

***LİNARIA GENİSTİFOLİA* (LİNNAEUS) MİLLER SUBSP.
GENİSTİFOLİA
SULU EKSTRELERİNİN GENOTOKSİK VE MUTAJENİK
ÖZELLİKLERİNİN ALLİUM VE AMES
TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Uğur Gürol GÖKÇE

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Recep LİMAN

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI
Temmuz 2012

Bu tez çalışması 11.FEN.BİL.16 numaralı proje ile BAPK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LINARIA GENISTIFOLIA (LINNAEUS) MILLER SUBSP. *GENISTIFOLIA*
SULU EKSTRELERİNİN
GENOTOKSİK VE MUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN
ALLİUM VE AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Uğur Gürol GÖKÇE

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Recep LİMAN

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Temmuz 2012

TEZ ONAY SAYFASI

Uğur Gürol GÖKÇE tarafından hazırlanan "*Linaria genistifolia* (Linnaeus) Miller subsp. *genistifolia* Sulu Ekstrelerinin Genotoksik ve Mutajenik Özelliklerinin Allium ve Ames Testi İle Araştırılması " adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğini ilgili maddeleri uyarınca 03/07/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliğiyle ~~çokteğse~~ ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Recep LİMAN

Başkan : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye : Yrd. Doç. Dr. Lajine Aksoy
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye : Yrd. Doç. Dr. Recep LİMAN
Uşak Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi.

Jüri
Li
Rf

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Enstitü Müdürü
(Ünvanı, Adı ve Soyadı)

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe 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 üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

03/07/2012

Uğur Gürol GÖKÇE

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

LİNARİA GENİSTİFOLİA (LİNNAEUS) MİLLER SUBSP. *GENİSTİFOLİA*
SULU EKSTRELERİNİN GENOTOKSİK VE MUTAJENİK
ÖZELLİKLERİNİN ALLİUM VE AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Uğur Gürol GÖKÇE
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Yard. Doç. Dr. Recep Liman

Bu araştırmada, *Linaria genistifolia* (Linnaeus) Miller subsp. *genistifolia*, Plantaginaceae, bitkisinin toprak üstü kısımlarının sulu ekstresinin (*Lg*-ekstresi) genotoksik ve mutajenik etkileri sırasıyla *A. cepa* meristematik kök hücreleri ve bakteriyel revertant mutasyon deneyinde *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 suşları kullanılarak metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda araştırıldı. Allium kök büyüme inhibisyon testinde EC₅₀ değeri yaklaşık olarak 15 g/L olarak belirlendi ve *Lg*-ekstresinin 0,5xEC₅₀, EC₅₀ and 2xEC₅₀ konsantrasyonları soğan kök hücrelerine uygulanmıştır. Distile su ve metil metan sülfanat (MMS, 10 mg/L) sırasıyla negatif ve pozitif kontrol grubu olarak kullanıldı. Test edilen preparasyonların neden olduğu karakteristik etkisi mitotik indeks (Mİ) değerinin 7,5 g/L ve 15 g/L (24 ve 96 saatlik uygulamalar hariç) artması ve aynı şekilde mitotik indeks değerinin 30 g/L ve MMS'de azalmasıdır. Anafaz telofaz hücrelerinde yapışıklık, köprüler, kalgın kromozom ve bozulmuş anafaz telofaz gözlemlenirken diğer hücrelerde c-metafaz, prometafaz, poliploidi ve binükleer hücreler gözlemlendi. *Lg*-ekstresinin, *S. typhimurium* TA 98 ve TA100 suşlarında S9 varlığı ve yokluğunda mutajenik etkisi bulunmadı. Sonuçlar aynı zamanda istatistiksel olarak SPSS for Windows paket programında Duncan çoklu değişim testi ile değerlendirildi. Bu sonuçlar *Lg*-ekstresinin *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde genotoksik aktivite gösterdiğini fakat Ames test sisteminde mutajenik aktivite göstermediğini ortaya koymuştur.

2012, viii + 75 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Linaria genistifolia*, *Allium*, Ames, Plantaginaceae

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi, Yazı tipi: Kalın

ABSTRACT
M.Sc Thesis

GENOTOXIC AND MUTAGENIC EFFECTS OF
AQUEOUS EXTRACT FROM AERIAL PARTS OF
LINARIA GENISTIFOLIA (LINNAEUS) MILLER SUBSP. *GENISTIFOLIA*

Uğur Gürol GÖKÇE
AFYON KOCATEPE UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Recep LİMAN

In this study, genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts *Linaria genistifolia* (Linnaeus) Miller subsp. *genistifolia*, Plantaginaceae (*Lg-ext*) were investigated by using both *Allium cepa* root meristematic cells and bacterial reverse mutation assay in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with or without metabolic activation system (S9), respectively. In *Allium* root growth inhibition test, EC₅₀ value was determined approximately 15 g/L and 0.5xEC₅₀, EC₅₀ and 2xEC₅₀ concentrations of *Lg-ext* were introduced to onion tuber roots and distilled water and methyl methane sulfonate (MMS, 10 mg/L) used as a negative and positive control, respectively. The characteristic effect caused by tested preparations was an increase of mitotic index (MI) in 7.5 g/L and 15 g/L (except 24 and 96 h) and simultaneous decrease of MI in 30 g/L and in MMS. While stickiness, bridges, chromosome laggards and disturbed anaphase-telophase were observed in anaphase-telophase cells, c-metaphase, pro-metaphase, polyploidy and binuclear cells were observed in other cells. *Lg-ext* was not found to be mutagenic on *S. typhimurium* TA 98 and TA100 with or without S9. The results were also analyzed statistically by using SPSS for Windows, and Duncan's multiple range tests were performed respectively. These results indicate that *Lg-ext* exhibits genotoxic activity in *A. cepa* root meristematic cells but not mutagenic activity in Ames test system.

2012, viii + 75 pages

Key Words: *Linaria genistifolia*, *Allium*, Ames, Plantaginaceae

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi, Yazı tipi: Kalın Değil, Tümü
Büyük Harf

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi, Yazı tipi: Kalın Değil

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi, Yazı tipi: Kalın Değil, Tümü
Büyük Harf

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi, Yazı tipi: Kalın Değil

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi, Yazı tipi: Kalın Değil, Tümü
Büyük Harf

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca benden yardım ve katkılarını esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında tüm laboratuvar desteğini sağlayan saygı değer hocamız Prof. Dr. Muhsin KONUK’a,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum, emeğini ve hakkını ödeyemeyeceğim değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Recep LİMAN’a,

Laboratuvar çalışmalarımda katkıları bulunan değerli arkadaşlarım; Alperen DEDEOĞLU, Mehmet AKINCI’ya,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve hiçbir destekten kaçınmayan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

