu test sisteminde *E. coli* WP2 mutant suşları kullanılmaktadır. Testte kullanılan *E. coli* WP2 mutant suşları triptofan sentezinden sorumlu operonda *trp E65* geninde AT baz değişimi sonucu ochre (UAA) nokta mutasyonu taşımaktadır. *E.coli*'nin suşlarının bazıları mutajen hassasiyetini arttırmak için plazmid taşımakta ve *uvrA* duyarlılığı bulundurmaktadırlar. Testte kullanılan *E. coli* WP2 suşları ise WP2 (DNA onarımı için yabancı tip), WP2 (pKM101), WP2 *uvrA*, WP2 *uvrA* (pKM101)'dır [90-91].

E.coli WP2 geri mutasyon testi ve Ames *Salmonella* testi uluslararası kuruluşlar tarafından da (Organisation for Economic Co-operation and Development ,International Conference on Harmonisation , Japanese Ministry of Health and Welfare, and United States Environmental Protection Agency: Health Effects Test Guidelines International Workshop on the Standardization of Genotoxicity Test Procedures) uygulanabilir testler olarak kabul edilmekte olup kimyasalların mutajenite/ antimutajenite varlığını gözlemlemek amacıyla birlikte yapılması önerilen testlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmada Kullanılan Test Suşları

S. typhimurium TA98 (*his*⁻ *bio*⁻, *amp*⁺, *uvrB*⁻), TA100 (*his*⁻, *bio*⁻, *amp*⁺, *uvrB*⁻), TA102 (*his*⁻, *bio*⁻, *amp*⁺, *uvrB*⁻, *tetrasiklin*⁺) mutant bakteri suşları Dr. Bruce N. Ames'ten (California Üniversitesi, Berkeley) ve *E.coli* WP2 *uvr A* (*trp*⁻, *uvrA*⁻) suşu (Moltox)

3.2. Çalışmada Kullanılan Bitki Ekstreleri

Çalışmada *Plantago* cinsine ait beş adet bitki ekstresi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi bölümünden liyofilize halde temin edilmiş olup kullanılan ekstraksiyon yöntemi şu şekilde özetlenebilir:

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan *Plantago* cinsine ait beş adet bitki ekstresinin toplandığı yer, otörü ve herbaryum numarası

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Herbaryum Numarası (HÜEF)
<i>Plantago major</i> L. subsp. <i>major</i> L.	Trabzon-Maçka	09009
<i>Plantago major</i> L. subsp. <i>intermedia</i> (GILIB.) LANGE	Ankara merkez	09005
<i>Plantago lagopus</i> L.	Burdur - Antalya	09325
<i>Plantago scabra</i> MOENCH	Kırıkkale – Ankara yolu	11002
<i>Plantago holosteum</i> SCOP.	Beypazarı /Ankara, kök ve toprak üstü	11001

Bitkilerin laboratuvarında ve gölgede kurutulan toprak üstü kısımları toz edildikten sonra metanol ile 40C' de rotavaporda 3 kez ekstre edilmiştir. Birleştirilen metanol ekstratları darası alınmış balona aktararak alçak basınç altında ve düşük ısıda (40C), rotavaporda kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Kuru metanol ekstresi 100 ml su ile çözülerek ayırma hunisinde petrol eteri (100 ml) ile 5 kez ekstre edilmiştir. Böylece klorofil gibi polar olmayan maddeler uzaklaştırılmış ve sulu faz kuruluğa kadar yoğunlaştırılarak sulu ekstre hazırlanmıştır. Hazırlanan sulu ekstratlar az miktarda su ile çözülerek liyofilize edilmiştir. Liyofilize ekstrenin belirli bir kısmı (2 g) aktivite çalışmaları için ayrıldıktan sonra ekstratlar üzerinde fitokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir [114].

Plantago cinsine ait bitkiler:

Test edilecek ekstrelerin tümü % 10'luk DMSO içerisinde çözülmüştür. İlk aşamada bitki ekstralarının sitotoksik konsantrasyonları belirlenmiştir. Daha sonra toksik olmayan en yüksek konsantrasyon esas alınarak antimutajenik etki çalışmaları yürütülmüştür.

3. 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

3. 3. 2. Pozitif Mutajenler

Ames test sisteminde, danomisin (Deva Holding A.Ş), sodyum azid Sigma®), mitomisin-C (MMC) (Sigma®), 1-Metil-3-nitro-1-nitrozoguanidin (MNNG) (Molttox®) kullanıldı.

3. 3. 3. Diğer Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan D- biyotin, L- histidin- HCl monohidrat, kristal viyole, tetrasiklin, sitrik asit monohidrat, sodyum amonyum fosfat ve D- glukoz (Sigma®); ampisilin trihidrat ve etanol (Fluka®); sodyum hidroksit (Merk®) ve potasyum fosfat (Merck®); bakteriyolojik agar (no:1) ve nutrientbroth (no:2) (Oxoid®) , L-Triptofan (Sigma®) ‘dan sağlandı.

3. 4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Besi Ortamları

Vogel- Bonner- E Tuz Çözeltisi (50x VB) (500 ml için)

Distile su	335 ml
Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5 g
Sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	50 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	250 g
Sodyum amonyum hidrojen fosfat ($NaH_2N_4PO_4 \cdot 4H_2O$)	87,5 g

Tuz çözeltisi hazırlığı aşamasında eklenen kimyasal maddelerin sırasına ve bir önceki eklenen kimyasalın tamamen çözünmesine özellikle dikkat edilerek protokol uygulanmıştır. Tuzlar manyetik karıştırıcı üzerinde yaklaşık 200 ml olan sıcak suya protokolde belirtilen sıra ile eklenmiştir. Ekleme işlemi yapıldıktan sonra toplam hacim, distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan tuz çözeltisi minimal agar, histidin-biyotin-ampisilin-tetrasiklin içeren besi yerlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır [17].

% 20 Glukoz Çözeltisi (100 ml için)

Glukoz	20 g
Distile su	100 ml

Glukoz distile su içersine eklenerek otoklavda steril edilmiştir. Ortam deneylerin hemen öcesinde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti MGA, HB ve HBA agar plakların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Minimal Glukoz Agarlı Besi Yeri (1000 ml için)

Distile su	880 ml
Bacto agar	15 g
50X VB çözeltisi	20 ml
% 20 glukoz çözeltisi	100 ml

50xVB tuz çözeltisi ve glukoz çözeltisi ayrı ayrı steril edildi. Antimutajenite, genetik işaret kontrolü ve geri dönüş frekansının belirlenmesi deneylerinde kullanıldı [17].

Tetrasiklin Çözeltisi (8 mg/ml) (100 ml için)

Tetrasiklin	0,8 g
0,02 N HCl	100 ml

Master plakların hazırlanmasında ve pAQ1 plazmidi taşıyan TA102 suşunun genetik işaretlerinin kontrol edilmesinde kullanılmıştır.

Histidin Çözeltisi (% 0.5 w/v) (100 ml için)

Distile su	100 ml
L-Histidin	500 ml

Master plak ve genetik kontrol için hazırlanan çözelti minimal ortamın zenginleştirmek için kullanılmıştır.

Histidin- Biyotin- Ampisilin ve Tetrasiklinli Besi Yeri (1000 ml için)

Distile su	860 ml
Bacto agar	15 g
50X VB çözeltisi	20 ml
% 20 glukoz çözeltisi	100 ml
Steril histidin HCl (% 0,5)	10 ml
Steril 0,05 mM biyotin	6 ml
Steril ampisilin çözeltisi	3,15 ml
Steril tetrasiklin çözeltisi	0,25 ml

Her bir suşun genetik özelliklerinin test edilmesi ve master plaklarının hazırlanması için kullanılmıştır [17].

Kristal Viyole Çözeltisi (% 0,1'lik) (100 ml için)

Kristal viyole	0,1 g
Distile su	100 ml

Suşların rfa mutasyonu taşıyıp taşımadıklarının kontrol edilmesi sırasında kullanılmıştır [17].

% 0,4'lük Triptofan Çözeltisi (100 ml için)

L-Tritofan	400 mg
------------	--------

Her deney öncesi 4 mg L-Triptofan 1 ml distile su içerisinde vorteks yardımıyla çözülmüştür. Hazırlanan çözelti üst ağara eklenmiştir. *E. coli* mutant suşunun genetik kontrolü için kullanılmıştır.

Üst Agar (100 ml için)

NaCl	0,5 g
Bacto agar	0,6 g
Distile su	100 ml

Hazırlanan üst agar otoklavda steril edilerek geri dönüş ve antimutajenite uygulamaları için kullanılmıştır.

Sıvı Ortam (Nutrient Broth) (1000 ml için)

Oxoid nutrient broth No:2	15 g
Distile su	1000 ml

Gecelik kültürlerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Ampisilin Çözeltisi (100 ml)

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

Hazırlanan çözelti otoklavda steril edildikten sonra Ampisilin direnç faktörü (R) taşıyan pKM101 plazmidi içeren *Salmonella* test suşlarının genetik işaret kontrolünde ve master plakların hazırlanmasında kullanılmıştır [17].

Nutrient Agarlı Besi Yeri (1000 ml için)

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

Hazırlanan besiyeri ortamı otoklavda steril edilerek suşların üretilmesinde, sitotoksite kontrolünde ve *uvrB*, *uvrA*, *rfa* gibi mutasyonlara sahip suşların genetik işaret kontrolü sırasında katı ortam olarak kullanılmıştır.

Histidin / Biyotin Çözeltisi (0,5 mM) (1000 ml için)

Distile su	1000 ml
D-Biyotin	124 mg
L – Histidin-HCl	96 mg

Çözelti *S. typhimurium* suşlarının geri dönüş ve antimutajenite deneyleri sırasında kullanılmıştır. Maddeler sırası ile distile suyun içinde çözülmüştür. Daha sonra karışım otoklavda steril edilip +4 ° C’de saklanmıştır.

Her 100 ml’lik üst agar içine 10 ml his/bio çözeltisi eklenerek deneylerde kullanılmıştır. Böylelikle ortama konulan eser miktardaki his/bio çözeltisi ile bakterilerin birkaç bölünme geçirmelerine izin verilmiştir.

0,5 mM Triptofan Çözeltisi (100 ml için)

L-Triptofan	10,2 mg
-------------	---------

10,2 mg L-Triptofan 100 ml distile su içerisine konularak otoklava verilmiştir. Elde edilen çözelti deneylerde kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır. *E.coli* WP2 *uvrA* suşunun geri dönüş ve antimutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

3.5. Çalışmada Kullanılacak Suşların Üretilmesi

3.5.1. *E.coli* WP2 *uvrA* suşunun üreme durumunun belirlenmesi

E.coli WP2 *uvrA* suşunun üreme durumunun belirlenmesi amacıyla canlı hücre sayımı yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla öncesinde tüm genetik işaretleri doğrulanan koloniden hazırlanan bakteri kültürü çalkalamalı etüvde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasındaki 8 saat boyunca her saat başı alınan örneklerle deney gerçekleştirilmiştir. Uygulamalarda örnekler 1/10 oranında besiyeri içerisinde 7 kez seyreltilmiştir. Bu amaçla her ependorf tüpüne 0,9 ml steril serum fizyolojik konulmuştur.

Etüvden alınan süspanse bakteri kültüründen 0,1 ml alınarak ilk ependorfa konulmuştur. Her seferinde iyice vortekslenip içerisinden 0,1 ml alınarak diğer ependorfa aktarılmıştır. Her bir seyreltme oranından 0,01ml alınarak nutrientagar plağındaki uygun alanlara ekim yapılmıştır. Petriler 37° C’de etüvde bir gece inkübe edildikten sonra koloni sayımları gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. *S.typhimurium* suşlarının üretilmesi

S. typhimurium TA98, TA100 ve TA102 suşlarının -80°C’de saklanan örneklerinden gecelik nutrientagarlı plaklara tek koloni ekimi yapıldıktan sonra 37°C’deki etüvde bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Ardından üremiş olan tek koloniler histidin, biyotin, süşun özelliğine bağlı olarak ampisilin ve tetrasiklin içeren MGA ortamlı plaklara aktarılmıştır. Genetik işaretleri kontrol edildikten sonra antimutajenite uygulamalarında kullanılmıştır. [17].

3.6. Çalışmada Kullanılacak Suşların Saklanması

E.coli WP2 *uvrA* ve *S.typhimurium* TA 98, TA 100 ve TA 102 suşların -80 °C’de saklanan stok kültürleri çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelene kadar çözünmesi sağlanmıştır. Suşların ampisiline direnç özelliklerinin kaybolmaması için (*E.coli* hariç) ampisilin içeren sıvı ortama ekimleri yapıldıktan sonra 37°C’de çalkalamalı etüvde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Bu üreme durumunun kontrolü amacıyla nütrientli plaklar üzerinde canlı hücre sayımı yapılmıştır. Genetik kontrolleri yapılan suşlardan uygun olanlar seçilerek master plaklara alınmıştır. Stok hazırlaması için steril tüpler içerisindeki her bir süşun logaritmik fazdaki kültürleri üzerine son konsantrasyon % 10 olacak şekilde DMSO eklenmiştir. Tüpler hızlı bir şekilde sıvı azot içine konularak dondurulmuştur. Suşların canlılıklarını ve sahip oldukları genetik özelliklerini korunması amacıyla -80 °C’deki derin donduruda saklanmıştır [17].

3.7. Çalışmada Kullanılan Test Suşlarının Genetik Kontrolü

Çalışmanın güvenilirliği açısından kullanılan suşların sahip olması gereken genetik özelliklerin varlığı her deney öncesi kontrol edilmiştir. Bakteri suşlarından bazılarının genetik kontrolü (*S. typhimurium* TA 98 ve *E.coli* WP2) Şekil 2.9 ve Şekil 2.10’da örnek olarak gösterilmiştir.

3.7.1. Histidin Gereksinim Kontrolü

Çalışmada kullanılacak olan *S. typhimurium* suşlarının histidin açısından okzotrof (*his⁻*) oldukları doğrulanmalıdır. Suşların bu karakteri açısından kontrolünde aynı koloniden

alınan bakteri örneği histidin aminoasidi bulunan ve bulunmayan minimal glukoz agarlı (MGA) ortamlara çizgi ekimi ile aktarıldıktan sonra 48 saatlik inkübasyon için plaklar 37 °C'deki etüve kaldırılmıştır. Suşların üreme durumları karşılaştırılmış ve suşların histidinli ortamda üreyebilirken, histidinsiz ortamda üreyemedikleri belirlenmiştir. Bu şekilde suşların histidin açısından okzotrof olduklarına dair özellikleri test edilerek doğrulanmıştır [17].

3.7.2. Triptofan Gereksinimi Kontrolü

Esansiyel aminoasitlerden triptofan açısından okzotrof olan *E. coli* WP2 *uvrA* suş örneği triptofan içeren ve içermeyen MGA'lı plaklara çizgi ekimi yöntemi kullanılarak etüvde 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Uygulamalar sonrasında yalnızca triptofan içeren MGA ortamı içeren plaklarda üreme görülmesiyle kullanılan test bakterisinin triptofan okzotrofu olduğu doğrulanmıştır.