Uğur Gürol GÖKÇE
AFYONKARAHİSAR, 2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	5
2.1 <i>Linaria</i> Miller.....	5
2.1.1 <i>Linaria</i> Türlerinin Terapötik Etkileri	5
2.1.2 <i>Linaria genistifolia</i> (Linnaeus) Miller subsp. <i>genistifolia</i>	6
3. GENEL BİLGİLER.....	8
3.1 Kromozom Yapısı	8
3.2 Mutasyon	9
3.2.1 Kromozom Mutasyonları.....	10
3.2.1.1 Kromozom Sayısı Değişimleri.....	10
3.2.1.2 Kromozom Yapı Değişimleri	12
3.2.2 Gen Mutasyonları.....	14
3.3 Mutajenler.....	16
3.4 Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu	17
3.5 Mutajenik Çalışmalarda Bitki Test Sistemlerinin Kullanılması.....	19
3.6 Ames/ <i>Salmonella</i> /Mikrozom Test Sistemi.....	21
4. MATERYAL ve METOT	26
4.1 Bitki Ekstrasyonu Yöntemi	26
4.2 Allium Test.....	26
4.2.1 Büyüme Engelleme Testi	26
4.2.2 Feulgen Boyasının Hazırlanışı	27

4.2.3 Feulgen Boyası İle Preparatların Hazırlanışı	28
4.3 AMES Mutajenite Testi.....	29
4.3.1 Kimyasal Maddeler.....	29
4.3.2 <i>S. typhimurium</i> Test Suşları.....	29
4.3.3 Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları.....	30
4.3.4 Test Maddeleri.....	38
4.3.5 Ames Deneyi.....	38
5. BULGULAR.....	44
5.1 Allium Testine Ait Bulgular	44
5.1.1 Kök Büyümesi İnhibisyonu Testi.....	44
5.1.2 Mitotik İndeks ve Mitotik Faz Frekansları	46
5.1.3 Lg-ekstresinin Neden Olduğu Anormalliklerin Tipleri ve Oranları	48
5.2 Ames Testine Ait Bulgular	52
5.2.1 Genetik İşaretlerin Kontrolü.....	52
5.2.2 Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığı.....	55
5.2.3 Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısı Belirlenmesi.....	56
5.2.4 Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması.....	56
5.2.5 Ames Mutajenite Testinin Yapılışı.....	56
6.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ.....	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	Mikrogram
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
cm ³	Santimtereküp
EC ₅₀	% 50 etkili konsantrasyon (EC = Effective Concentration)
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
kg	Kilogram
L	Litre
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
N	Normal
ppm	Parts Per Million
µmol	Mikromol

Kısaltmalar

S9	Süpernatant 9000
WHO	World Health Organization
MGA	Minimal Glukoz Agar
HBA	Histidin/biyotin/ampisilin
NB	Nutrient Broth
NA	Nutrient Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 <i>Linaria genistifolia</i> (Linnaeus) Miller subsp. <i>genistifolia</i>	7
Şekil 3.1 Kromozom yapısı.....	9
Şekil 3.2 Faz-I ve Faz-II biyotransformasyon reaksiyonları.....	19
Şekil 5.1 <i>Lg</i> -ekstresinin büyümeyi engelleme testi.....	44
Şekil 5.2 <i>Lg</i> -ekstresinin <i>A. cepa</i> kök ucu hücrelerinde konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama kök uzunlukları.....	45
Şekil 5.3 <i>Lg</i> -ekstresi ile muamele edilen <i>A. cepa</i> kök hücrelerinde görülen anormallikler.....	51
Şekil 5.4 <i>S. typhimurium</i> TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları.....	52
Şekil 5.5 <i>S. typhimurium</i> TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları.....	53
Şekil 5.6 <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları.....	53
Şekil 5.7 <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolü sonuçları.....	54
Şekil 5.8 <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları.....	55
Şekil 5.9 <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.3 <i>S. typhimurium</i> mutant suşlarının genetik özellikler.....	24
Çizelge 5.1 <i>Lg</i> -ekstresinin <i>A. cepa</i> kök hücrelerinde konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama kök uzunluklar.....	45
Çizelge 5.2 <i>Lg</i> -ekstresinin <i>A. cepa</i> kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi.....	47
Çizelge 5.3 <i>Lg</i> -ekstresinin neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları.....	50
Çizelge 5.4 <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşları ile denenen ekstrenin (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon testi sonuçları.....	57

1.GİRİŞ

Yaşamımıza yeni giren bazı fiziksel ve kimyasal ajanlar, insan hayatını kolaylaştırabilirken bazı sağlık sorunlarına da neden olabilmektedir. Günümüzde halen yeni kimyasal ürünler hayatımızdaki yerlerini almaya devam etmektedirler. Bu kimyasal ürünlerin kullanımından önce insan sağlığına etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Günümüzde alternatif tıbbın önemli bir kısmını bitki ekstreleri oluşturmaktadır. Bu bitki ekstreleri mutajenik etki oluşturan kimyasallara veya çevresel etmenlere karşı antimutajenik etki gösterebildiği gibi, bu ekstrelerden bazıları farklı organizmalarda farklı mutajenik ve sitotoksik etkiler de gösterebilmektedir.

Tıbbi bitkilerin kullanımı, her zaman insanlık kültürünün bir parçası olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya popülasyonunun % 80'ine varan bir kesiminin, bazı sağlık hizmetleri açısından geleneksel tıbbi sistemlere güvendiklerini bildirmektedir. Bununla birlikte birçok tıbbi bitkinin özellikle mutajeniteleri ve karsinojeniteleri gibi toksikolojik özelliklerini gösteren raporlar da vardır (Alade *et al.* 2009). WHO, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeleri, non-toksik oldukları kanıtlanan geleneksel bitki preparasyonlarını, sağlık programlarına ilave etmeleri yönünde teşvik etmektedir (WHO 1985).

Bitkileri kullanarak tedavi etme yöntemi olan fitoterapi, tüm dünyada ve bu tedavi yönteminin daha sistematik ve karmaşık olarak uygulandığı ülkelerde kullanılmakta ve modernleşme ile birlikte gelişmiş ülkelerde uygulanması hızla artmaktadır (Saad *et al.* 2006).

Bazı medikal bitkilerin aşırı terapatik avantajları olmasına rağmen medikal bitkilerin bazı içerikleri potansiyel olarak toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olabilmektedir (Gadano *et al.* 2006). İlaçlar, organizmada özellikle hedef sistem üzerinde etkisini gösterirken, bitkisel ilaçlarda ise birçok sistem spesifik olmayan şekilde fizyolojik olarak aynı zamanda etkilenebilmektedir. Bu nedenle, tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin de, konvansiyonel ilaçlarda olduğu gibi kalite, güvenlik ve etkinlik

yönünden test edilmeleri ve standardizasyonlarının yapılması gerekmektedir (Simaan 2009).

İlaç geliştirme çalışmalarının prelinik aşamasında ve toksikolojik araştırmalarda hücre kültürü yöntemi ile sitotoksosite çalışmaları hem hayvan deneylerinin azaltılmasını; hem de sistemlere yönelik özel etkilerin moleküler düzeyde anlaşılmasını sağladığından günümüzde zorunlu hale getirilmiştir. Sitotoksosite çalışmalarında kullanılan ölümsüz hücre hatları ise çalışmaların primer hücre kültürlerine göre daha hızlı, ucuz ve güvenilir olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang *et al.* 2002).