3.7.3. Biotin Gereksinim Kontrolü

Çalışmadaki *S. typhimurium* suşlarından TA 102 suşu hariç diğer *Salmonella* suşları histidin yanında biyotine de ihtiyaç duymaktadır. TA 102 suşu diğer *Salmonella* suşlarının taşıdığı *bio* genini de kapsayan *uvrB* mutasyonu taşımamaktadır. Bu nedenle TA 102 hariç diğer *Salmonella* suşları hem histidin-biyotin (HB) içeren MGA 'lı ortama hem de yalnızca biyotin içeren MGA'lı ortamlara çizgi ekimi yapılarak etüvde 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda yalnızca biotin içeren ortamda üremenin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Yalnızca biyotinli plakta ürememesi suşun biyotin açısından okzotrof özelliği test edilerek doğrulanmıştır.

3.7.4. *rfa* (*Rough A*) Mutasyonu Varlığının Kontrolü

Gecelik kültürü hazırlanmış *S. typhimurium* test suşlarından 0.1 ml alınarak nutrientagarlı plaklara aktarılmıştır. Üçgen uçlu cam baget yardımıyla yayma tekniği kullanılarak tüm yüzeye homojen olarak yayılmıştır. Filtre kağıdına kristal viyole emdirilmiş olan diskler plakların orta kısımlarına yerleştirilmiştir. Plaklar bir gece 37 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Suşların kısmen kristal viyoleye maruz bırakılması esasına dayandırılan bu aşama sonucunda boya bulunan disk etrafında bir zon oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu zon büyük bir molekül olan kristal viyolenin hücre içerisine girerek bakteri ölümüne neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Böylelikle bakterilerin *rfa* mutasyonu taşıdıkları doğrulanmıştır [17].

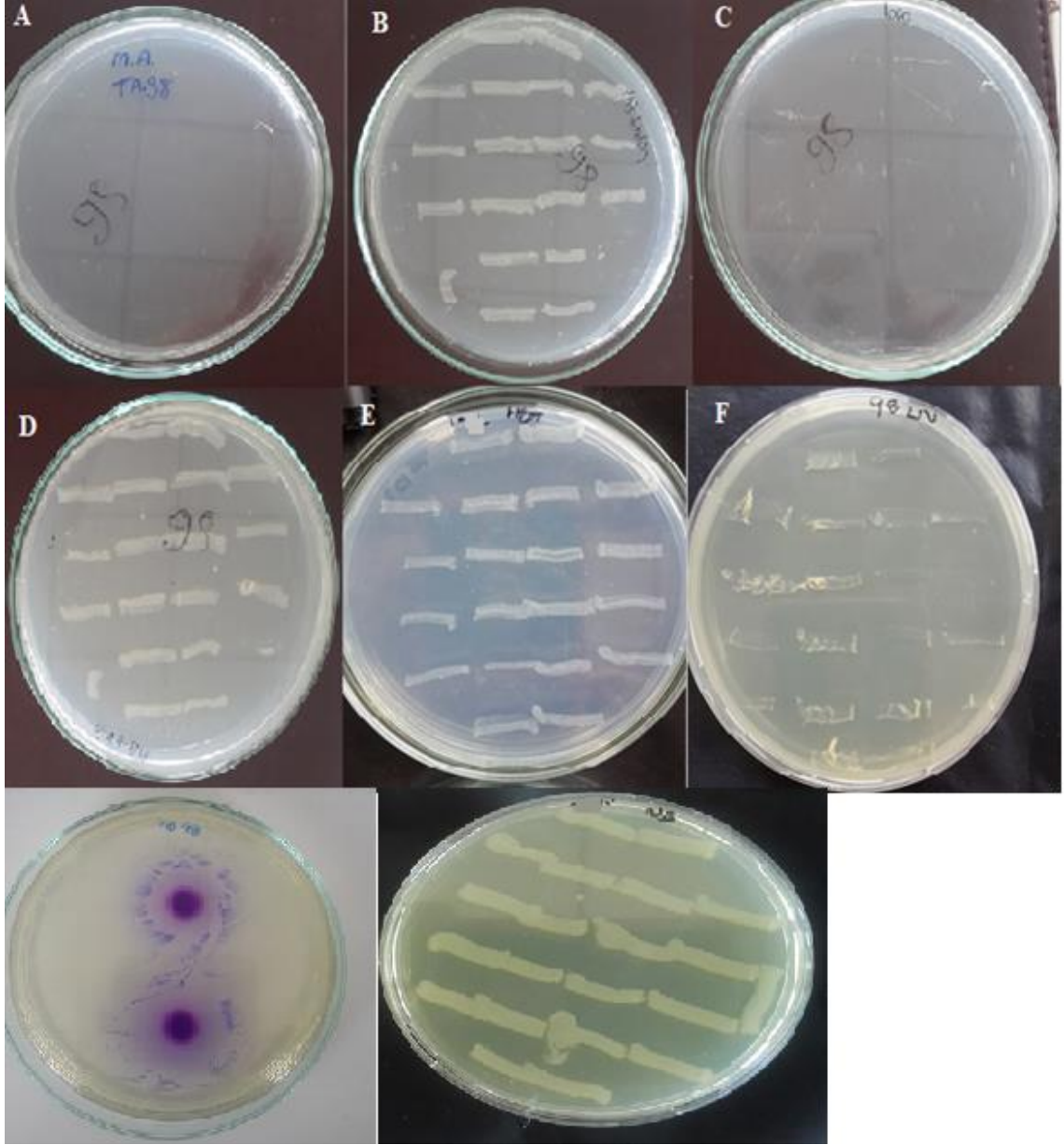
3.7.5. *uvrB* ve *uvrA* Mutasyonu Kontrolü

Çalışmada kullanılan organizmalar nükleotit kesip çıkarma onarım sisteminde çeşitli mutasyonlar taşımaktadır. Bunlardan *E. coli* WP2 *uvrA* mutant suşu *uvrA* mutasyonu taşıırken, *S. typhimurium* mutant suşları *uvrB* mutasyonu taşımaktadır. Bu mutasyonların varlığıyla test suşlarının ultra viyole ışınlarına duyarlılığı test edilmektedir. Bu test aşamasında, gecelik kültürleri hazırlanan bakteriler iki farklı nutrient agarlı besi yeri içeren petrilere çizgi ekimi tekniği kullanılarak aktarıldı. Ortamlardan biri kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer ortamlar ise kapağı açılarak 15 watt'lık germisidal UV lamba altında 33 cm'lik mesafeden 8 sn boyunca ışınladı. Daha sonra kontrol ve ışınlanmış plaklar bir gece 37°C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yapılan kontrollerde kontrol plağında beklendiği gibi normal üreme görülürken, UV' ye tutulan plakta eser miktarda üreme olduğu gözlemlenmiştir. Bu şekilde test bakterilerinin *uvrA* ve *uvrB* mutasyonlarını taşıdıkları doğrulanmıştır[17].

3.7.6. pKM101 Plazmit Varlığının Kontrolü

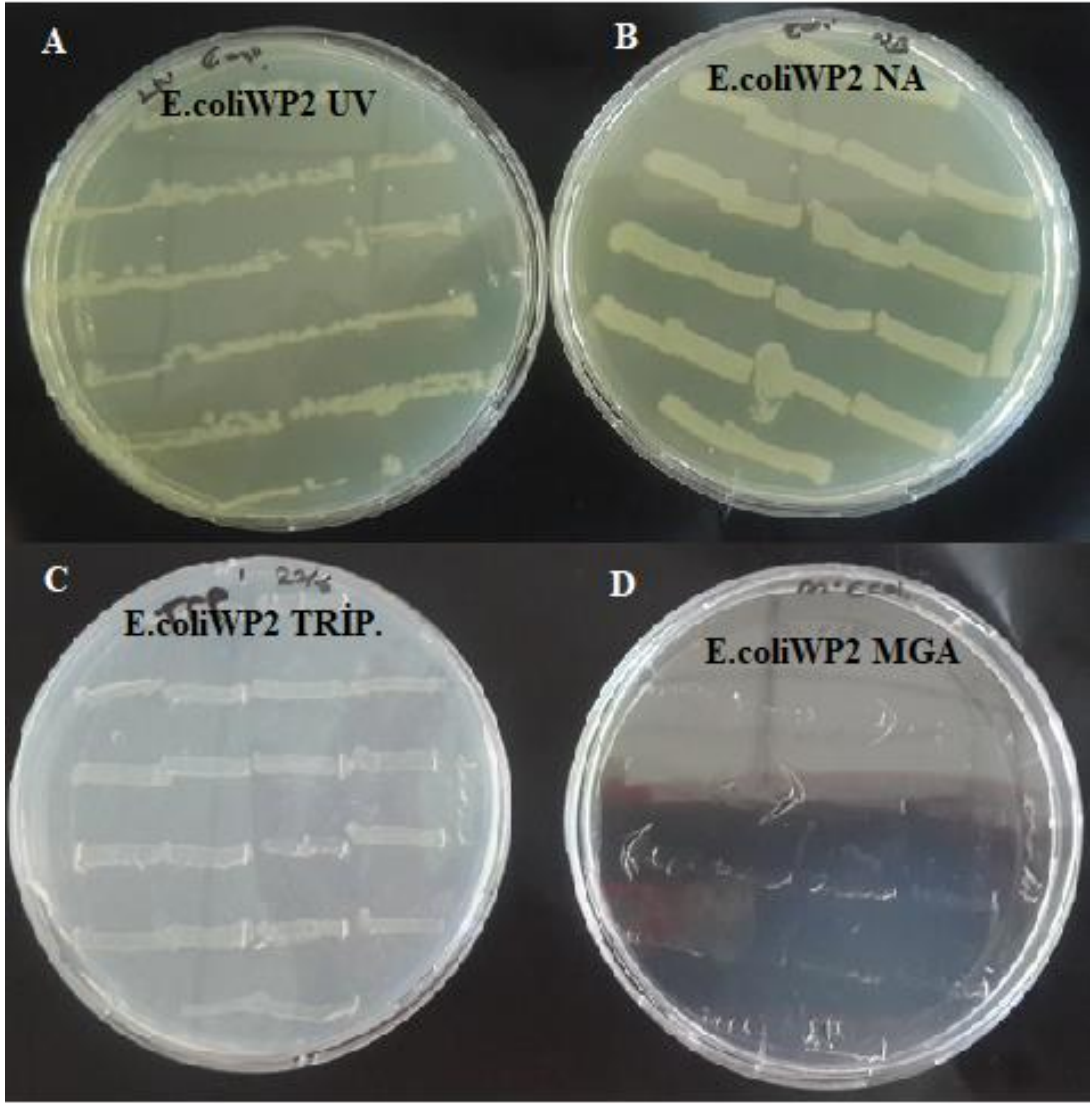
Bu aşamada *S. typhimurium* test suşlarında ampisilin direnç faktörü taşıyan plazmitin varlığı araştırılmıştır. R46 plazmitinden *iv vivo* olarak manipüle edilerek insersiyon yöntemi ile oluşturulan plazmid oldukça kararsız yapıda olup bakteri kolaylıkla plazmidini kaybedebilmektedir. Bu amaçla histidin, biyotin ve ampisilin içeren MGA ortamlı plaklara test bakterileri çizgi ekim yapılarak aktarılmıştır. Plaklar 48 saat 37 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüm plaklarda üreme belirlenmiştir. Bu durum bakterilerin plazmitini koruduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Sadece TA 102 suşunda bulunan plazmid, tetrasiklin direnç markerı taşımaktadır. *HisG428 ochre* mutasyonun çoklu kopyasını üzerinde bulunduran plazmid bu şekilde bakteriye hedef bölge sayısını arttırma avantajını sağlamaktadır. Plazmidin varlığını test etmek amacıyla histidin- biyotin- ampisilin tetrasiklin ile desteklenmiş MGA'lı ortamlara ekimi yapılarak 48 saat 37 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda üremenin gözlenmesi, kolonilerin plazmidi taşıdıklarını doğrulamaktadır.



Şekil 2. 9. *S. typhimurium* TA98 suşunun genetik işaretlerinin kontrolü

(A:Minimal glukoz agar (MGA),B:Histidin eklenmiş MGA; C:Biyotin eklenmiş MGA, D:Histidin+Biyotin eklenmiş MGA , E: Histidin+Biyotin+Ampisilin eklenmiş MGA, F: 8 saniye UV'ye maruz bırakılan NA, G: Kristal viyole ile muamele edilen NA ,H: Nutrient agar plağındaki üreme durumu)



Şekil 2. 10. *S. typhimurium* TA98 suşunun genetik işaretlerinin kontrolü

(A: 8 saniye UV'ye maruz bırakılan NA'lı plak, B: Nutrient agar (NA), C: Triptofan eklenmiş MGA, D: Minimal glukoz agar (MGA) plağındaki üreme durumları)

3.7.7.Kendiliğinden Geri Dönen Koloni Sayısının Kontrolü

Tüm test suşlarının geçirdikleri mutasyonlar sonucu histidinsiz/triptofansız ortamda üreyebilmelerini mümkün kılan kendiliğinden geri dönüş frekansına sahip olduğu bilinmektedir. Geri dönüş frekansları plak başına *S. typhimurium* TA98 için 30-50, *S. typhimurium* TA100 için 120-200, *S. typhimurium* TA102 için 240-320 ve *E. coli* WP2 *uvrA* için 15-50 arasındadır [17].

Araştırmada *S. typhimurium* TA 98 suşu için pozitif mutajen olarak 6 µg/plak danomisin, *S. typhimurium* TA100 suşu için 1,5 µg/plak sodyum azid, *S. typhimurium* TA 102 suşu için mitomisin-C (MMC) ve *E.coli* WP2 *uvrA* suşu için 1-Metil-3-nitro-1-nitrozoguanidin (MNNG) kullanılmıştır.

Kendiliğinden geri dönüş frekanslarının belirlenmesinde MGA ortamlı plaklar kullanılmıştır. % 0,6 Oxoid bacto agar, % 0.5 NaCl içeren 100 ml' lik üst agar üzerine histidin-bitotin/triptofan çözeltisinden 10 ml eklenmiş ve steril tüplere herbirinde 2,5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra üzerlerine gecelik bakteri kültüründen 0.1 ml eklenerek iyice vortekslendikten sonra MGA'lı plaklara dökülüp homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Etüvde 37°C'de 48 saat süreyle inkübasyondan sonra, geriye dönen koloni sayımı yapılmıştır. Her antimutajenite uygulamalarında bu aşama rutin olarak tekrar edilmiştir [17].

3.8.Ames Test Sistemi

Ames test sistemi kullanılarak olası antimutajenik aktiviteleri belirlenecek bitki ekstraktlarının öncelikle sitotoksik konsantrasyonları belirlenmiştir, sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda antimutajenik özellikleri test edilmiştir.

3.8.1. Sitotoksite Testi

Çalışmada sitotoksik olmayan konsantrasyonların belirlenebilmesi amacıyla, üst agar her bir steril tüpe 2,5 ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra, uygun konsantrasyonda seyreltilmiş gecelik bakteri kültürden 0,1 ml ve test edilecek kimyasalın belirlenen konsantrasyonlarından 0,1 ml eklenilmiştir. Karışım nutrient agarlı plaklar üzerine yayıldıktan sonra 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kontrol plağı ile test bileşikleri eklenen plaklardaki koloni sayıları karşılaştırılarak bileşiklerin sitotoksik konsantrasyonları belirlenmiştir [17].