Son yıllarda bitkisel ilaçların kullanımının artmasıyla fitoterapiye ilgi de artmıştır. Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde ticari önem kazanmasından dolayı geleneksel ilaçların üretimi ve kullanımı yaygınlaşmaktadır. (Roy-Byrne *et al.* 2005).

Geleneksel tıpta, farklı etkin maddeleri içeren ilaçların aynı anda uygulanması, ilaç etkileşimleri ve yan etkileri nedeniyle genellikle tercih edilmemektedir. Fitoterapide ise saflaştırılmış aktif bileşenleri yerine bitkinin tamamının kullanılması, içerdiği farklı bileşenlerinin sinerjik etki göstermesine veya toksisitesinin tamponlanarak azalmasına neden olur (Poppenga 2002).

Bazı bitkisel ürünlerin ise substrat, baskılayıcı veya indükleyicisi olarak, ksenobiyotik metabolizmasında önemli rol oynayan sitokrom p450'leri (CYP450) etkilemesi sonucu aynı anda uygulanan ilaçların farmakokinetiğini, karsinojen ve steroid metabolizmasını değiştirdiği bildirilmiştir. CYP450 ile toksik olmayan metabolitlere dönüşüp atılabilen bazı bitkisel maddelerin yanında, toksik metabolitlere dönüşüp zararlı etkiler gösterenler de bulunabilir. Bitkisel ürünlerden bazıları, CYP450'nin baskılanmasına neden olarak, toksik metabolitlerin oluşumuna ve prokarsinojen aktivasyonunu engelleyerek karsinogenazın azalmasına neden olurken; bazıları CYP450 indükleyici olarak davranır, bazıları ise reaktif ara ürünler ile CYP450 reaksiyonlarını etkiler (Zhou *et al.* 2004). Bu durumun tersine karaciğer ve böbrek gibi ksenobiyotik metabolizmasında önemli rol oynayan CYP450 enzimlerinin sentezlendiği

organlarda yetmezliklerin olması da bitkisel ürünlerin metabolizmasını ve zehirliliklerini etkilemektedir (Steff 2007).

Linaria türleri halk ilacı olarak Anadolu'da, Japon ve Hint halk tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır. Antidiyabetik, pürgatif, diüretik etkileri yanında emoliyan ve yara iyi edici özelliklere sahip olmaları nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldıkları bildirilmiştir (Kitagawa *et al.* 1973, Baytop 1984, Sing and Prakash 1987). Ayrıca antiallerjik etkileri nedeniyle ekzema tedavisinde de faydalanılmıştır (Dobrescu *et al.* 1985). Bitkinin kimyasal yapısı üzerinde yapılan araştırmalarda başlıca monoterpenler, diterpenler, iridoidler, flavonoidler ve alkaloidler olmak üzere birçok etken madde grubunun varlığı tespit edilmiştir (Bianco *et al.*, 1996; Otsuka, 1992, Ilieva *et al.*, 1993, Bianco *et al.*, 1996, Hua *et al.*, 2002, Ahmad *et al.*, 2006, Tundis *et al.*, 2005, Ferhat *et al.*, 2010).

Allium testi ilk defa Levan tarafından 1938 yılında kolşisinin etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda bu temel test sistemine belirli modifikasyonlar yapılarak kullanım alanı geliştirilmiştir (Fiskesjö 1985). Allium testi hızlı, güvenilir, uygulanması kolay ve ekonomik bir test sistemidir. Ayrıca prokaryotik veya ökaryotik canlılarla yapılan diğer, alternatif kısa dönem toksisite test sistemleriyle iyi bir korelasyon göstermektedir (Fiskesjö 1985).

Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılan bakteriyel testlerdir. Bakteriler, basit üreme ortamlarında hızla ürediklerinde, basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmalarından ötürü tercih edilmektedir (Hofnung and Quillardet 1985).

Ames testi, 1970'lerin başında Bruce Ames tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanım alanı bulmuş olan kısa zamanlı, bir geri mutasyon testidir (Maron and Ames 1983). *Salmonella*/Mikrozom testi bakteriyel mutasyon testleri içinde mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen ve karakterilize edilen geçerliliği, uygulama kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Gathouse *et al.* 1998). Test organizması olarak kullanılan *S. typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (his G, his

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik
Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

C ya da his D) gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür.

Bu çalışmada *Lg*-ekstresinin muhtemel mutajenik etkileri *in vitro* test sistemlerinden *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılarak S9 varlığında ve yokluğunda Ames/*Salmonella*/mikrozom testi ile sitotoksik ve genotoksik özellikleri ise Allium testi ile araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 *Linaria* Miller

Ülkemiz endemik bitki florası bakımından zengindir. Bu bitkilerin etkinliklerinin araştırılması hem ülkemiz ekonomisi, hem de halk arasındaki kullanımlarının güvenilirliğinin değerlendirilmesi bakımından önem taşır (TKB 2008)

Plantaginaceae familyasına ait bir cins olan *Linaria* Miller cinsi Kuzey yarımkürede ve özellikle Akdeniz civarında yayılış gösteren çok yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları basit, tam, sapsız, genellikle dar, çoğunlukla altta vertisillat, üstte alternat şeklindedir. Çiçekler terminal, rasem veya başak, brakteli; kaliks derince ve genellikle eş olmayan 5 loblu, adaksiyal lob genellikle en uzun, nadiren kısadır. Korolla, tübün ağzına yakın kısmı (palate) hariç tüysüz; tüp silindirik; altta konik veya silindirik mahmuzlu, aya iki dudaklı, üst dudak iki loblu, alttaki üç loblu, genellikle tüpün ağza yakın kısmı (patale) pubescenttir. Stamenler 4 didinamdır. Yeryüzünde 150 kadar tür ile temsil edilen cinsin ülkemizde 9 tanesi endemik olmak üzere, 20 türü ve 12 alt türü bulunmaktadır (Davis 1978). Anadolu'da geniş bir yayılma alanına sahip olan *Linaria* türleri "Nevruz otu" adıyla bilinmektedir.

2.1.1 *Linaria* Türlerinin Terapötik Etkileri

Linaria türleri halk ilacı olarak Anadolu'da, Japon ve Hint halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Antidiyabetik, pürgatif, diüretik etkileri yanında emoliyan ve yara iyi edici özelliklere sahip olmaları nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldıkları bildirilmiştir (Kitagawa *et al.* 1973, Baytop 1984). Ayrıca antiallerjik etkileri nedeniyle ekzema tedavisinde de faydalanılmıştır (Dobrescu *et al.* 1985). Bitkinin kimyasal yapısı üzerinde yapılan araştırmalarda başlıca monoterpenler, diterpenler, iridoitler, flavonoitler ve alkaloitler olmak üzere birçok etken madde grubunun varlığı tespit edilmiştir (Bianco *et al.*, 1996; Otsuka, 1992, Ilieva *et al.*, *et al.*, 1993, Bianco *et al.*, 1996, Hua *et al.*, *et al.*, 2002, Ahmad *et al.*, *et al.*, 2006, Tundis *et al.*, *et al.*, 2005, Ferhat *et al.*, *et al.*, 2010).