3.8.2. Antimutajenite Testi

Test edilecek beş farklı *Plantago* bitki ekstrenin potansiyel antimutajenik aktiviteleri, plak inkorporasyon metoduna dayalı Ames test sistemi uygulanarak yapılmıştır. Antimutajenite çalışması bitki ekstraktlarının sitotoksik olmayan konsantrasyonları kullanılarak *S.typhimurium* TA98, TA100, TA102 ve *E.coli* WP2 *uvrA* suşları ile araştırma gerçekleştirilmiştir.

Araştırma sırasında histidin-biyotin/ triptofan eklenmiş 2,5 ml üst agar steril tüplere eşit miktarda konulduktan sonra 0,1 ml logaritmik fazdaki bakteri kültürlerinden eklenmiştir. Ekstrelerin sitotoksik olmayan 4 farklı konsantrasyonu ve pozitif mutajen bileşikleri de test tüpüne eklendikten sonra MGA ortamlı plaklara homojen bir şekilde yayılmıştır. Plaklar 37°C’de 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonrasında her bir örnek için geriye dönen koloni sayıları (*his*⁺/*trp*⁺) belirlenmiştir. Ekstrelerin pozitif mutajenlerin etkisini inhibe etme değeri % 0 ile % 100 arasında değerlendirilmiştir. Her deneyde her bir değişken için üçer plak kullanılmış olup her deney 2 kez tekrar edilmiştir.

$$\text{Antimutajenite oranı: } [(A-B)/(A-C)] \times 100$$

formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu formülde:

A= Bakteri+mutajen plağındaki geri dönen koloni sayısı;

B= Bakteri+mutajen+test bileşiği plağındaki koloni sayısı;

C= Kendiliğinden geri dönen koloni sayısını ifade etmektedir.

Buradan elde edilen sonuçlara göre:

% 0-25 aralığındaki inhibisyon zayıf derecede antimutajenik veya antimutajenik aktivite olmaması şeklinde;

% 26-40 aralığındaki inhibisyonun orta dereceli antimutajenik etkiye sahip olduğu;

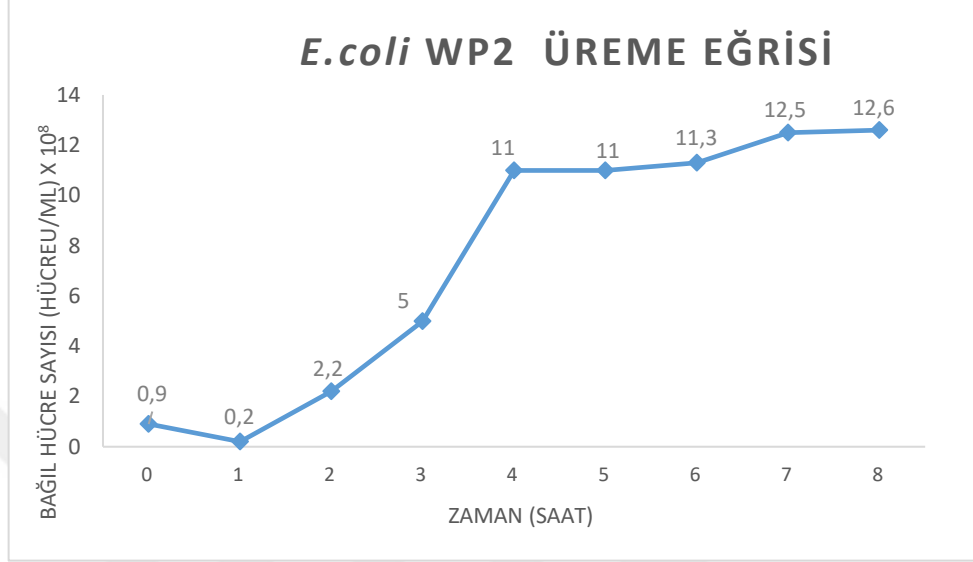
% 41 ve üzeri inhibisyonun ise güçlü derecede antimutajenik etkiye sahip olduğu şeklinde değerlendirilmiştir [103].

3.9. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Verilerin istatistiksel olarak analizi SPSS 20. 0 programı kullanılarak yapılmıştır. Uygulamalarda kullanılan belirlen konsantrasyonlar arası farklılığın değerlendirilmesi non-parametrik friedman testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Friedman testi sonucunda elde edilen p değerinin anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya ek olarak çalışmada kullanılan *E. coli* WP2 *uvrA* test suşunun üreme eğrisi çıkarılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4. 1. *E. coli* WP2 test suşunun üreme eğrisi

Yürütülen çalışma kapsamında *S. typhimurium* suşları (TA 98, TA 100, TA 102) ve *E.coli* WP2 *uvrA* suşu üzerinde *Plantago* cinsine ait 5 türün (*P. scabra*, *P. holosteam*, *P. lagopus*, *P. major* subsp. *intermedia*, *P. major* subsp. *major*) olası antimutajenik özelliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular çizelge [Çizelge 4.(1-5)] ve sütun grafiği [Şekil 4.(1-5)] olarak verilmiştir

Çizelge 4. 1. *P. major subsp. major* bitkisine ait ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları ve *E.coli* WP2 *uvrA* suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

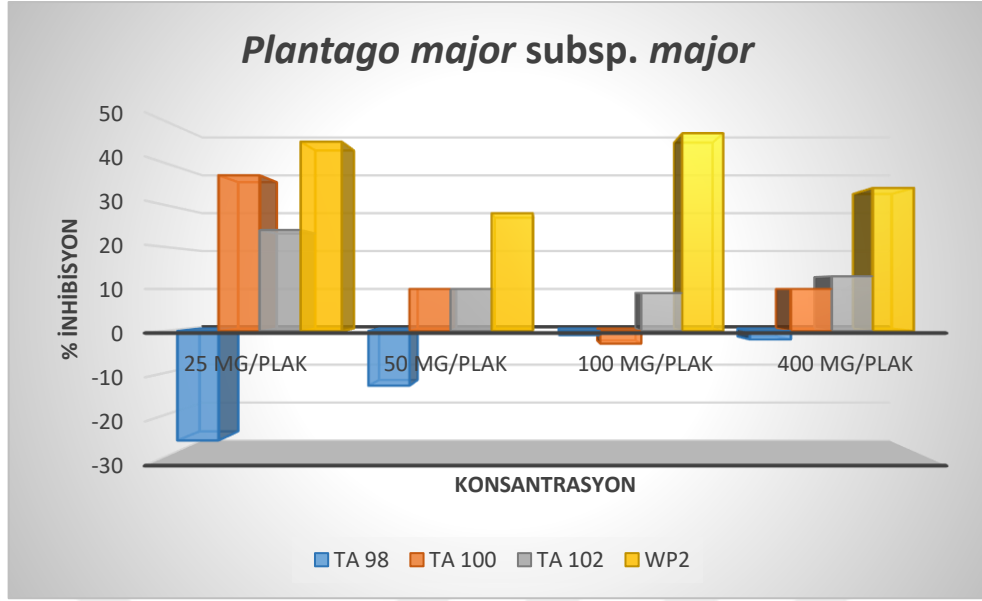
Çalışma bakterisi	Bitki ekstresi (µg/plak)	Pozitif mutajen ^c	G.D.K.S.±S.S. ^b	% İnhibisyon	p değeri
<i>S.typhimurium</i> TA98	0 ^a	-	27,00±4,66		0,90
	25	+	185,25±14,22	-26	
	50	+	178,50±32,65	-13	
	100	+	181,25±10,90	-1	
	200	+	166,33±73,25	-2	
	-	+	181,21±32,26		
<i>S.typhimurium</i> TA100	0 ^a	-	127,80±9,27		0,05
	25	+	713,25±95,81	37	
	50	+	981,50±70,00	10	
	100	+	1110,00±68,94	-3	
	200	+	971,75±101,47	10	
	-	+	1075,50±121,59		
<i>S.typhimurium</i> TA102	0 ^a	-	313,75±31,45		0,51
	25	+	1056,83±205,89	24	
	50	+	1186,33±90,75	10	
	100	+	1215,15±91,49	9	
	200	+	1165,66±63,03	13	
	0,5	+	1281,08±138,72		
<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0 ^a	-	23,64±4,91		0,45
	25	+	46,33±6,34	45	
	50	+	54,22±3,82	28	
	100	+	44,4±3,01	47	
	200	+	52,77±7,83	34	
	-	+	61,55±8,20		

* p<0.05

a:Kendiliğinden geri dönen koloni sayısı

b:G.D.K.S.+ S.S. : Geri Döner Koloni Sayısı±Standart Sapma

c: Suşa özgü pozitif mutajenler: *S. typhimurium* TA 98 için Danomisin (6 µg/plak) , *S. typhimurium* TA 100 için Sodyum azid (1,5µg/plak) ; *S. typhimurium* TA 102 için Mitomisin C (0,5 µg/plak) ^c, *E.coli* WP2 için *uvrA* için 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidin (1 µg/plak)



Şekil 4. 2. *Plantago major subsp. major* bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları ve *E. coli* WP2 *uvrA* suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

P. major subsp. major ekstraktına ait uygulamalar sonucunda, en yüksek etkinin *E. coli* WP2 *uvrA* suşu üzerinde olduğu belirlenmiştir. Ekstrenin 100 ve 25 µg/plak konsantrasyonlarında sırayla % 47 ve % 45 inhibisyon değerleri ile yüksek antimutajenik özellik taşıdığı; 200 µg/plak ve 50 µg/plak konsantrasyonlarda ise % 34 ve % 28’lik inhibisyon değerleri ile orta derece antimutajenik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Yine *S. typhimurium* TA 100 suşunda 25 µg/plak uygulama konsantrasyonunda % 37 inhibisyon değeri elde edilirken 50 µg/plak ve 200 µg/plak konsantrasyonların her ikisinde % 10’luk inhibisyon belirlenmiştir. Ekstrenin *S. typhimurium* TA 100 suşunun pozitif mutajeni üzerinde tüm konsantrasyonlarda düşük antimutajenik etki belirlenmiştir [103] (Çizelge 3). Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde konsantrasyonlar arasında anlamlı farklılığın bulunmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4. 2. *P. major subsp. intermedia* bitkisine ait ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları ve *E.coli* WP2 *uvrA* suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

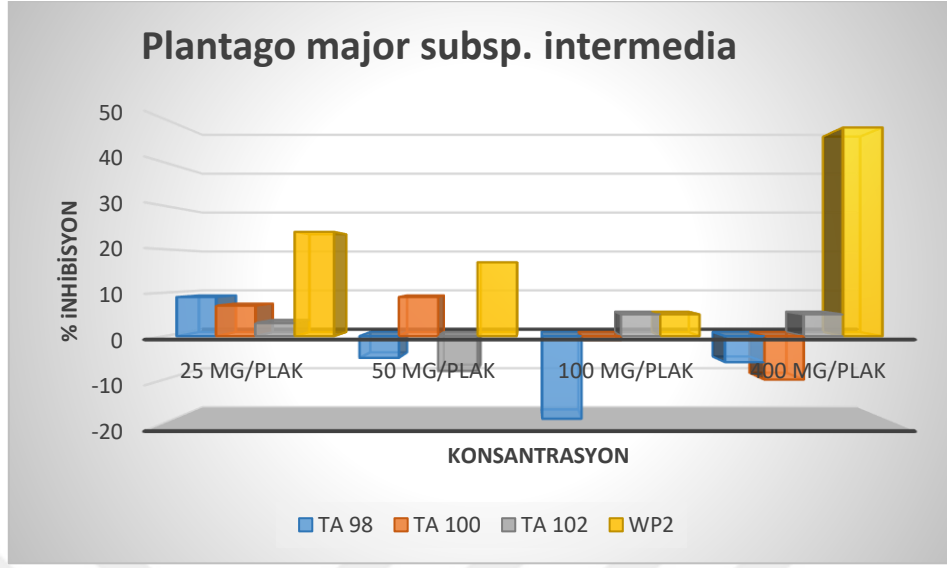
Çalışma bakterisi	Bitki ekstresi (µg/plak)	Pozitif mutajen ^c	G.D.K.S.±S.S. ^b	%İnhibisyon	P değeri
<i>S.typhimurium</i> TA98	0 ^a	-	23,5±6,30		0,55
	25	+	52,33±7,52	9	
	50	+	69,83±14,45	-5	
	100	+	66,5±13,49	-19	
	200	+	75±8,16	-6	
	-	+	57,67±2,59		
<i>S.typhimurium</i> TA100	0 ^a	-	133,11±23,91		0,50
	25	+	734,11±39,17	7	
	50	+	704,44±91,98	9	
	100	+	793,44±67,25	-1	
	200	+	761,22±77,35	-10	
	-	+	782,97±74,21		
<i>S.typhimurium</i> TA102	0	-	439±41,04		0,06
	25	+	1266,5±99,27	3	
	50	+	1370,5±82,52	-8	
	100	+	1272,83±113,44	5	
	200	+	1272,83±145,05	5	
	-	+	1338,75±145,35		
<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0 ^a	-	35,33±6,88		0,03*
	25	+	107,67±30,28	24	
	50	+	110,44±29,43	17	
	100	+	122,22±25,56	5	
	200	+	76,00±3,78	48	
	-	+	125,17±8,26		

* p<0.05

a:Kendiliğinden geri dönen koloni sayısı

b:G.D.K.S.+ S.S. : Geri Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma

c: Suşa özgü pozitif mutajenler: *S. typhimurium* TA 98 için Danomisin (6 µg/plak), *S. typhimurium* TA 100 için Sodyum azid (1,5µg/plak); *S. typhimurium* TA 102 için Mitomisin C (0,5 µg/plak) ^c, *E.coli* WP2 için *uvrA* için 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidin (1 µg/plak)



Şekil 4. 3. *Plantago major subsp. intermedia* bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları ve *E. Coli* WP2 *uvrA* suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

E.coli WP2 *uvrA* suşunda MNNG pozitif mutajenine karşı ekstrenin 200 µg/plak konsantrasyonunda % 48 inhibisyon elde edilmiştir. Aynı suşun 25 µg/plak uygulama konsantrasyonunun zayıf derecede antimutajenik (% 24 inhibisyon) olduğu görülürken, diğer konsantrasyonlarda düşük inhibisyon değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde konsantrasyonlar arasında anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir ($p=0.03$).

Çizelge 4. 3. *P. scabra* bitkisine ait ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları ve *E.coli* WP2 *uvrA* suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

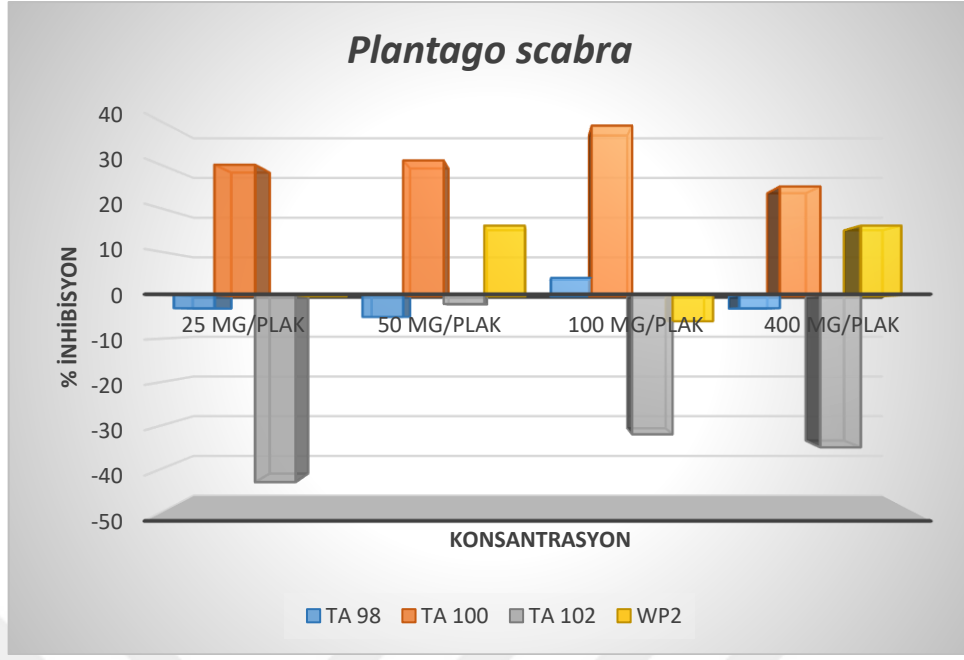
Çalışma bakterisi	Bitki ekstresi (µg/plak)	Pozitif mutajen ^c	G.D.K.S.±S.S. ^b	%İnhibisyon	P değeri
<i>S.typhimurium</i> TA98	0 ^a	-	20,17±2,84		0,61
	25	+	104,25±13,29	-3	
	50	+	106,17±21,73	-5	
	100	+	78,25±89,33	4	
	200	+	89,33±40,61	-3	
	-	+	78,00±15,30	-3	
<i>S.typhimurium</i> TA100	0 ^a	-	110,17±15,33		0,02*
	25	+	446,75±76,95	30	
	50	+	475±55,15	31	
	100	+	436,67±57,02	39	
	200	+	507±52,64	25	
	-	+	673,67±24,48		
<i>S.typhimurium</i> TA102	0	-	350±20,91		0,03*
	25	+	1180±75,53	-43	
	50	+	1000,16±143,00	-2	
	100	+	1110,33±128,24	-32	
	200	+	1178±136,10	-35	
	-	+	981,33±120,03		
<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0 ^a	-	27,63±7,26		0,73
	25	+	128±17,41	0	
	50	+	116,11±17,63	16	
	100	+	133,89±14,46	-6	
	200	+	114,33±15,94	16	
	-	+	79,83±8,17		

* p<0.05

a:Kendiliğinden geri dönen koloni sayısı

b:G.D.K.S.+ S.S.: Geri Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma

c: Suşa özgü pozitif mutajenler: *S. typhimurium* TA 98 için Danomisin (6 µg/plak) , *S. typhimurium* TA 100 için Sodyum azid (1,5µg/plak) ; *S. typhimurium* TA 102 için Mitomisin C (0,5 µg/plak) ^c, *E.coli* WP2 için *uvrA* için 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidin (1 µg/plak)



Şekil 4. 4. *Plantago scabra* bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları ve *E. coli* WP2 uvrA suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

S. typhimurium TA 100 suşunda uygulanan tüm konsantrasyonlarında antimutajenik etki belirlenmiştir. Ekstrenin 400, 100, 50, 25 µg/plak olan uygulama konsantrasyonlarında pozitif mutajen olan sodyum azidin etkisini sırasıyla % 30, % 31, % 39 ve % 25 oranlarında inhibe ettiği belirlenmiş olup bu durum *P. scabra* türü orta derecede antimutajenik etkili olduğu şeklinde değerlendirilmiştir [103]. Uygulama konsantrasyonları arasındaki farklılık istatistiksel olarak da önemlidir ($p=0.02$). Çalışılan diğer *Salmonella* suşları olan TA 102 ve TA 98 üzerinde herhangi bir antimutajenik etki belirlenmezken *E.coli* WP2 uvrA suşunun 100 µg/plak ve 50 µg/plak uygulama konsantrasyonlarında sırayla % 16 ve % 6 oranların inhibisyon değeri elde edilerek zayıf derecede antimutajenik etki belirlenmiştir. *P.scabra* bitkisinin antimutajenite sonuçları Çizelge 4.3’de detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 4. 4 . *P. lagopus* bitkisine ait ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları ve suşları ve *E.coli* WP2 *uvrA* suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

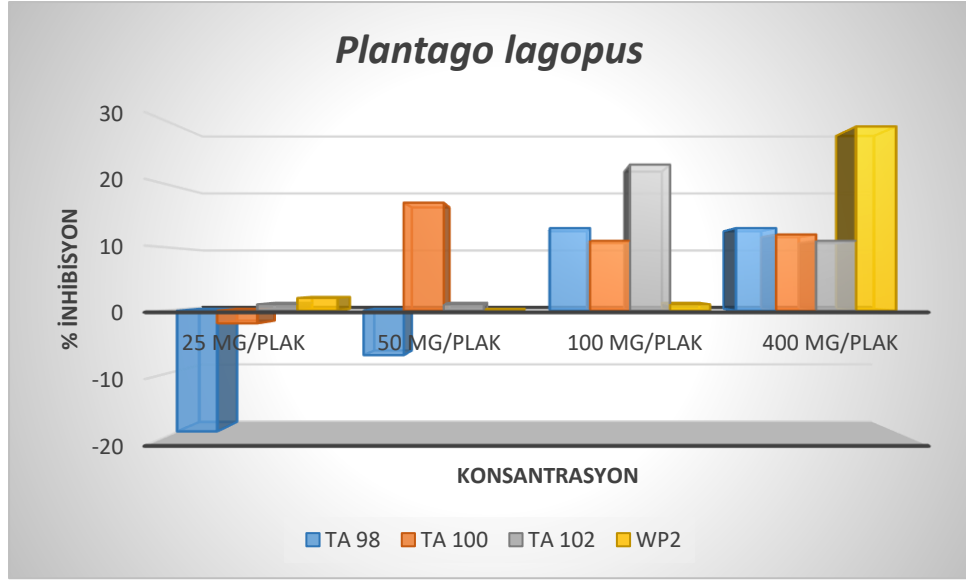
Çalışma bakterisi	Bitki ekstresi (µg/plak)	Pozitif mutajen ^c	G.D.K.S.±S.S. ^b	%İnhibisyon	P değeri
<i>S.typhimurium</i> TA98	0 ^a	-	21,42 ± 0,71		0,28
	25	+	60,67 ± 7,23	-19	
	50	+	62,00 ± 12,22	-7	
	100	+	52,5 ± 2,31	13	
	200	+	51,00 ± 3,06	13	
	-	+	57,96 ± 2,83		
<i>S.typhimurium</i> TA100	0 ^a	-	101,5 ± 15,93		0,65
	25	+	578,33 ± 55,98	-2	
	50	+	491,33 ± 54,12	17	
	100	+	516,16 ± 100,72	11	
	200	+	512,33 ± 32,89	12	
	-	+	568,33 ± 24,48		
<i>S.typhimurium</i> TA102	0	-	355,00 ± 28,46		0,05
	25	+	1312,67 ± 116,97	1	
	50	+	1307,33 ± 156,77	1	
	100	+	1100,67 ± 70,96	23	
	200	+	1284,67 ± 201,24	11	
	-	+	1327,67 ± 143,32		
<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0 ^a	-	35,33 ± 7,79		0,16
	25	+	124,66 ± 20,76	2	
	50	+	133,56 ± 18,97	0	
	100	+	122,56 ± 14,12	1	
	200	+	102,11 ± 17,04	29	
	-	+	125,17 ± 8,74		

* p<0.05

a:Kendiliğinden geri dönen koloni sayısı

b:G.D.K.S.+ S.S.: Geri Döner Koloni Sayısı±Standart Sapma

c: Suşa özgü pozitif mutajenler: *S. typhimurium* TA 98 için Danomisin (6 µg/plak) , *S. typhimurium* TA 100 için Sodyum azid (1,5µg/plak) ; *S. typhimurium* TA 102 için Mitomisin C (0,5 µg/plak) ^c, *E.coli* WP2 için *uvrA* için 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidin (1 µg/plak)



Şekil 4. 5. *Plantago lagopus* bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları ve *E. coli* WP2 uvrA suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

P. lagopus'un potansiyel antimutajenik özelliği çalışma kapsamında araştırılmış, ekstrenin *E.coli* WP2 uvrA suşunun pozitif mutajeni üzerinde 400 µg/plak'ta % 29 oranında inhibisyon değeri belirlenmiştir. Ekstrenin *S. typhimurium* TA 98 suşunun pozitif mutajeni olan danomisin üzerinde 100 ve 400 µg/plak uygulama konsantrasyonlarının her ikisinde de % 13'lük bir inhibisyon değeri elde edilmiştir. *S. typhimurium* TA 100 suşunun pozitif mutajeni olan sodyum azid üzerinde ise ekstresinin 50,100 ve 400 µg/plak uygulama konsantrasyonlarında sırayla % 17, % 11 ve % 12'lik inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Bu değerler belirlenen konsantrasyonlarda ekstrenin zayıf antimutajenik etkiye sahip olduğu şeklinde değerlendirilmiştir [103]. *S. typhimurium* TA 102 suşunun pozitif mutajeni olan MMC üzerinde 100 µg/plak hariç (% 23 inhibisyon) tüm konsantrasyonlarda zayıf antimutajenik etki elde edilmiştir (Çizelge 4.5)

Çizelge 4. 5. *P. holosteam* bitkisine ait ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları ve *E.coli* WP2 *uvrA* suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

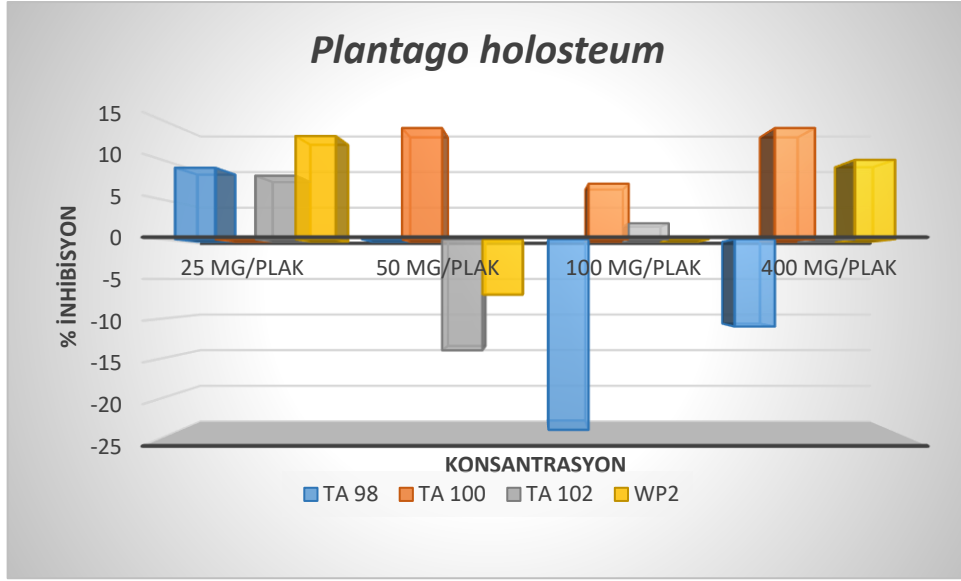
Çalışma bakterisi	Bitki ekstresi (µg/plak)	Pozitif mutajen ^c	G.D.K.S.±S.S. ^b	%İnhibisyon	P değeri
<i>S.typhimurium</i> TA98	0 ^a	-	23,5±6,30		0,72
	25	+	53,17±7,82	9	
	50	+	57,67±14,87	0	
	100	+	65,50±14,87	-24	
	200	+	57,50±12,48	-11	
	-	+	57,5±2,39		
<i>S.typhimurium</i> TA100	0 ^a	-	108,5±7,52		0,49
	25	+	602,67±37,58	0	
	50	+	518,17±59,75	14	
	100	+	552,83±69,27	7	
	200	+	521,17±36,43	14	
	-	+	587,33±68,90		
<i>S.typhimurium</i> TA102	0	-	439±41,04		0,80
	25	+	1252±154,50	8	
	50	+	1511,67±110,29	-14	
	100	+	1276,5±44,27	2	
	200	+	1349±157,43	0	
	-	+	1338,75±145,35		
<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0 ^a	-	35,33±7,70		0,38
	25	+	111,33±16,12	13	
	50	+	134,78±12,13	-7	
	100	+	123,78±22,51	0	
	200	+	117,86±24,98	10	
	-	+	125,17±11,96		

* p<0.05

a:Kendiliğinden geri dönen koloni sayısı

b:G.D.K.S.+ S.S.: Geri Döner Koloni Sayısı±Standart Sapma

c: Suşa özgü pozitif mutajenler: *S. typhimurium* TA 98 için Danomisin (6 µg/plak) , *S. typhimurium* TA 100 için Sodyum azid (1,5µg/plak) ; *S. typhimurium* TA 102 için Mitomisin C (0,5 µg/plak) ^c, *E.coli* WP2 için *uvrA* için 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidin (1 µg/plak)



Şekil 4. 6. *Plantago holosteum* bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* suşları *E. coli* WP2 *uvrA* suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

P.holosteum'un metanol ekstresinin suşların pozitif mutajenlerine karşı ortalama % 8 - % 14 oranında inhibisyonla gösterdiği belirlenmiştir. *S. typhimurium* TA 98 suşunun pozitif mutajeni olan danomisin varlığında 25 µg/plakda % 9'lük bir inhibisyon değeri elde edilmiştir. *S. typhimurium* TA 100 suşunun pozitif mutajeni olan sodyum azid üzerinde 50,100 ve 400 µg/plak uygulama konsantrasyonlarında sırasıyla 14,7 ve 14 'lük yüzde inhibisyon değerleri elde edilmiştir. *S. typhimurium* TA 102 suşunun pozitif mutajen olan MMC üzerinde 25 ve 100 µg/plak uygulama konsantrasyonlarında sırayla % 8 ve % 2'lik zayıf inhibisyon değerleri elde edilmiştir. *E. coli* WP2 *uvrA* suşunun MNNG pozitif mutajeni üzerinde ise 25 ve 400 µg/plakdaki uygulama konsantrasyonlarında % 13 ve % 10'luk inhibisyon değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Elde edilen sonuçlar *P. holosteum* 'un zayıf derecede antimutajenik etkiye sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır [103].