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

2.1.2 *Linaria genistifolia* (Linnaeus) Miller subsp. *genistifolia*

Çok yıllık otsu bitkidir. Gövdelerinin uzunluğu 20-130 cm arasındadır. Gövdeleri yükselici veya diktir. Çiçek durumu basit yada panikulat, yapraklar, alternat, az çok yoğun, orta yapraklar yumurtamsı (ovat) lanseolat, mızraksı veya linear (ince uzun) 15-60 mm uzunluğunda 0,5-20 mm genişliğinde tabanı nadiren subkordat (hemen hemen kalp şeklinde) 1-3 damarlıdır. Rasemoz yoğun, gevşek arası ve uzamış, brakteler lanseolat, nadiren kaliksin üzerine kadar uzanır. En alttaki bazıları geriye kıvrılmış alt çiçek sapları 2-4 bazen 6 mm'dir. kaliks lobları ovat-dar linear lanseolat tabanı yuvarlağımsı ucu akut, tamamen otsu, 2-5 mm uzunlukta her zaman tüysüzdür. Korolla parlak veya kükürt sarısı, kırmızımsı damarlı veya damarsız 8-12 mm'dir. Sublar konikal subulat arası 5-8 mm'dir. Az çok düzdür. Kapsül küre şeklinde 3-4 mm'dir. Kaliksten daha kısa-az yoğun, tohumlar sıkışmış dörtgenimsi (1-2 mm). Rugulas sıklıkla dar kanatlıdır.

Rakımı 0-2100 m olan koruluk, çalılık, maki, kayalar, topraklı yamaçlar, yol kenarlarında yetişebilir. İlk çiçeklenme zamanı Mayıs ayı, son çiçeklenme zamanı ise Ağustos ayıdır.

Davis'e göre *Linaria* cinsinin sistematik hiyerarşisi şu şekildedir :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Division	: Magnoliophyta Cronquist, Takht. & Zimmerm. ex Reveal
Class	: Magnoliopsida Brongn.
Subclass	: Asteridae Takht.
Order	: Scrophulariales Lindl.
Family	: Plantaginaceae Lindl.
Species	: <i>Linaria genistifolia</i> (Linnaeus) Miller
Subspecies	: <i>Linaria genistifolia</i> (Linnaeus) Miller subsp. <i>genistifolia</i>



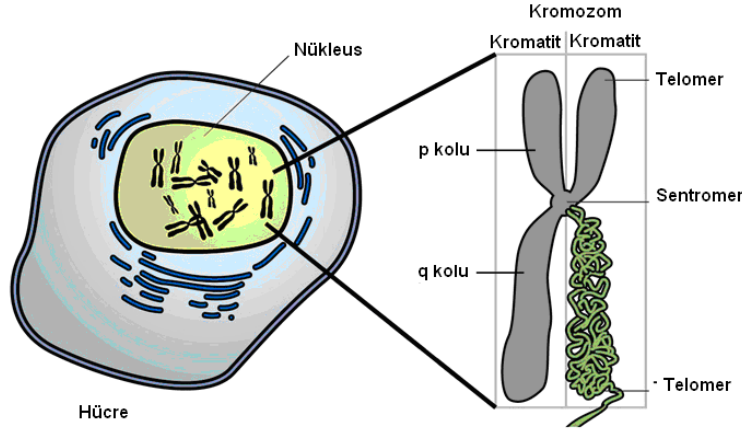
Şekil 2.1. *Linaria genistifolia* (Linnaeus) Miller subsp. *genistifolia*

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Kromozom Yapısı

Yunanca kökenli olup *chromos* = renk ve *soma* = vücut kelimelerinin birleşmesinden oluşmaktadır. Her canlı gibi insan da trilyonlarca hücreden meydana gelir. Hücre, bitkisel ya da hayvansal her türlü yaşam biçiminin en küçük birimidir. Çekirdeğin içinde ise kromozom adı verilen ipliksi parçalar bulunur. İnterfaz evresinde kromatin ağı şeklinde bulunan DNA, mitoz bölünmenin profaz evresinde kısalıp kalınlaşmaya başlar ve metafaz evresinde en kısa duruma gelir. Yaklaşık 10.000 kat kısalmış haliyle ışık mikroskopunda 100'lük objektifte incelenebilir. Kromozomlar, İ, V, J harfleri gibi biçimlerde görünür ve boyutları mikronla ölçülür. Kromozomların sayısı canlı türlerde değişiklik gösterir. Örneğin sirke sineğinde 8, kurbağada 26, farede 42, köpekte 78 kromozom vardır. İnsanın kromozom sayısı ise 46'dır.

Kromozomlar, moleköl yapıları çok iyi bilinen DNA zinciri ile histon denilen protein zincirinden oluşur. DNA zincirleri de özgül proteinleri sentezlemekle görevli gen adı verilen birimlerden oluşur. Kromozonlar aralarında açığı bulunan iki koldan oluşur. Kollar primer boğumla birbirinden ayrılmıştır, bu boğuma sentromer adı verilir. Sentromerler kromozomların iş ipliğine takılmasını sağlarlar. Sentromeri olmayan bir kromozom bölünmeye katılamaz. Kromozom üzerinde primer boğumlardan başka, sekonder boğumlarda bulunabilir. Bazen kromozomun uç kısmını da uydu "satellit" denilen yuvarlak ya da uzunca bir yapı bulunur, kromozomların uçlarına telomer adı verilir. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi özel boyama teknikleriyle bir kromozom üzerinde açık ve koyu bantlar şeklinde görülen kromatin kısımları saptanır. Açık bantlar az yoğunlaşmış bölgelerdir ve eukromotik bölgeler adını alır. Koyu bantlar ise çok yoğunlaşmış bölgelerdir ve heterokromatik bölgeler olarak adlandırılır (Klug and Cummings 2002).



Şekil 3.1. Kromozomun yapısı

3.2. Mutasyon

Mutasyon genel anlamda kalıtsal materyaldeki değişimleri ifade eder. Mutasyonlar kendiliğinden meydana gelebildiği gibi fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana getirilebilir. Genelde fenotipte ortaya çıkarlar fakat kendini göstermeyen ve hatta öldürücü etki yapan mutasyonlar da vardır. Eşey hücreleri yani germ hücrelerinde meydana gelirse dölden döle aktarılabilir fakat somatik vücut hücrelerinde meydana gelirse dölden döle aktarılamaz yani kalıtsal bir değişim olmaz. Mutasyonlar çeşitlilik doğal seleksiyona materyal sağlaması ve türlerin evriminde büyük bir öneme sahiptir. Aynı zamanda genetik analizde ve genetik çaprazlamalarda kullanılır.