5. TARTIŞMA

Günümüzde teknolojik gelişmelerle birlikte gelişen yaşam, insanlar için pek çok avantaj sağlasa da yanlış beslenme ve çevresel kimyasallara maruz kalınması gibi olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir. Bu olumsuz durumun farkında olan bilim insanları söz konusu kimyasalların zararlı etkilerine karşı koruma sağlayabilecek ya da bu zararlı etkileri en az seviyeye indirebilecek yollar arayışı içine girmişlerdir. Bitkiler bu amaca yönelik olarak insan sağlığı için kullanılabilen en önemli bileşenler olarak öne çıkmaktadır [92].

Uygarlığın başlangıcından bu yana şifalı bitkilerin insanlar tarafından tedavi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Mısırlılara ait arkeolojik kalıntılar bu durumu kanıtlar niteliktedir. Günümüzde tıbbın ve eczacılığın geçmişini oluşturan bilgiler, bitkilerin şifalı dünyasından yararlanılarak oluşturulan Hipokrat'ın kaynaklarıyla başlamaktadır. Çağımızda tıbbi kaynak olarak kullanılan yaklaşık 400 bitki o tarihlerden beri kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan tüm farmasötik ilaçların halen üçte biri de bitki kökenlidir. Tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin analizi, günümüzde kullanılan birçok modern ilacın geliştirilebilmesinin önünü açmıştır. Tıbbi bitkilerin bileşenleri bugün AIDS, sıtma ve tüberküloz gibi pek çok önemli hastalığın tedavisi için umut ışığı olmuştur [93].

Yaşamın temeli olan genetik kodun hatasız ve düzgün işleyip gelecek nesillere aktarılması oldukça önemlidir. Bu nedenle, DNA diziliminde kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanan mutasyonlara neden olan olayların, organizmanın sağlıklı olarak yaşamını sürdürebilmesi adına önlenmesi gerekmektedir. Antimutajenik ajanlar, mutajenlerin sebep olduğu mutasyonların etkilerini yok eden veya azaltan bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Antimutajenlerin etkilediği sayısız hedef vardır. Bunlar arasında DNA onarımı, detoksifikasyon, serbest radikallerin yok edilmesi (antioksidan etki) gibi mutasyonların başlangıç aşamasında etkili olan hedefler ve proliferasyonun baskılanması, immün sistemin güçlenmesi, inflamasyonun azalması, apoptozisin artması, gen ifadesinin değiştirilmesi, angiogenezisin azaltılması gibi gelişme aşamasında etkili olan hedefler sayılabilir. Bu bağlamda, antioksidan ve antimutajenik özellikleri kanıtlanmış bitkiler ile terapötik etkili yeni bitki türleri ve bunların içerdiği bileşikler ile ilgili çalışmalar önem kazanmaktadır [16,35].

Dünyada ortalama 1 milyon bitki türü olduğu tahmin edilmekte olup bunların sadece yarısının taksonomisi belirlenebilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre taksonomisi bilinen ve antimikrobiyal, antioksidan, antiüretik, antimitojenik gibi birçok etkisi kanıtlanmış bugün için bilinen 70.000 bitki türü tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Kalan türlerden tıbbi etkisi belirlenmemiş bitki türlerinin incelenmesi ve bunların terapötik özelliklerinin belirlenerek hastalıkların tedavilerinde yeni kaynak olabileme imkanlarının araştırılması gerekmektedir [16].

Türkiye bulunduğu coğrafi konum itibarıyla birçok endemik türü de içine alan zengin bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Türkiye'de 174 aileye ait 1251 cinsin yaklaşık 12 000 tür ve alt türü yetişmekte olup bunlardan günümüzde 500 kadarının tıbbi amaçla kullanıldığı bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 70 000 tıbbi bitkiden sadece 20 bin tanesi ilaç ön maddesi eldesinde kullanılmaktadır. İlaç hammaddesi tedarik eden 110 ülkeden de Türkiye 18. sırada bulunmaktadır. Bu durum Türkiye'de büyük ve önemli potansiyele sahip biyoçeşitlilikten yeteri kadar yararlanılamadığını göstermektedir [71,94,95].

Bitkiler, büyüme ve gelişme için primer ve sekonder metabolit şeklinde organik bileşikler üretmektedirler. Bunlardan sekonder metabolitler, bitkiyi kuraklık ve UV ışınları gibi olumsuz çevre koşullarından ve herbivorlardan korumayı sağlarken, tohum dağılımında da etkili olmaktadır. Bilim insanları bitkilerin kendilerini stres faktörlerinden korumada kullandıkları bu bileşiklerin evrensel kodun ortak olmasından yola çıkarak insanlarda da potansiyel terapötik etki oluşturacağını öngörmüşlerdir.

Geniş bir grup olan sekonder metabolitlerin en bilineni fenolik bileşikler ve bunların alt grubu olan flavonoidlerdir. Antibakteriyel, antioksidan, antimitojenik gibi özellikleri ispatlanmış bu bileşikler aktif olarak insan sağlığına yönelik terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Bitkiler, karsinogenezi inhibe etmede ve hücre mutasyonlarını onarmada belirgin bir rol oynadığı bilinen flavonoid türevi bileşiklerin kaynakları arasındadır.

Aerobik organizmaların normal metabolik süreçlerinin son ürünleri, ilaçlar, UV, radyasyon, iyonize radyasyon, çevresel kirlilik gibi stresler nedeniyle tetiklenen hidrojen peroksitler, süperoksit anyonlar ve peroksitler gibi serbest radikallerin yan etkileri olarak organizmada çeşitli mutasyonlar ortaya çıkmaktadır. Oksidatif DNA hasarı, ciddi kronik dejeneratif hastalıkların patogenezi üzerinde önemli rol oynamaktadır [96]. Hücre,

serbest radikalleri nötralize etmek için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon, glutatyon peroksidaz ve redüktaz gibi enzim sistemleri ve E vitamini (tokoferoller ve tokotriyoller), C vitamini gibi enzimatik olmayan antioksidan maddelerle olumsuz stres faktörlerine karşı hücreyi savunarak sağlıklı yapısını sürdürmeye çalışmaktadır. Dışardan alınan antioksidan bileşiklerin bu sağlıklı yapının korunmasında ciddi katkısı olduğu bilinmektedir. Antioksidan bileşiklerin mutasyonla ilişkili hastalıkları önleyebilme özelliği potansiyel antimutajenik etki olarak da değerlendirilmekte ve antioksidan aktivite ile antimutajenik aktivite arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Serbest radikallerin etkisini azaltan antioksidanların, besin veya geleneksel tedavilerle kullanımının antimutajenik ve antikarsinojenik etkiye sahip olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir [96-97].

Araştırmada kullanılan *Plantago* cinsi de sekonder metabolit açısından zengin olup, birçok türünde fenolik bileşiklerin varlığı rapor edilmiştir. *Plantago* cinsi Plantaginaceae'nin ailesinin bir alt üyesi olup Latince "*planta*", yani "ayağın tabanı" anlamına gelmektedir. Dünyada tropik ılıman bölgelerdeki otlaklık alanlarda geniş yayılım gösteren Plantaginaceae ailesinin 92 cinsine ait 2000 türü bulunduğu bilinmektedir [57]. *Plantago* geniş bir toprak asitliğine (pH 4.2-7.8) sahip çayırılık alanlar üzerinde doğal olarak yetişmesi nedeniyle biyolojik olarak tıbbi amaçlı kullanıma uygun aktif maddeler açısından zengindir [60].

Birçok çalışma, *Plantago* bitki ekstresi ve bileşenlerinin kronik kabızlık, ishal, böbrek, mesane ve hemoroid problemlerinin sağaltımında olumlu yönde katkı sağladığı farklı çalışmalarla bildirmiştir. Bitkinin türleri yöresel olmakla birlikte bitkisel çay, yeşil salata ve yemek olarak farklı şekillerde tüketilebilmektedir. Büyük yapraklı türleri yaraların ve enfeksiyonların tedavisinde; tohumları çeşitli gastrointestinal ve böbrek problemlerin çözümünde, kökleri ise ateş ve kabızlık tedavisinde kullanılabilir [4].

Yapılan çalışmalar sonucu çoğu türünde ispatlanmış antimikrobiyal, antioksidan özelliklere sahip olan ve ülkemizde de yetişen *Plantago* cinsine ait türler bu konuda tıbbi amaçlı aday bitkiler olup cinse ait türlerin kimyasal bileşik açısından değerli oldukları bilinmektedir.

Plantago cinsinin içerdiği biyoaktif bileşiklerin temel grubunu oluşturan flavonoidlerin yapılan birçok çalışmada kanser gelişimini önlediği veya inhibe ettiği belirlenmiştir. Antitümör etkiden sorumlu mekanizmada flavonoidlerin etkisi hala tam olarak

anlaşılamamakla birlikte glikolitik enzimlerin veya protein sentezinin aktivasyonu gibi çeşitli yolları etkilediği bilinmektedir. Bununla birlikte, sitotoksik etkileri hücresele seviyede tam olarak ortaya konulamamıştır. Yapılan çalışmalar, bazı flavonoidlerin neden olduğu sitotoksik etkinin, topoizomera I ve II inhibisyonu sonucu ortaya çıkan DNA hasarı olduğunu göstermektedir. Lopez ve ark. (2010) yaptığı bir çalışmada K562 insan lösemi hücreleri flavonoid türevi olan mirsetin, kersetin, apigenin ile muamele edilmiş ve bu türevlerin zehir etkili topoizomera inhibitörleri olarak etki ederek DNA hasarını indükledikleri rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda flavonoidlerin topoizomera hedefli ilaç ön maddesi olarak kullanılabileceği önerisinde bulunulmuştur [11].

Plantaginaceae familyası Türkiye'de 2'si endemik olmak üzere 26 tür içeren tek cins olan *Plantago* L. ile temsil edilmektedir. Türkiye'de bulunan *Plantago* türleri arasından 7 tanesinin korunması için çalışma yürütüldüğü bilinmektedir [98]. Yürütülen çalışma kapsamında *Plantago* cinsine ait *P. scabra*, *P. holosteum*, *P. lagopus* ve *P. major* türüne ait iki alt tür olan *P. major* subsp. *intermedia* ve *P. major* subsp. *major* türlerinin çok fazla çalışmaya rastlanmamış olan antimutajenik potansiyelleri değerlendirilmiştir.

Çalışmada antimutajenik etkinin değerlendirilmesi Ames testi ve analogu olan *E.coli* WP2 test sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir ekstrenin sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenen 4 konsantrasyonu (400,100,50,25 µg/plak) kullanılmıştır. Çalışma, *S. typhimurium* TA98, TA100, TA 102 suşları ve *E.coli* WP2 suşu kullanılarak yürütülmüştür. Araştırmada kullanılan suşların ortalama kendiliğinden geri dönme frekansları literatürle uyumlu olarak bulunmuştur. *S. typhimurium* TA 98 suşu için $24 \pm 5,17$; TA 100 suşu için $122,5 \pm 19,45$; TA 102 suşu için $364 \pm 87,78$ ve *E.coli* WP2 *uvr A* için $26,4 \pm 19,45$ olarak bulunmuştur. TA 98 suşu çerçeve kayması mutasyonunun bir göstergesi, 100 baz çifti değişim mutasyonun (GC) , TA 102 de transisyon / transversiyon (AT) mutasyonlarının belirteci olarak kullanılmakta iken *E.coli* WP2 ise yine baz çifti değişim mutasyonun (AT) belirteci olarak kullanılmıştır. Çalışma TA 98 için danomisin, TA 100 için sodyum azid, TA 102 için MMC ve *E.coli* WP2 *uvrA* için MNNG pozitif mutajenlerine karşı inhibisyon yüzdeleri hesaplanarak gerçekleştirilmiştir [17].

Deney sonuçları antimutajenite açısından birlikte değerlendirildiğinde sonuçlar aşağıdaki gibidir.

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre en yüksek antimutajenik etkiye *P. major* subsp. *intermedia* (% 48 inhibisyon, 400 µg/plak konsantrasyon) ve *P. major* subsp. *major* (% 47 inhibisyon, 100 µg/plak konsantrasyon; % 45 inhibisyon, 25 µg/plak konsantrasyon) ekstrelerinde *E.coli* WP2 *uvr A* suşu üzerinde rastlanmıştır. *Plantago scabra* türünden elde edilen ekstrenin ise TA 100 suşunda tüm konsantrasyonda orta derecede (% 39 inhibisyon, 100 µg/plak konsantrasyon) antimutajenik etki belirlenmiştir. *P. lagopus* ekstresi, 400 µg/plak konsantrasyonda *E.coli* WP2 *uvr A* suşunun % 29 inhibisyon'luk orta dereceli antimutajenik etki oluşurken tüm *S. typhimurium* suşlarında zayıf antimutajenik etki belirlenmiştir. *P. holosteum* ekstresinin ise tüm suşlar üzerinde zayıf antimutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda antimutajenik etkilerin çoğunlukla *E.coli* WP2 *uvrA* suşu üzerinde olduğu gözlenirken, *S. typhimurium* TA98 suşunda diğer suşlara nazaran daha düşük etki gösterdiği belirlenmiştir.

Yürütülen çalışma tür düzeyinde değerlendirildiğinde;

P. major'un iki alt türünün de *E.coli* WP2 *uvrA* suşunda kullanılan MNNG ajanının mutajenik aktivitesini yüksek oranda inhibe ettiği belirlenmiştir. *P. major* subsp. *major* ekstresinin uygulama sonuçlarına göre 100 ve 25 µg/plak konsantrasyonlarda sırayla % 47 ve % 45 oranlarında inhibisyon değeri belirlenmiştir. Bu durum *P. major* subsp. *major* bitkisinin bazı konsantrasyonlarda yüksek oranda antimutajenik özellik taşıdığını gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Ektraktın 200 µg/plak ve 50 µg/plak konsantrasyonlarında ortaya çıkan % 34 ve % 28'lik inhibisyon bitkinin orta derece antimutajenik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan değerlendirme sonucunda *Plantago* türlerinin içerdikleri biyoaktif bileşikler ve buna bağlı sahip oldukları antioksidan potansiyelinin varlığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. *P. major* ekstresinin antimutajenitesinin çalışıldığı bir tez çalışmasında ekstrenin *S.typhimurium* TA100 suşunda mutajenin aktivitesini bu tez çalışmasındaki sonuçları destekler biçimde orta dereceli (% 32 inhibisyon, 6250 µg/plak) olarak inhibe ettiği bildirilmiştir [99].

Bilinen en eski şifalı bitki türlerinden biri olan *P. major* zengin biyoaktif maddeler içermektedir [4]. *Plantago* türleri içinde *P. lanceolata* etkinliği kanıtlanmış ve tedavi amacıyla en çok kullanılan tür olup, ikinci sırayı *P. major* almaktadır. *P. major*'ün farklı

alt türlerinin antioksidan ve antimutajenik özelliğinin varlığı yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir. Tütün iridoid glikozidleri, terpen ve özellikle de yaprakların içeriğinde bulunan kafeik asit türevleri açısından zengin olduğu bilinmektedir. Kafeik asit şeker esterlerinin kanser tedavisinde etkili bir ajan olmasının yanı sıra antialerjik, antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenik, antibakteriyel, antifungal, antiviral aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca 5-lipoksijenazı (anafilaktik reaksiyonlarda bazı düz kasların yavaş ve uzun süreli kasılmasını sağlayan, histaminden sonra etkisini göstererek astımın oluşumunda önemli rol oynayan madde) inhibe ettiği bildirilmiştir. Birošová ve ark. (2005) tarafından yürütülen bir çalışmada 5NFAA'nın (3,5-nitro-2-furil akrilik asit) mutajenik etkisinin azaltılmasında antimutajenik özelliğe sahip ve *P. major* bitkisinde de bulunan gallik asit, ferulik asit, kafeik asit ve valinik asit gibi fenolik bileşik türevlerinin etkili olduğu bildirilmiştir [100].