Mutasyon terimi ilk kez 1901 yılında, Hugo De Vries tarafından *Oenatra lamarckiana* (akşam sefası) ile yaptığı çaprazlamalarda gözlemlediği varyasyonu tanımlamak için kullanılmıştır (Öner 2003).

Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana gelebildiği gibi mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana gelebilirler. Genelde mutasyonun kendiliğinden meydana gelebilme olasılığının çok düşük olmasına karşın mutajenlerin etkisi ile mutasyon frekansı oldukça yükselmektedir. Normal koşullarda

kendiliğinden olan mutasyon frekansı her kuşakta 10^{-5} – 10^{-10} gibi düşüktür. İki ayrı gende aynı anda iki ayrı mutasyonun oluşma olasılığı ise 10^{-10} – 10^{-20} gibi çok daha düşüktür (Oraler 1990).

Mutasyon vücut hücrelerinde ya da üreme hücrelerinde olabilir. Vücut hücrelerinde olan mutasyonlara somatik mutasyonlar denir ve bu mutasyonlar hastalıklara ve dejenerasyonlara yol açarak gelişmeyi ve metabolizmayı olumsuz olarak etkileyebilirler. Üreme hücrelerinde görülen mutasyonlara ise germinal mutasyonlar denir. Üreme hücrelerinin DNA'sında görülen değişimler genetik içeriğin farklılığına yol açar ve bu mutasyon kalıtsal olarak yeni nesillere aktarılır.

Bir sınıflama kolaylığı sağlamak üzere mutasyonlar kromozomların sayı veya yapılarındaki değişiklikler ile sitolojik olarak kromozom düzeyinde gözlenemeyen ancak bireyin fenotipindeki farklılıkla saptanabilen gen mutasyonları olarak gruplandırılabilirler (Oraler 1990).

3.2.1. Kromozom Mutasyonları

Kromozomun büyük parçalarını ilgilendiren mutasyonlara kromozom mutasyonları denir. Kromozom mutasyonları, kromozom sayısı değişimleri ve kromozom yapısı değişimleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

3.2.1.1. Kromozom Sayısı Değişimleri

Organizmaların kromozom sayıları cinsten cinse hatta türden türe değişkenlik gösterir ama her tür için sabittir. Bir bireyin her hücresi onun ait olduğu türe özgü sayıda kromozom taşır. Kromozomlar mitoz ve mayoz bölünme sırasında bazen düzenli olarak ayrılmaz ve sonuçta kromozom sayısı bakımından farklı hücreler meydana gelir. Organizmaların hem doğal hem de laboratuvar popülasyonlarında kendiliğinden meydana gelen kromozom sayısındaki değişimlerdir. Ayrıca izole edilmiş hücre ya da dokulara çeşitli mutajenik maddelerin uygulanmasıyla da bu mutasyonlar meydana getirilmektedir (Demirsoy 1991). Bu mutasyonlar öploid ve anöploid olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

Öploid

Bu tip mutasyonlar bir bireyin bütün hücreleri ya gametlerdeki kadar yani n sayıda kromozoma sahiptir buna monoploid denir. Yahutta n ' in katları halinde $2n$, $3n$, $5n$ gibi kromozoma sahiptir buna da poliploid denir.

Temel kromozom sayısı kadar kromozom içeren bireyler monoploid (n), üç katı içeren bireyler triploid ($3n$), dört katı içeren bireyler tetraploid ($4n$) olarak adlandırılır. Öploidide temel kusur, hücrede çekirdek bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesinin olmamasıdır (endomitoz). Endomitoz durumunda kromozomlar katı kadar çoğalır fakat mitoz bölünmenin ilk iki evresi (profaz ve metafaz) gerçekleştiği halde anafaz ve telofaz safhası olmaz hücre ve sitoplazma bölünmesi (sitokinez) olmaz. Bunun sonucunda kromozom sayıları her bölünmede katı kadar artmış olur (Başaran vd. 1995).

Anöploid

Bir takımdaki kromozomların birinin ya da birden fazlasının sayısını değiştirmesi olayıdır. Normalde mayoz bölünme sırasında homolog çiftin biri bir kutba diğeri karşıt gruba gider. Fakat bazen bir kromozom bir kutba homoloğu ile birlikte çekilerek aynı gamette yer alırlar. Bu olaya mayotik non-disjunction (homolog kromozom çiftlerinin segragasyon sırasında ayrılmaması) denilir. Ayrılmama ya birinci ya da ikinci mayotik bölünme sırasında ortaya çıkabilir.

Anöploid bir fert, anöploid yani normal haploid sayıdan daha fazla veya eksik sayıda kromozom içeren gametlerin ürünüdür. Anöploid başlıca üç kısma ayrılır. Bunlardan ilki monosomi olup diploid bir fertle tek bir kromozom eksik olması olayıdır. İkincisi ise nullisomidir ki bu da bir canlıda bir kromozomun homoloğu ile beraber eksik olması olayıdır. Son olarak da pollisomi olarak bilinen bir takımda bulunan kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısını yükseltmesi olayıdır.

3.2.1.2. Kromozom Yapı Değişimleri

Genetik bilgide değişimlere yol açan olaylar kromozomların yapılarındaki değişimler sonucunda da meydana gelebilirler. Bu olaylarda kromozom sayısı aynı kalır fakat kromozomlarda bazı parçaların kaybolması, fazlalaşması veya yer değiştirmesi yoluyla kalıtsal materyal değişime uğrar (Oraller 1990). Kromozomlar kendiliğinden kırılabilir ancak kimyasallara ya da radyasyona maruz kalan hücrelerde kromozomların kırılma oranı daha yüksektir. Kromozom mutasyonları dört grup halinde toplanır (Öner 2003).

Delesyon

Delesyon, DNA yapısından bir ya da daha fazla nükleotidin ayrıldığı mutasyonlara verilen addır. Delesyonlar, kromozomların uç kısmından (terminal delesyon = defisiyans) ya da iç kısmından olabilir. Kopan parça eğer sentromer taşımıyorsa yani asentrik ise mayoz ve mitoz bölünmelerdeki kromozomların kutuplara gitmesini sağlayan sentromer olmadığı için kromozomlar kutuplara ulaşmazlar. İçten eksiklik durumunda kromozom iki noktasından kırılır ve kırılan parça ayrılıp serbest uçlar birbirine bağlanır. Kromozomun sarmal yapısından dolayı oluşan halka kopmaları da bu gruba girer. Uçtan kopmalarda ise tek noktadan kırılma olur.

Duplikasyon

Duplikasyon, bir kromozomun bir parçasının o kromozom üzerinde iki veya daha fazla sayıda tekrarla görülmesi şeklindeki kromozom anomalisidir. Yani kromozomun bir kısmının kendi kendini eşlemesi olarak da tanımlanabilir.

Duplikasyonlu bir parça sentromerli serbest bir parça veya tamamlayıcı bir kromozom parçası olabilir. Eğer sentromere sahip yani sentrik bir kromozom parçası ise bu parça küçük, ekstra bir kromozom olarak kabul edilir.

Bir kromozom parça değişimi sırasında karşısındakine belirli genleri vermez, sadece alırsa o gen bakımından diploid olur. Bu çoğunlukla düzenli işlemeyen bir krossingoverde meydana gelir. Normal olarak mayozun ilk evrelerinde eş genler sinapsis yapar. Ayrılırken normal bir bölünme olmazsa kromatidlerden biri o gen bakımından diploid olur diğeri ise o genlerden yoksun kalır.

Duplikasyonun değişik özelliği bulunur. Birincisi, duplikasyon geninin birden fazla kopyasının bulunmasını sağlayabilir. İkincisi, delesyonlarda olduğu gibi, duplikasyon sonucu fenotipik çeşitlilik oluşabilir (ner 2003).

İnversiyon

İnversiyon, bir kromozomun iki defa kırılması ve kopan parçanın 180° ters dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması şeklidir (ner 2003, Falakalı 1993). İnversiyona uğramış kromozomlar normal homologları ile sinapsisle teşkil ederken düzensizliklerinin ortaya çıkmasına nedendir. Çünkü böyle heterozigotik homologlarda allel genler nokta nokta karşılıklı gelmek isteyeceklerdir. Kırılmadan önce kromozomda halkaya benzer bir yapı oluşur. Kırılmayla ortaya çıkan yapışkan uçlar birbirine yaklaşır ve tekrar birleşir. Bu durumda gen sayısı ve özelliği aynı olmasına rağmen diziliş sırası değişir. Ters çevrilen parça eğer sentromer içeriyorsa inversiyon perisentrik, içermiyorsa parasentrik inversiyon olarak isimlendirilir. Parasentrik inversiyonda, gen dizilişi ters çevrildiği halde sentromerden uzanan kolların boy oranı değişmezken perisentrik inversiyonda değişir (ner 2003).

Translokasyon

Translokasyon, bir kromozomun kaybolan parçasının ya da kopan bir parçasının başka bir kromozoma yapışması şeklinde görülen kromozom anomalilerindendir.

Translokasyonlar, her zaman homolog olmayan parça değişimleridir. Gen sayısının ve niteliğinin aynı kaldığı translokasyonlara dengeli translokasyonlar denir. Gen sayısının ve niteliğin değiştiği, çoğunlukla anomalilere neden olan translokasyonlara dengesiz translokasyonlar denir.

3.2.2. Gen Mutasyonları

Genetik materyalin DNA replikasyon sürecinin mükemmel işleyişinden dolayı hücreden hücreye ve nesilden nesile değişmeden aktarıldığı bilinmektedir. Bu genellemeye rağmen genetik materyal bazı yollarla değişebilmektedir. Bu yollardan ön önemlileri kendi kendine değişme, replikasyon hataları, bazı kimyasallar ve radyasyondur. Geniş anlamda iki tip genetik materyal değişimi mümkündür: bütün bir kromozomla ilgili değişimler ve bir veya birkaç baz çiftinin değişmesidir. Bütün organizmalar baz çifti değişikliklerini tamir eden mekanizmalara sahiptirler. Fakat bütün baz çifti değişimleri her zaman tamir edilememektedir. Tamir edilemeyen değişiklikler baz çifti mutasyonları olarak adlandırılır. Baz çifti mutasyonları bir organizmanın genomunun herhangi bir yerinde meydana gelebilir. Organizmaların genomlarının bütün bölgeleri genlere taşımadığından genlerde veya kontrol bölgelerinde meydana gelmedikçe baz çifti mutasyonları belli bir fenotipik değişikliğe neden olmaz. Dolayısıyla genetikçiler için önemli olan mutasyon, genler: etkileyen mutasyonlardır ve gen mutasyonları olarak adlandırılır. Bununda ötesinde hücresel fonksiyon, proteinlerin bir sonucu olduğu için protein kodlayan genlerin ekspresyonunu etkileyen mutasyonlara daha fazla ilgi duyulmuştur.

Mutasyon DNA baz çifti değişimi veya kromozomal değişimlerdir. Baz dizisi değişimleri baz çifti eklenmesi, silinmesi, baz çifti değişimi, bir baz çifti veya belli bir grup baz çiftinin ters dönüşü veya yeni bir pozisyona transferini içerebilir. Çok hücreli organizmalarda mutasyon eğer somatik hücrelerde meydana geldiyse sadece ilgili bireyin ilgili hücrelerini ve dokusunu etkiler yani yeni nesillere aktarılmaz. Bu tip mutasyonlar somatik mutasyonlar olarak adlandırılır. Eğer mutasyon eşeyli üreyen organizmaların eşey hücrelerinde meydana geldi ise gametler aracılığıyla yeni nesillere aktarılır. Bu tip mutasyonlar eşey hücresi mutasyonları olarak adlandırılır. Somatik mutasyonlar, mutasyonun meydana geldiği bireyi etkiliyorken eşey hücresi mutasyonları gelecek nesilleri etkiler. Eşaysız üreyen çok hücreli organizmalarda somatik mutasyonlar yeni hücelere aktarılabilir. Prokaryotlarda ise vücut-eşey hücresi gibi bir ayırım olmadığından bütün mutasyonlar yeni hücelere yani nesillere aktarılmaktadır. Bir kromozomun organizasyonundaki bir değişiklik kromozom

mutasyonu veya kromozom kusuru olarak adlandırılır. Bir gen dizisi içindeki mutasyon ise gen mutasyonu olarak adlandırılır. Gen mutasyonlarına baz çifti değişimi bir veya daha fazla baz çiftinin eklenmesi veya silinmesi gibi DNA dizisindeki değişiklikler neden olur. Mutasyonlar doğal olarak kendiliğinden meydana gelebilir. Mutajenler uygulanarak mutasyonların uyarılması da mümkündür. Bir mutajen kendiliğinden oluşan mutasyon oranının üzerinde bir mutasyon sıklığını oluşturan fiziksel ve kimyasal ajanlardır. Mutajenlerin uygulanmasıyla oluşan mutasyonlara uyarılmış mutasyon denir. Doğal olarak oluşan mutasyonlarda kendiliğinden mutasyonlar olarak adlandırılır. Uyarılmış ve kendiliğinden mutasyonlar arasında kesin bir sınır oluşturmak mümkün değildir. Bir polipeptitin dördüncü yapısı birincil amino asit dizisi tarafından belirlenir. Bir mutant suş tarafından sentezlenen bir polipeptip yabancı tip polipeptitten yapısal olarak farklı olabilir. Eğer farklı ise mutant polipeptit kısmen-fonksiyonel olabilir, fonksiyonsuz olabilir veya hiç üretilmez .

Kromozom mutasyonlarında birden fazla gen söz konusu iken, gen mutasyonlarında değişiklik bir gen ile sınırlıdır. Genetik materyale etkilerine göre gen mutasyonları çeşitli alt sınıflara ayrılır (Ateş 2002).