P. major türü Türkiye'de ve dünyada sindirim, solunum, deri ve enfeksiyon hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavisinde aktif olarak kullanılmaktadır. Literatürde *P. major* türünün çeşitli alt türlerinin biyolojik aktivitesine dair çalışmalar bulunmasına karşın, *P. major* subsp. *major* ve *P. major* subsp. *intermedia* alt türlerinin antimutajenik özellikleri ile ilgili yeterli veri olmaması nedeniyle bu çalışma sonuçlarının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

P. major subsp. *intermedia* ekstresinin *E.coli* WP2 *uvrA* suşu üzerinde MNNG mutajenine karşı 400 µg/plak konsantrasyonunda tüm çalışmanın en yüksek inhibisyon değeri olan % 48'lik inhibisyon elde edilmiştir (p=0.03). Aynı suş için ekstrenin 25 µg/plak konsantrasyonunda % 24'lük inhibisyon değeri ile orta derecede antimutajenite gözlenirken diğer konsantrasyonlarda inhibisyon değerlerinin çok daha düşük olduğu görülmüştür. Kolak ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada *Plantago major* subsp. *intermedia* 'nın fitokimyasal özellikleri ve *in vitro* antioksidan ve antikolinesteraz (sinir iletiminde görevli asetilkolini hidroliz eden enzim inhibitörü) aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda metanol ekstresinde pirokateşol ve kersetin eşdeğeri içeriklerin bulunduğu bildirilmiştir [101]. Kersetin içeriği bilinen birçok bitki türü tıbbi bitki sınıfına girebilmektedir. Flavonoidlerdeki antioksidan etkinin önemli kısmı kersetinin antioksidan aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Tıbbi ve biyoaktif özellikler bakımından yeni yeni değerlendirilen bu türün antimutajenik açıdan da ele alınması farklı bir bakış açısı ortaya koymaktadır. Bu çalışma sonucunda, elde edilen

verilerin daha sonraki çalışmalarla desteklendikten sonra bitki içeriğindeki bileşiklerin tanımlanıp değişik parametreler açısından araştırılmasının gerekli olduğu bildirilmiştir.

Yürütülen çalışma ekstreleri arasındaki farklı inhibisyon değerlerinin belirlenmesi aynı cinse ait türlerin, hatta aynı türün alt gruplarının kimyasal içeriklerinin abiyotik (ışık, su, toprak minerali..) ve biyotik faktörler (kuş, böcek, diğer bitkiler..) etkisiyle farklılaşabilmesinden kaynaklanmaktadır.

Bitkisel içeriklerden biri olan konjuge linoleik asitler, obezite, kanser, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde faydalı etkilere özelliklere sahip bileşiklerdir. *Plantago* yaprakları % 56,19 kadar yüksek oranda linolenik asit içermektedir. *Plantago* alt türlerinden biri olan *P.major* tohumlarında bu oran % 25.41'dir. Ayrıca fenoller, flavonoidler ve tanen içeriği de yapraklarda yüksek oranda bulunmaktadır. Kobeasy ve ark. (2011) yaptığı bir çalışmada *P. major* yaprak ve tohumlarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tümör hücresi üzerinde yapraklarının etanol ekstresinin % 74, su ekstresinin ise % 54.6 'lük apoptotik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [59].

Çin'de geleneksel tıbbın bir parçası olarak *P. major* L., soğuk algınlığından viral hepatite kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır. Chiang ve ark. (2000) *P. major*'un saf bileşiklerinin ve sulu ekstrelerinin antiviral aktivitesini incelemişlerdir. Çalışmaları, herpes simplex virüs (HSV-1, HSV-2) ve adenovirüsler (ADV-3, ADV-8, ADV-11) olmak üzere bir dizi virüs üzerinden yürütülmüştür. Sonuç olarak *P. major*'un sulu ekstresinin anti-herpes virüs aktivitesine sahip olduğu buna karşın, bu bitkinin ekstrelerinde bulunan beş farklı kimyasal sınıfına ait belirli saf bileşikler güçlü antiviral aktivite sergilediği; kafeik asit'in orta klorojenik asitin ise en güçlü antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlemişlerdir. Çalışmada, antiviral aktivitelere sahip *P. major*'un saf bileşiklerinin fenolik bileşiklerden, özellikle de kafeik asitten türetildiği sonucuna varılmıştır [10].

Çalışma kapsamında kullanılan bitki ekstreleri türlerin sadece toprak üstü tüm kısımlarını içermektedir. Antimutajenite çalışmalarında bitkisel test materyalinin hangi kısmının kullanıldığının çalışma sonucunu etkilediği görülmektedir. Mehrabian ve ark. (2009) tarafından *P.major* bitkisinin vejetatif (yaprak, kök) ve generatif (çiçek salkımı) kısımlarının metanol ekstrelerinin antikarsinojenik ve antimutajenik etkisinin iki farklı coğrafi bölgeden toplanan örnekler üzerinden karşılaştırıldığı bir çalışma yürütülmüştür.

P. major' un yapraklarında % 40'dan fazla inhibisyon yüzdesi ile güçlü antimutajenik ve antikarsinojenik etkinlik belirlenirken, kök ekstrelerinde % 40'tan daha düşük yüzdeyle, antimutajenik ve antikarsinojenik etkinlik gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda *P. major* türünün antikarsinojenik ve antimutajenik özelliklere sahip değerli bir tıbbi bitki olduğu ve her iki coğrafi bölgedeki bitki ekstrelerinin karşılaştırılmasıyla bitkilerde antioksidan üretiminde çevresel koşulların etkisinin olabileceği de açıklanmıştır [102].

P. scabra bitkisinin antimutajenite sonuçları değerlendirildiğinde *S. typhimurium* TA 100 suşunda çalışılan tüm konsantrasyonlarında antimutajenik etki gözlenmiştir. Ekstrenin 400, 100, 50, 25 µg/plak konsantrasyonlarda pozitif mutajen olan sodyum azidin mutajenik etkisini sırasıyla % 30, % 31, % 39 ve % 25 oranlarında inhibe ettiği belirlenmiş olup bu durum *P. scabra* bitkisinin orta derecede antimutajenik etkili olduğunu göstermiştir ($p = 0.02$) [103]. Çalışılan diğer *Salmonella* suşları üzerinde herhangi bir antimutajenik etki belirlenmezken *E. coli* WP2 *uvrA* suşunun 100 µg/plak ve 50 µg/plak konsantrasyonlarında (% 16 ve % 6) zayıf derecede antimutajenik etki gözlemlenmiştir. Çalışmada *P. scabra* antimutajenik aktivite açısından genel sıralamada *P. major* subsp. *intermedia* ve *P. major* subsp. *major*'den sonra 3. sırada yer almıştır. Özcan ve ark. (2014) tarafından yürütülen bir çalışmada *P. scabra*'da % 13.3 oranında γ -linolenik asit, % 4.26 oranında da lipit ve yağ asidi içerdiği bildirilmiştir [104]. γ -linolenik asitin (GLA) besin takviyesi olarak kullanıldığında bazı hastalıkların tedavisinde olumlu yanıt oluşturduğuna dair gözlemler bulunmaktadır [105]. Bu durum *P. scabra* bitkisinin antimutajenik potansiyelinin, içeriğindeki belirgin orandaki GLA varlığı ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

P. lagopus ekstresinin *S. typhimurium* TA 98, TA 100 ve TA 102 suşlarında çalışılan en yüksek konsantrasyonda (400 µg/plak) zayıf antimutajenik etkili olduğu belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda ekstrenin *S. typhimurium* TA 98 suşunu pozitif mutajen olan danomisin üzerinde % 13, TA 100 suşu için kullanılan sodyum azidi % 12 ve TA 102 suşu için kullanılan MMC'nin mutajenik etkisini ise % 11 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. *P. lagopus*'a, sahip olduğu metabolitler bir takım özellikler kazandırmaktadır. *P. lagopus* diğer *Plantago* türlerinde bulunmayan luteolin-7-rutinozit ve 7-neohesperidozit ve luteolin-7-O-glukozit gibi luteolin diglikozidleri ile karakterizedir [106]. Literatürde luteolin-7-O-glukozitin kanser gelişimini önlediği veya inhibe ettiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Galvez ve ark.'nın (2003) tarafından yürütülen bir çalışmada *P. lagopus* 'tan izole edilen flavon luteolin-7-O-glukozitin *in vitro*

olarak topoizomeraz I-DNA kompleksi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bileşiğin güçlü bir DNA topoizomeraz zehri olarak hareket ettiği ve sitotoksik etkiden sorumlu olduğu belirlenmiş fakat mekanizmasının tamamen anlaşılamadığı bildirilmiştir. *P.lagopus* ‘un antikanser etkisinin yanında kimyasallar üzerindeki antimutajenik etkisinin de belirlenmesinin bitkinin tıbbi etkinliği açısından yeni bir bakış açısı sağlayabileceği bildirilmiştir [11].

P. holosteam’ un metanol ekstresinin bakterilere özgü kullanılan pozitif mutajenler üzerinde genellikle zayıf inhibisyon sağladığı belirlenmiştir. *S. typhimurium* TA 100 suşunda çalışılan 400, 100, 50 µg/plak konsantrasyonlarda pozitif mutajen olan sodyum azidin etkisini sırasıyla % 14, % 7 ve % 14 oranlarında engellediği; E.coli WP2suşunda pozitif mutajeni olan MNNG’nin etkisini 400 ve 25 µg/plak’ta sırasıyla % 10 ve % 13 oranlarında engellediği belirlenmiştir. *P. holosteam* türünün biyolojik olarak aktif fenolik ve flavonoid maddelerce zengin olduğu ve buna bağlı önemli derecede antioksidan aktivitesinin olduğu bildirilmiştir. *P. holosteam* türü üzerinde yürütülen çalışmalarda türde % 77 oranında bulunan okubin glikoziti yanısırası da iridoid açısından oldukça zengin olduğu bildirilmiştir. Bu bileşik oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoza karşı hücresel bileşenleri koruyucu özelliklere sahip olması nedeniyle osteoartrit tedavisinde de kullanılmaya aday madde olarak gösterilmiştir [107]. *P. holosteam* ile ilgili dikkat çekici çalışmalardan biri Genç ve ark.’nın (2017) *P.holosteam*’un çeşitli ekstrelerinin sitotoksik ve anti-inflamatuvar aktiviteleri üzerine yaptıkları çalışmadır. Yürütülen bu çalışmada *P.holosteam* ekstresinin Hep-2 kanser ve L929, RAW 264.7 kanser olmayan hücre hatları üzerindeki etkileri değerlendirilmiş olup su ekstresinin Hep-2 kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve anti-inflamatuvar aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bitkinin belirlenen antioksidan, antimutajenik ve antiinflamatuvar özelliklerinin, sahip olduğu biyolojik içeriklerle ilişkilendirildiği çalışma sonucunda terapötik açıdan ciddi potansiyel taşıdığı belirtilen *P. holosteam* önemli biyoaktif bileşenlere sahip araştırılmaya değer bir tür olarak bildirilmiştir [82].

Beare ve ark.’nın (2009) tarafından yürütülen bir çalışmada aralarında *P. holosteam* ve *P. major* ‘un olduğu bazı *Plantago* türlerinin (*P. argentea*, *P. holosteam* , *P. major*, *P. maritima* ve *P. media*) metanol özütlerinin antioksidan özellikleri incelenmiştir. Birkaç testin (DDT, FRAP, Fe⁺²/ askorbat) birlikte uygulandığı çalışmada tüm ekstrelerin güçlü antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada *P. maritima*, *P. argentea* ve *P. holosteam*’un ilk kez antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiş olup ekstrelerinin

süperoksit anyon radikali üzerindeki temizleyici etkisinin bitkilere göre *P. major* > *P. maritima* > *P. argentea* > *P. medya* > *P. holosteam* sırasıyla arttığı rapor edilmiştir. Antioksidan özelliğe sahip bitkilerin antimutajenik özellik gösterme olasılıklarının yüksek olduğuna dair literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [35, 107]. Çalışma sonucunda antimutajenite sıralamasında *P. major* alt türlerinde antimutajenik etkinin *P. holosteam*'a oranla çok daha yüksek bulunması bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir.

Yapılan çalışma kullanılan mutant bakteriler kapsamında değerlendirildiğinde

E.coli WP2 *uvrA* suşunda test edilen tüm bitki ekstraktlarının neredeyse hepsinde antimutajenik etki gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan *E.coli* WP2*uvrA* ve *S. typhimurium* TA102 suşlarında, her ikisinin de aynı tip mutasyon taşımalarına rağmen benzer sonuçlar elde edilmemiş olup antimutajenik etki *E.coli* WP2 *uvrA* suşunda daha yüksek olarak bulunmuştur. Watanabe ve ark. (1998) tarafından yürütülen bir çalışmada 28 adet çapraz bağlanan ve oksidatif hasara sebep olan mutajen maddenin *S. typhimurium* TA102, *S. typhimurium* TA 2638, *E.coli* WP2 pKM101 ve *E. coli* WP2 *uvrA*/ pKM101 suşları üzerinde karşılaştırmalı olarak mutajenik etki değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda *S. typhimurium* TA102 suşu ve *E.coli* WP2*uvrA*/pKM101 arasında % 75-% 79 oranında aynı sonucu vermesine karşın *E. coli* WP2 *uvrA*/pKM101'nin kimyasallara karşı daha hassas suş olduğu, ayrıca *E. coli* WP2 *uvrA*/pKM101'nin kendiğinden geri dönen koloni insidansının *S. typhimurium* TA102'den çok daha düşük olması oksidatif veya çapraz bağlanan maddelere karşı cevabının daha hassas olmasında etkili olduğu bildirilmiştir [109].

Antimutajenite çalışmalarında literatürde kabul gören antimutajenik etki hesaplamaları % 0 ile 100 arasında sınıflandırmalara tabi tutularak belirlenmektedir. Tez kapsamında tüm *Plantago* ekstraktlarının *S typhimurium* TA98 suşunun pozitif mutajen olan danomisinin üzerindeki etkisinin antimutajenite hesaplamalarında neredeyse tüm konsantrasyonlarda pozitif değerler yerine negatif değerler elde edilmiştir. Belirlenen sonuçlarda negatif değerlerin *P. major* subsp. *major* ekstresindeki *S. typhimurium* TA98 suşunun tüm konsantrasyonlarında olduğu görülmüştür. Bu durum *S. typhimurium* TA98 suşunda bulunan çerçeve kayması mutasyonun diğer suşlarda gözlemlenen baz çifti değişim mutasyonlarına nazaran çok daha kararlı bir mutasyon tipi olması şeklinde yorumlanabilir. Aynı durum *S typhimurium* TA 102 'de *P. scabra* ekstresinin

antimutajenite testi sonuçlarında da görülmektedir. Bu durum ‘komutajenite’ olarak bilinmekte olup komutajenite, bir maddenin tek başına mutajen olmadığı halde bir mutajen varlığında mutajenik özellik kazanması durumu olarak ifade edilmektedir.