Transisyon (Geçiş)

Bir baz çiftinin başka bir baz çiftine değişmesidir. En çok rastlanılan mutasyon tipidir. Bu değişimde, bir pürin bazının yerine başka bir pürin bazı (A'nın yerine G, G'nin yerine A), bir pirimidin bazı yerine başka bir pirimidin bazı (T'nin yerine C, C'nin yerine T) geçer (Ateş 2002, Falakalı 1993).

Transversiyon (Çapraz geçiş)

Transversiyonda bir pürin bazı ile bir pirimidin bazı veya bir pirimidin bazı ile bir pürin bazı (A veya G yerine T veya C'nin geçmesi ya da bunun tersi) birbirlerinin yerine geçer (Ateş 2002, Bahçeci 2002).

Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları

DNA molekülüne fazladan bir veya daha fazla baz çiftinin girmesi ya da çıkmasıyla oluşan mutasyonlara çerçeve kayması mutasyonları ismi verilir. Bu mutasyonlarda bir veya daha fazla baz çiftinin ilavesine insersiyon, ayrılmasına ise delesyon ismi verilir. Bu durum ise okunan çerçevenin translasyonunu değiştirir. Böylece translasyon sırasında tRNA'ların tanıdığı üçlü baz dizileri değişir. Çerçeve kayması mutasyonları, replikasyon, onarım veya rekombinasyon sırasında DNA'da oluşan boşluklarda ortaya çıkar. Bu işlemler sırasında, bir zincirin diğerine göre kayması ve uygun olmayan bir tarzda baz eşleşme olasılığı vardır (Bahçeci 2002, Ateş 2002).

3.3. Mutajenler

Mutasyona neden olan ajanlara mutajen denir. Bunlar DNA'da değişimlere yol açarlar. Tüm canlı organizmalarda, pek az istisna ile genetik materyalin DNA olması nedeniyle herhangi bir organizma mutajenler için indikatör bir sistem olarak kullanılabilir. Kansere neden olan ajanlar kanserojen olarak ifade edilir ve bunlar da mutajendir (Ames 1971). Kanserojenlerin taranmasında mutajenlerin esas alınması iki önemli nedene dayanır. Bunlardan birincisi, genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşudur. İkincisi ise karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur (Ramel and Rannung 1980).

Genel kabul edilen bir görüşe göre, doğrudan veya metabolize edildikten sonra kanserojenik etki gösteren tüm maddelerin aynı zamanda mutajenik etki gösterecekleri yani mutajen olabilecekleri vurgulanmaktadır. Bunun aksi, yani tüm mutajenik maddelerin kanserojenik etki göstermeleri beklentisi ise bazı durumlarda gerçekleşmemektedir. Bunun nedeni, mutasyonun genetik materyalin doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkabilmesine rağmen kanserin çok basamaklı karmaşık bir biyolojik olaylar sonucu ortaya çıkması olabilir.

McCann ve arkadaşları (1976), karsinojen olan ve olmayan 300 kimyasalı, *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile taradıklarında 175 karsinojen maddenin 157 tanesinin mutajenik etkili, karsinojenik etki göstermeyen 108 maddenin 94 tanesinin mutajenik etkili olmadığını saptamışlardır.

3.4. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu

Genel olarak metabolizma hayatın devamı için gerekli olan organizmada oluşan tüm kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir. Diğer taraftan bir organizma için yabancı olan kimyasal maddelerin (ksenobiyotiklerin) kimyasal değişimleri de metabolizma olarak tanımlanırsa da biyotransformasyon bu anlamda daha uygun bir terim olmaktadır.

İnsanlar, ilaçlar, gıdalardaki katkı maddeleri veya çevre kirliliğine neden olan maddeler gibi, giderek artan bir biçimde çeşitli yabancı kimyasal maddelerin etkileri altında kalmaktadırlar. Çeşitli yollarla organizmaya giren kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkisiyle kimyasal reaksiyonlara girerler ve böylece metabolitlere dönüşürler. Pestisitler, ilaçlar, kozmetikler, yiyecek prezervatifleri gibi vücuda yabancı olan maddeler uyarılabilen izozimlerden oluşan detoksifikasyon enzim gruplarının metabolize edilirler.

Genellikle lipid çözüner olan bu yabancı maddeleri metabolize etmedeki amaç onları daha polar yaparak suda çözüner hale getirmek ve bu şekilde vücut dışına atılmalarını sağlamaktır (Vural 1984, Bağcı 1985).

Mikrobiyal mutajenite çalışmalarından elde edilen verilerin insanlara uygulanmasındaki zorluklardan en önemlisi, yabancı bir kimyasal maddenin insanda geçirdiği metabolik reaksiyonlardır. Bu metabolik yolların bilinmesi, memelilerde enzimatik reaksiyonlarla metabolik dönüşümlere uğrayan kimyasal maddelerin potansiyel aktivitelerinin tayininde kullanılabilecek, uygun *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerin geliştirilmesine olanak vermiştir. Birçok çevre kirleticisi kendileri mutajen

olmadıkları halde memelilerin metabolizmasında karışık fonksiyonlu oksidaz sisteminin etkisi altında aktif metabolitlere dönüşebilmektedir

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu genellikle kompleks enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimlerin önemli bir kısmı karaciğerlerde yerleşmiştir. Bu nedenle karaciğerin kan dolaşımı ile karaciğere gelen kimyasal maddeleri, depolanma, dağılım ve safra ile atılımlarından önce metabolize etme kapasitesi çok etkindir. Karaciğerdeki mikrozomal enzimler toksik maddelerin metabolizmasında önemli rol oynarlar. Mikrozomal enzimlerin yaptığı oksidasyon olayında P-450 sitokromuna bağlı değişik etkili oksidazlar (monooksijenazlar) rol oynar. Ayrıca biyotransformasyon barsak, böbrek, akciğer, beyin ve deride de olabilir (Vural 1996, Dökmeci 1994).

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyon mekanizmalarında iki enzim grubu yer almaktadır. Bu reaksiyonlar Şekil 3.2’de gösterilmiştir

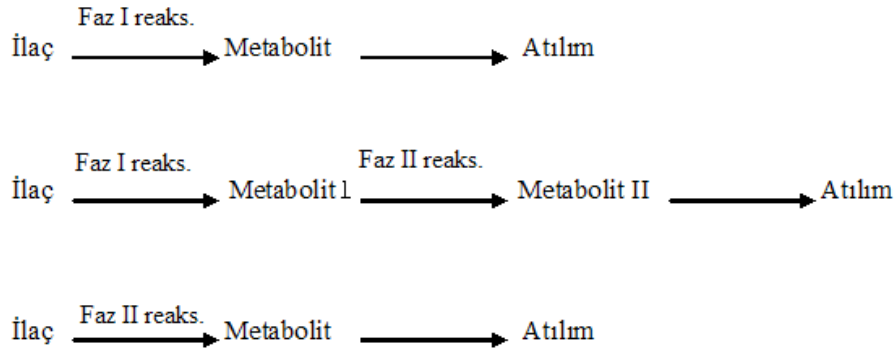
1- Faz I enzimleri: Faz I reaksiyonları yükseltgenme (oksidasyon), indirgenme (redüksiyon) ve hidroliz olaylarını içerir. Faz I’de lipid de çözünen ksenobiyotikler daha polar moleküller haline geçerler. Faz I boyunca hidroksil gibi bir veya daha fazla polar grup, hidrofobik moleküller ortaya çıkar. Faz I reaksiyonları ile bileşikler, Faz II için uygun hale gelir ve yeterli derecede polar olan ürünler kolayca hücre ve vücuttan çıkarılır (Vural 1984, Singer et al. 1994).