Komutajenik etki iki şekilde gerçekleşmektedir: Test edilen madde (1) mutajenik kimyasalın etkisini güçlendirebilmekte ya da (2) mutajen olmayan maddeyi mutajen hale dönüştürebilmektedir. Makhafole (2014) tarafından yürütülen çalışma kapsamında antioksidan aktiviteye sahip ve fenolik içeriği yüksek olan 31 bitki ekstresinin antimutajenite ve mutajenite açısından değerlendirilmiştir. Ekstreler Ames test sisteminde *S typhimurium* TA98 ve TA 100 suşları üzerinde uygulandığında bu tez çalışmasında olduğu gibi *S typhimurium* TA98 suşu üzerinde komutajenik etkiye rastlanmıştır [35]. Birošová ve ark.(2005) tarafından yürütülen bir çalışmada bitkisel bir fenolik bileşen olan klorojenik asidin, 3- (5-nitro-2-furil) akrilik asit (5NFAA)’in mutajenik etkisini artırdığı bildirilmiştir. Çalışma kapsamında *Plantago* türlerinde var olan bir bileşenin TA 98 suşunun pozitif mutajeni olan danomisin üzerinde benzer etkiye sebep olabileceği düşünülmüştür [100]. İleriye yönelik çalışmalarla *Plantago* türlerinin yapısında bulunan temel bileşenlerin analiz edilip antimutajenitede etkili bileşenin belirlenmesi önerilmektedir.

Bitki ekstrelerinin hazırlandığı çözücülerin, kullanılan konsantrasyonlar ve test sistemlerinin değişimi aynı bitki ile yapılan çalışmaların sonuçlarını değiştirebilmektedir. Çalışma kapsamında bitkilerin yalnızca metanol ekstresi kullanılmıştır. Bazı çalışmalar flavonoidlerin etil asetat ekstresinde çok daha iyi çözünüp bu şekilde yüksek antioksidan özelliğinin ortaya çıktığını vurgulamıştır. Çalışma sonuçları incelendiğinde konsantrasyon cevap arasında doğrusal bir ilişkinin olmadığı görülmektedir. Bu durum yapılan bir çalışmada bitki bileşenlerinin çözünürlükleri ve moleküler yapı farklılıklarından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca ekstre yüksek konsantrasyonlarda uygulansa da hücre membranından geçişinin engellenmiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır [108,110]. Uysal ve ark.’nın (2016) *Centaurea pterocaula* bitkisindeki etil asetat, metanol, su ekstresindeki çalışmalarında metanol ekstresinin 5 ve 1 g/plak gibi yüksek konsantrasyonlarda çalıştıktlarında konsantrasyonlarda % 49 ve % 44 inhibisyon ve etil asetat ekstresinde ise % 28 ve % 26 oranlarında inhibisyon değeri elde ettikleri bildirilmiştir [111]. Yine *P. albicans*, *P. asiatica* ve *P. lanceolata*’nın farklı çözücülerde (polisakarit ekstresi, etanol ekstresi, metanol ve su ekstresi) hazırlanan ekstrelerde antimutajenik etkilerinin Ames test sistemi, mikronükleus, kromozom

anomali testleri ile değerlendirildiğinde çözücünün önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir [67, 113,114]. Yüksek konsantrasyonlar ve farklı çözücüler antimutajenik etkiyi oluşturan sekonder metabolitlerin daha fonksiyonel çalışmasında etkilidir. Bu nedenle çalışmanın bitkilerin farklı çözücü ve konsantrasyonların kullanıldığı test sistemlerinde değerlendirilmesinin olumlu katkısı olacağı düşünülmektedir.

Plantago cinsinde de bulunan fenolik bileşiklerden klorojenik asitin potansiyel olarak insan mononükleer hücrelerinin proliferasyonunu ve interferon gamma üretimini artırdığı; ferulorik asidin influenza virüs enfeksiyonlarına karşı cevap olarak interlökin-8 veya interferon gama üretimini artırdığı; olenolik asit ve ursolik asidin farelerde hemopoitik sistemin aktivasyonunu artırdığı bildirilmiştir. Diğer bir bileşik olan baykalein ise endopeptidaz inhibitörü olup pankreatik kanser hücrelerinin apoptozisini sağladığı; flavonoid baikalın antijen kaynaklı inflamatuvar sitokinler ve kemokinleri inhibe ettiği raporlanmıştır. Chiang ve ark. (2003) tarafından yürütülen bir çalışmada *Plantago* cinsine ait bileşiklerin periferik kan mononükleer hücreleri üzerindeki immünomodülatör etkilerinin ELİSA ve BrdU immüno testleri kullanarak inceledikleri çalışmada suda çözünen aukubin, klorojenik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve vanilik asitin ELİSA testinde interferon-gama salınımını artırdığı, suda çözünmeyen luteolin ve baykalinin de bu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Tritenlenlerdeki olenolik asit ve ursolik asitin ise bu etkiye sahip olmadığı raporlanmıştır. Bu içerik sonuçlarından yararlanılarak *Plantago* cinsinden kanser ve enfeksiyon tedavi ajanları elde edilebileceği ileri sürülmüştür [10].

Literatürde *Plantago* cinsine ait bazı türlerde yeni biyoaktif moleküllerin tanımlanması ve bu türlerin farmakolojik açıdan umut verici birer kaynak olarak görülmelerini sağlamaktadır. Türlerin kapsamlı olarak araştırılması ile ilaç formülasyonlarına yeni moleküllerin kazandırılabilmesi düşünülmektedir [61]. Tez kapsamındaki *Plantago* cinsine ait bazı türler üzerindeki antimutajenite çalışma sonuçları ile bu konuda literatüre katkı sağlandığı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında *P. major* subsp. *intermedia*, *P. major* subsp. *major* ve *P. scabra* ait metanol ekstrelerinin orta ve yüksek derecede antimutajenik aktivite taşıdığı *P. holosteam* ve *P. lagopus* türlerinin ise zayıf antimutajenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuçların daha iyi yorumlanabilmesi için çalışmaların karaciğer özütü varlığında yapılması, başka test sistemleri ile antimutajenik potansiyellerinin araştırılması, antimutajenik etkiden sorumlu maddenin tanımlanması, farklı çözücü ve konsantrasyonlarda denenmesi önerilmektedir.

Türkiye’de *Plantago* cinsine ait bitkilerin biyolojik etkileriyle ilgili çalışmaların kısıtlı olması nedeniyle tez çalışmasından elde edilen bulguların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Shakya, A.K., Medicinal plants: Future source of new drugs, *International Journal of Herbal Medicine* 4(4): 59-64, **2016**.
- [2] Pan, S. Y., Zhou, S.F., Gao,S.H., Yu, Z.L., Zhang, S.F., Tang, M.K., Sun, J.N., Ma, D.L., Han, Y.F., Fong, W.F., Ko, K.M., New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Article ID 627375, 25 pages, **2013**.
- [3] Rates, S. M. K Review: Plants as source of drugs, *Toxicon*, **39**:603-613, **2001**.
- [4] Vandana,J., Gupta, A. K. ,Mukerjee,A., Pharmacological Activities Of Miraculous Plant *Plantago major* L.: A Review , *International Journal of Chemical and Physical Sciences*, 6(3):26-37, **2017**.
- [5] Zengin , G., Uysal, A., Gunes , E., Abdurrahman Aktumsek Survey of Phytochemical Composition and Biological Effects of Three Extracts from a Wild Plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch. et Mey.): A Potential Source for Functional Food Ingredients and Drug Formulations, <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0113527&type=printable> (Aralık, 2017)
- [6] Zahin, M., Ahmad, I., & Aqil, F., Antioxidant and antimutagenic potential of *Psidium guajava* leaf extracts. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(2), 146-153,**2017**.
- [7] Makhafola, T.J., Elgorashi, E.E., Joy,L., Verschaeve L.,Eloff N.J., The correlation between antimutagenic activity and total phenolic content of extracts of 31 plant species with high antioxidant activity, *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16:490, **2016**.
- [8] Özbek T, Güllüce M, Şahin F, Özkan H, Sevsay S, Ökan H, Barış Ö. Investigation of the Antimutagenic Potentials of the Methanol Extract of *Origanum vulgare* L. subsp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia Region of Turkey *Turkish Journal of Biology* , 32: 271-276, **2008**.
- [9] Ferrazzano,G.F., Cantile,F., Roberto, L., Ingenito,A., Catania,R.M., Roscetto, E., Palumbo, G., Zarrelli, A., Pollio,A., Determination of the in vitro and in vivo antimicrobial activity on salivary streptococci and lactobacilli and chemical characterisation of the phenolic content of a *Plantago lanceolata* infusion, *BioMed Research International* Article ID 286817, 8 ,**2015**.
- [10] Chiang ,L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., Lin, C.C., Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species, *Planta Medica*, 69(7):600-4,**2003**.
- [11] Galvez M, Martí C, Lopez-Lazaro M, Cortes F., Ayuso J. Cytotoxic effect of *Plantago* on cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*,88,125-130, **2003**.
- [12] Samuelsen A.B., The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L.A. . *Journal of Ethnopharmacology*. 71:1-21., **2000**.
- [13] Bouhlel, I., Mansour, H.B., Limem, I., et al., Screening of Antimutagenicity via Antioxidant Activity in Different Extracts from the Leaves of *Acacia salicina* from the Center of Tunisia, *Environmental Toxicology Pharmacology*, 23:56–63,**2007**.

- [14] Bajpayee, M. Pandey, A.K., Parmar, D., Dhawan, A., Current Status of Short-Term Tests for Evaluation of Genotoxicity, Mutagenicity, and Carcinogenicity of Environmental Chemicals and NCEs, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 15: 155–180, **2005**.
- [15] Roberto M, Jamal C.M, Malaspina O, Aparecida M., Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system, *Genetics and Molecular Biology*, 39, 2, 257-269, **2016**.
- [16] Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękała, E., Waszkielewicz, A., Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action, *Journal of Applied Genetics*, 55:273–285, **2014**.
- [17] Mortelmans, K., Zeiger, E., The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutation Research*, 455, 29-60, **2000**.
- [18] Aqil, F., Ahmad, M.Z.I., Antimutagenic activity of methanolic extracts of four ayurvedic medicinal plants, *Indian Journal of Experimental Biology* 46:668-672, **2008**.
- [19] Kubo, E., Takeshima, H., Yamashita, S., Motoi, N., Ushijima, T., Increased mutation burden in high-risk lung tissues: Toward precision cancer risk diagnosis, *Annals of Oncology*, 28(5):503, **2017**.
- [20] Gadaleta, D., Manganelli, S., Manganaro, A., Porta1, N., Benfenati, E., A Knowledge-Based Expert Rule System For Predicting Mutagenicity (Ames Test) Of Aromatic Amines And Azo Compounds, *Toxicology*, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tox.2016.09.008>, **2016**.
- [21] Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E., An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(3) :782-786, **1973**.
- [22] Gollapudi B., Krishna G., Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective, *Mutation Research* 455 21–28, **2000**.
- [23] Ramel, C., Rannung, Y., Short-term mutagenicity tests, *Journal Of Toxicology And Environmental Health*, 6, 1065-1076, **1980**.
- [24] Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A., Ames, B. N., A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 79(23): 7445–7449, **1982**.
- [25] Dalouh A, Genotoxicity and antigenotoxicity studies of commercial *Argania spinosa* seed oil (argan oil) using the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *African Journal of Food Science*, 4(7): 434-439, **2010**.
- [26] Kurudo Y. Inoue T. Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria, *Mutation Research* 202:387-381, **1998**.
- [27] Kada, T., Inoue, T., Ohta, T., Shirasu, Y., Antimutagens and their Modes of Action *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms* pp 181-196, **1986**.
- [28] Nakasugi, T., Nakashima, M., Komait, K., Antimutagens in Gaiyou. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3256-3266, **2000**.

- [29] Fedel-Miyasato L.E.S. Formagio , A.S.N. Auharek S.A. Kassuya , C.A.L. Navarro, S.D. Cunha-Laura , A.L. Monrea , A.C.D. Vieira M.C. . Oliveira1, R.J., Antigenotoxic and antimutagenic effects of Schinus terebinthifolius Raddi in Allium cepa and Swiss mice: A comparative study , *Genetics and Molecular Research*, 13 (2): 3411-3425 ,**2014**.
- [30] Bhattacharya, S., Natural antimutagens: a review, *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(2): 116-126, **2011**.
- [31] Imanishi,H., Sasaki,Y.F., Ohta,T., Watanabe,M., Kato,T. and Shirasu,Y., Tea tannin components modify the induction of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice. *Mutation Research*, 259, 79–88,**1991**.
- [32] Edenharter, R. Petersdorff , I., Rauscher, R., Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food, *Mutation Research*, 287: 261-274,**1993**.
- [33] Elliot, J.G.,Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech*. 53(2); 46-48, **1999**.
- [34] Osawa T, Katsuzaki H, Hagiwara Y, Hagiwara H, Shibamoto J T. A Novel Antioxidant Isolated From Young Green Barley Leaves, *Food Chemistry*.40:1135-1138, **1992**.
- [35] Makhaola, T.J., The *in vitro* inhibition of genotoxicity by plant extracts and the isolation characterization of antimutagenic compound from *Comberitum microphyllum*, University of Pretoria, Philosophiae Doctor, **2014**.
- [36] Akin D, Durak Y,Uysal A, Assessment of antimutagenic action of Celtis glabrata Steven ex Planch. (Cannabaceae) extracts against base pair exchange and frame shift mutations on Salmonella typhimurium TA98 and TA100 strains by Ames test, *Drug Chemistry Toxicol*, 39(3): 312–321,**2016**.
- [37] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4):564-582, **1992**.
- [38] Halberstein, A.R., Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns, *Ann Epidemiol* ,15:686–699, **2005**.
- [39] Variya, B.C., Bakrania, A.K., Patel , S.S., Emblica officinalis (Amla): A review for its phytochemistry, ethnomedicinal uses and medicinal potentials with respect to molecular mechanisms, *Pharmacological Research* 111:180–200, **2016**.
- [40] Veeresham, C., Natural products derived from plants as a source of drugs, *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3(4): 200–201, **2012**.
- [41] Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.-T., Newmark, H.L. , Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21 (1), 381-406, **2001**.
- [42] Wootton C.P., ve Ryan L., Improving public health? : The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research*,. 44:3135-3148, **2011**.
- [43] Croteau, R., Kutchan, T.M.,Lewis, N.G., Natural Products (Secondary Metabolites), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, CHAPTER 24, American Society of Plant Physiologists, **2000**.
- [44] Darrow K., Bowers D.M., Phenological and Population Variation in Iridoid Glycosides of Plantago lanceolata (Plantaginaceae) *Biochemical Systematics and Ecology* 25(1) :1-11, **1997**.

- [45] Manach,C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jime'nez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability^{1,2}, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727–47, **2004**.
- [46] Działo, M., Mierziak, J., Korzun ,U., Preisner , M.,Szopa, J., Kulma, A., The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders, *International Journal of Molecular Sciences* 17, 160, **2016**.
- [47] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 56 (11): 317-33,**1998**.
- [48] Tohma, H., Köksal,E., Kılıç, Ö., Alan, Y., Yılmaz, M.A., Gülçin, İ. Bursal, E., Alwasel, S.H., Analysis of the Phenolic Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Salvia L. Species, *Antioxidants (Basel)*, 5(4): 38, **2016**.
- [49] Rusznyak, S.P., Szent-Gyorgyi A., Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature*, 138, 27,**1936**.
- [50] Rao, P., Kiran, D.V.S., Rohini, P., Bhagyasree, P., Flavonoid: A review on Naringenin Venkateswara, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(5): 2778-2783,**2017**.
- [51] Viskupicova ,J., Ondrejovic, M., Sturdik, E., Bioavailability and metabolism of flavonoids. *J Food Nutrient Reseach*, 47 (4), 151–162, **2008**.
- [52] Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, JC. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev* 5: 1–12, **2011**.
- [53] Corcoran MP, McKay DL, Blumberg JB. Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. *Journal of nutrition in gerontology and geriatrics* 31 (3): 176-89, **2012**.
- [54] Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L.,Flavonoids: promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews*, 23 (4): 519-534 ,**2003**.
- [55] Lopez-Lazaro,M., Willmore, E , Austin , .A., The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells. *Mutation Research* 696:41–47, **2010**.
- [56] Havansteen, B., Flavonoids, A Class Of Natural Products Of High Pharmacological Potency, *Biochemical pharmacology*, 32(7): 1141-1148, **1983**.
- [57] Albach, D. C.. Meudt, H. MB. Oxelman, B. , Piecing Together The “New” Plantaginaceae1 *American Journal Of Botany*, 92(2): 297–315, **2005**.
- [58] Taskovaa, R., Evstatievaa,L., Handjievab, N., Popovb, S., Iridoid Patterns of Genus *Plantago* L. and Their Systematic Significance *Zeitschrift für Naturforschung*, 57:42-50, **2002**.
- [59] Kobeasy, M.L., Abdel-Fatah, O.M., Abd El-Salam, M.S., Mohamed, Z.E.M., Biochemical studies on *Plantago* major L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L., *International Journal of Biodiversity and Conservation* Vol. 3(3), pp. 83-91, **2011**.
- [60] Stewart, A.V., Plantain (*Plantago lanceolata*) – a potential pasture species, *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 58: 77–86 , **1996**.
- [61] Goncalves, S.- Romano, A.,The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae) Sandra Gonc, alves, *Industrial Crops and Products*, 83, 213–226,**2016**.
- [62] Cragg, G.M., Newman, D.J., Plants as a source of anti-cancer agents, *Journal of Ethnopharmacology* 100 : 72–79, **2005**.
- [63] Sheikh, D.M.E., Efficiency of using Arabic Gum and *Plantago* Seeds Mucilage asEdible Coating for Chicken Boneless Breast, *Food Science and Quality Management*,32: 2224-6088,**2014**.

- [64] Fleer, H., Verspohl, E.J., Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14(6),409-415,**2007**.
- [65] Ravn, H., Nishibe,S., Sasahara, M., Xuebot,L., Phenolic Compounds From *Plantago Asiatica* Phytochemistry, 29(11) :3627-3631, **1990**.
- [66] Hu, J.L., Nie, S.P., Li, C., Wang, S., Xie, Y.M., Ultrasonic irradiation induces degradation and improves prebiotic properties of polysaccharide from seeds of *Plantago asiatica* L. during *in vitro* fermentation by human fecal microbiota, **2016**, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.06.009
- [67] Soudaa, S.S., Mohammed, R.S., Marzouk M.M., Fahmy, M.A., Hassan, Z.M., Farghalyd, A.A., Antimutagenicity and phytoconstituents of Egyptian *Plantago albicans* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2):946-951, **2014**.
- [68] Haddadian, K. Haddadian, K. Zahmatkash, M., A Review of *Plantago* Plant, Indian journal of traditional knowledge 13(4):681-685 ,**2014**.
- [69] Lutterodt, H., Cheng, Z., 2008. Beneficial health properties of psyllium and approaches to improve its functionalities. *Advances in Food and Nutrition Research*, 55:193–220, **2008**.
- [70] Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands. 504-21, **1982**.
- [71] Baytop T. Therapy with Medicinal Plants in Turkey. 2nd ed. Istanbul-Turkey: Nobel Tip Kitapevleri; P. 337-338, **1999**.
- [72] Kara, K., Güçlü, B.K., Aktuğ, E., Baytok, E., Dar yapraklı sinirotunun (*plantago lanceolata*) besin madde düzeyi ve ruminantlarda *in vitro* sindirim parametrelerinin belirlenmesi, *Journal Of Health Sciences*, 24: 149-155, **2015**.
- [73] Çelik, T.A., Aslantürk, Ö.S., Anti-mitotic and anti-genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells. *Biologia (Bratisl)*, 61 (6): 693-697, **2006**.
- [74] Turel, I., Ozbek, H., Erten, R., Oner, A.C., Cengiz, N., Yilmaz O., Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L., *Indian Journal of Pharmacol.*, 41(3):120-4, **2009**.
- [75] Muhammad, Z., Genetic and environmental effects on polyphenols in *Plantago major*. Introductory Paper at the Faculty of Landscape Planning, *Horticulture and Agricultural Science*, 1: 1654-3580, **2010**.
- [76] Mello, J.C., Guimarães, N.S.S., Gonzaleza, M.V.D., Paivaa, J.S., Prietob, T., Nascimento, O.R., Rodrigues, T., Hydroxyl scavenging activity accounts for differential antioxidant protection of *Plantago major* against oxidative toxicity in isolated rat liver mitochondria, *Journal of Pharmacy And Pharmacology*, 64, 1177–1187 , **2012**.
- [77] <http://www.altnature.com/gallery/plantain.htm>
- [78] Genc, Y. *Plantago Lagopus* L. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [79] Fiza, M.P.V. Lanza, A.M.D., Matellano, L.F., Polyphenolic Compounds from *Plantago lagopus* L., *Z. Naturforsch.* 55c, 877-880, **2000**.
- [80] Velázquez-Fiz, M.P., Díaz-Lanza, A.M., Fernández-Matellano, L., Iridoids From *Plantago Lagopus*, *Pharmaceutical Biology*, 38 (4):268–270, **2000**.
- [81] Hassemer, G., Meudt, H.M., Rønsted, N., Nomenclatural and taxonomic notes on Mediterranean narrow-leaved plantains (*Plantago* section *Maritima*, *Plantaginaceae*), *Journal of Plant Taxonomy and Geography*, <http://dx.doi.org/10.1080/00837792.2017.1349066>, **2017**.

- [82] Genç, Y., *Plantago holosteum Scop. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2017**.
- [83] Gomes-Carneiro, M. R., Dias D. M. M., Paumgartten, F. J. R., Study on the mutagenicity and antimutagenicity of β -ionone in the Salmonella/microsome assay, *Food and Chemical Toxicology*, 44, 522-527, **2006**. Masfria,D., Sumaiyah,D., Dalimunthe, A., Antimutagenic Activity of Ethanol Extract of *Rhaphidophora pinnata*(L.f) Schott Leaves on Mice, *Scientia Pharmaceutica*, 85(1): 7,**2017**.
- [84] Ahmad, S.M., SAhmad, S., Ali, A., Afzal, M., Anticarcinogenic and antimutagenic activity of *Alstonia scholaris* on the albino mice bone marrow cells and peripheral human lymphocyte culture against methyl methane sulfonate induced genotoxicity, *Advanced Biomedical Research*, 5: 92,**2016**.
- [85] Matshoga, R.G. ,Antonissen , R. , Pieters , L., Verschaeve, L., Elgorashi , E.E., Genotoxicity and Antigenotoxicity of selected South African indigenous plants R. Makhuvele, *South African Journal of Botany* 114,89–99,**2018**.
- [86] OECD guideline for testing of chemicals, Bacterial Reverse Mutation Assay Or Ames Assay (OECD 471), **1997**.
- [87] Ames, B.N., Mccann, J., Yamasaki, E., Methods For Detecting Carcinogens And Mutagens With The Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research*, 31 347-364,**1975**.
- [88] Nicolette J., Genetic Toxicology Testing, CHAPTER 7, 141-162, **2013**.
- [89] Levin, D.E., Hollstein, M., Christman,M.F., Schwiers, E.A., Ames, B.N. A new Salmonella tester strain (TA102) with AT base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 79:7445-7449,**1982**.
- [90] Blanco M, Urios A, Mart'inez A. New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagen *Mutation Research* 413:95–101,**1998**.
- [91] Mortelmans, K., Riccio, E.S., The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2, *Mutation Research* 455 61–69, **2000**.
- [92] Oliveira RJ1, Ribeiro LR, da Silva AF, Matuo R, Mantovani MS. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of beta-glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicol In Vitro*. 20(7):1225-33,**2006**.
- [93] Padhi, L., Panda, S.K., Medicinal Plants: Potential To Fight Superiority Diseases, *Annals of pharma research*, 1:1, **2013**.
- [94] Karaman, Ö., Cebe, G.E., Diyabet ve Türkiye’de antidiyabat olarak kullanılan bitkiler, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40(3): 47-61,**2016**.
- [95] Kendir, G., Güvenç .A., Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* ,30 (1): 49-80, **2010**.
- [96] Devi, P.H. , Mazumder, P. B., Devi,L., Antioxidant and antimutagenic activity of *Curcuma caesia* Roxb. rhizome extracts, *Toxicol Rep*. 2: 423–428,**2015**.
- [97] Sghaier M, Boubaker J, Skandrani İ, Bouhlel I, Limem I, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Antimutagenic, Antigenotoxic And Antioxidant Activities Of Phenolic-Enriched Extracts From *Teucrium Ramosissimum*: Combination With Their Phytochemical Composition, *Environmental Toxicology And Pharmacology* 3(1)220–232, **2011**.
- [98] Tutel, B., Kandemir İ., Kuş, S., Kence , A., Classification of Turkish *Plantago* L. Species Using Numerical Taxonomy *Turk Journal Botanic*, 29:51-61,**2005**.

- [99] Bayrak, D., *Gıda bozan mikroorganizmalara karşı bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü /, Muğla, **2015**.
- [100] Birošová , L., Mikulášová, M., Vavřková,S., Antimutagenic Effect Of Phenolic Acids, *Biomedical Papers of the Medical Faculty* 149(2):489–91,**2005**.
- [101] Kolak, U., Boga, M., Uruşak, E.A., Ulubelen, A., Constituents Of Plantago Major Subsp. Intermedia With Antioxidant And Anticholinesterase capacities, *Turkish - Academic Journals* , 35, 637 – 645, **2011**.
- [102] Mehrabian S., Majd A., Dana R. Antimutagenic And Anticarcinogenic Effect Of Vegetative And Generative Parts Of Plantago Major L. In Langrood (Gilan) And Hesarak (Karaj) Areas, *The Quarterly Journal Of Animal Physiology And Development*, 1 (2) :23- 31,**2009**.
- [103] Negi,P, Jayaprakasha G, Jena B., Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts , *Food Chemistry* 80 : 393–397,**2003**.
- [104] Özcan, T., Fatty Acid Composition of Seed Oils in Some Sand Dune Vegetation Species from Turkey. *Chemistry of Natural Compounds* ,50(5) 804–80, **2014**.
- [105] Jamal , G.A., Carmichael, H., The Effect of γ -Linolenic Acid on Human Diabetic Peripheral Neuropathy: A Double-blind Placebo-controlled Trial, *Diabetic medicine*, 7(4):319-323, **1990**
- [106] Kawashty, S.A., Gamal, E.D., Abdalla, M.F., Saleh, N.A.M., Flavonoids of *Plantago* species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology* ,22, 729–733, **1994**.
- [107] Beara, Ć.N., Lesjak, M.M., Jovin, E.D., Balog, K.J. , Anackov , G.T.. Orcić , D.Z., Mimica-Dukić , N.M., Plantain (*Plantago* L.) Species as Novel Sources of Flavonoid Antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 57, 9268–9273, **2009**.
- [108] Boubaker , J., Skandrani , Ĭ. Bouhlel, Ĭ., sghaier ,M.B., Neffati, A., Ghedira , K., Chekir-Ghedira, L., Mutagenic, antimutagenic and antioxidant potency of leaf extracts from *Nitraria Retusa*, *Food and Chemical Toxicology*, 48 : 2283–2290, **2010**.
- [109] Watanabe, K., Sakamoto, K., Sasak, T., Comparisons on chemically-induced mutation among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2rpKM101 and WP2 *uvrArp*KM101: collaborative study II, *Mutation Research* 412 17–31, **1998**.
- [110] Bouhlel, Ĭ., Mansour, H.B., Limem, Ĭ., et al., Screening of Antimutagenicity via Antioxidant Activity in Different Extracts from the Leaves of *Acacia salicina* from the Center of Tunisia, *Environmental Toxicology Pharmacology*, 23:56–63,**2007**.
- [111] Uysal, A., Zengin, G., Durak, Y., Aktümsek,A.,*Centaurea pterocaula* özütlerinin antioksidan ve antimutajenik özellikleri ile enzim inhibitör potansiyellerinin incelenmesi, *Marmara Pharmaceutical Journal* 20: 232-242, **2016**.
- [112] Renner, H.W., In vivo effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations, *Mutation Research Letters*, 244(2), 185-188, **1990**.
- [113] Neri-Numa,I.A., Carvalho-Silva, L.B., Carvalho-Silva, J.P., Carvalho-Silva, L. G., Muramoto, M.T., Ferreira , J.E.M., Ferreira , J.E., Ruiz, A.L.T., Junior,

M.R.M., Pastore, G.M., Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest, *Food Research International*, 50(1):170-76, **2013**.

- [114] Harput, Ş., Saraçoğlu, İ., Genç, Y., *Plantaginaceae Familyasının Kemotaksonomisi ve Biyolojik Etkili Doğal Bileşiklerin İzolasyonu*, Proje No: 108T518, Ankara, **2012**.



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Serpil Metin

Doğum Yeri : Sulakyurt

Medeni Hali : Bekar

E-posta : serpil_mtn @ Hotmail.com

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Beytepe /ANKARA

Eğitim Lise : Ankara Gazi Lisesi

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi

Doktora :-

Yabancı Dil ve Düzeyi

İş Deneyimi Deneyim

Alanları Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 01 /06/2018

Tez Başlığı / Konusu: Bazı *Plantago* ekstrelerinin antitumöjenik etkilerinin *Salmonella*/*Escherichia coli* WP2 test sistemiyle belirlenmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 70 sayfalık kısmına ilişkin, 01/06/2018 tarihinde ~~sağım~~/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~/dâhil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Serpil METİN
Öğrenci No: N13223854
Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Moleküler Biyoloji
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

01.06.2018

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Nuran DİRİL