2- Faz II enzimleri: Faz II reaksiyonları çeşitli konjugasyon veya sentez olaylarını içerir. Faz II’de endojen maddelerle birleşen polar metabolitler inaktif olarak eliminasyona uğrarlar (Vural 1984, Singer et al. 1994).

Faz I reaksiyonlarının önemli bir kısmı, normal metabolizmanın spesifik enzimlerinden farklı mikrozomal enzimler tarafından katalizlenir (Vural 1984).

Yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyon mekanizmalarından özellikle Faz I reaksiyonlarının önemli bir kısmı, normal metabolizmanın spesifik enzimlerinden farklı mikrozomal enzimler tarafından katalizlenir. Faz I reaksiyonlarını katalizleyen bu enzimler birçok hücrenin sitoplazmasında ağ şeklinde olan endoplazmik retikulumunda yerleşmişlerdir. Bu nedenle bu enzimler membrana bağlı enzimlerdir. Endoplazmik

retikulum bir membran olup lipid ve proteinlerden oluşmuştur. İşte bu lipoprotein matriksi içinde yer alan mikrozomal enzimler ancak lipid membranlara geçebilen lipofilik ksenobiyotikleri biyotransformasyona uğratırlar (Vural 1996).



Şekil 3.2. Faz-I ve Faz-II biyotransformasyon reaksiyonları

Faz I metabolizması büyük ölçüde P-450-enzimleri ile gerçekleşir. Bunlar "heme" içeren proteinlerdir ve birincil olarak karaciğerde bulunurlar (Yüksel 1999). Bu pigmentlere P-450 adı, 450 nm'de absorbans gösterdiği için verilmiştir. Spesifik sitokrom P-450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorbans veren dalga boylarına sahiptir (Özerol 1996).

P-450 enzim sistemi; dışarıdan alınan ilaçlar, kimyasal maddeler, insektisitler, petrol ürünleri vb. maddeleri metabolize eden sistemdir. Birçoğunun da bilinmediği sanılmaktadır. Örneğin; tüm canlılarda 1992'de 221 tane P-450 geni tanımlanmışken bu rakam 1995'te 481 olmuştur. İnsanda 1998'e dek saptanan gen sayısı 50'nin altındadır. Bunların hepsi ilaç metabolizmasına katılmamaktadır. Bu enzimler hepatositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar (Yüksel 1999).

3.5 Mutajenik Çalışmalarda Bitki Test Sistemlerinin Kullanılması

Bitkiler kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin belirlenmesinde çok uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Modern genetiğin birçok temel kavramı yüksek yapılı

bitkilerle yapılan çalışmalar sonucu elde edilmiştir ve mutasyon terimi ilk defa Hugo de Vries tarafından 1909 yılında *Oenothera lamarckiana* bitkisinde meydana gelen kalıtsal değişiklikleri tanımlamak için kullanılmıştır.

Mutajenite çalışmalarında bitkilerin kullanımı ilk defa Levan (1938) tarafından kolşisinin *A. cepa* kök hücrelerinde iğ ipliklerinin dağılmasına ve poliploidiye yol açtığını göstermesiyle başlamıştır. Bu test sistemine ek olarak kimyasalların kromozomlar üzerindeki etkisi araştırmak için *Vicia faba* (Amer and Ali 1983), *Tradescantia paludosa* (Dryanosvka 1987), *Hordeum vulgare* (Kluge and Podlesak 1985), *Pisum sativum* (Amer et al. 1999) ve *Crepis capillaris* (Dimitrov 1994) gibi pek çok bitki türü yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bakteriler, düşük yapılı bitkiler, böcekler ve memeli hücrelerinde yapılan mutajenite çalışmalarının artmasıyla birlikte kimyasalların muhtemel mutajenik etkilerinin çalışılmasında yüksek yapılı bitki test sistemlerinin kullanılmasına olan ilgi de azalmaya başlamakla birlikte günümüzde halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü yüksek yapılı bitkilerde; kromozomlar kolay gözlemlenir, kromozom analizleri basittir, maliyetleri oldukça ucuzdur, çok fazla kök ucu oluşur ve bu kök uçları test maddeleri ile direkt etkileşim halinde bulunmaktadır (Fiskesjö 1985, Grant 1992).

Yabancı bileşiklerin moleküler düzeyde metabolizma üzerindeki etkilerinin henüz tam bilinmemesinden dolayı elde edilen sonuçların memeli test sistemleriyle değerlendirilmesi zordur. Bununla birlikte, bitki test sistemlerinin kullanımında aşılması gereken bazı zorluklar da vardır. Bilindiği gibi bitki ve hayvan hücreleri arasında temel yapısal farklılıklar vardır. Bitkilerdeki sıkı hücre duvarı belirli kimyasalların hücre içerisine girmesini etkilemekte ve bunun sonucunda memeli ve bitki hücreleri arasında etkiler bakımından farklılıklar olabilmektedir. Bunlara rağmen bitki ve hayvan hücrelerinde DNA yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik göstermektedir ve protein sentezi de aynıdır.

Kimyasal maddelerin mutajenitesinin çalışılmasında çok sayıda yüksek yapılı bitki türü kullanılmaktadır. Mitotik kromozom değişimleri arpa, fasulye ve soğan gibi

bitkilerin kök uçlarındaki somatik hücrelerde ve polen tüplerinde kolaylıkla gözlemlenmektedir. Birçok türde bulunan polen ana hücresi gibi mayotik hücreler kimyasal olarak indüklenen kromozom aberasyonlarını belirlemek için uygundur. Spesifik lokuslarda meydana gelen gen mutasyonları mısır ve soya fasulyesinde, multilokus mutasyonları ise arpa ve mısırdan incelenmektedir. Kromozom sistemleri kromozom hasar yapısının, kromozom ayrılmalarının ve genel mitoz olaylarının incelenmesine imkan vermektedir. Bitki kromozomları morfolojik olarak memeli ve diğer ökaryotlarla benzerlik göstermekte ve mutajenlere karşı cevapları da benzerdir.

Constantin ve Owens (1982) US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program bünyesinde yapmış oldukları çalışmada, çeşitli kimyasal sınıftaki 350 bileşiğin bitkilerdeki mutajenik aktivitesini araştırmışlar ve diğer test sistemleriyle karşılaştırmışlardır. Bitki ve memeli kültür hücrelerinde yapılan deneyler sonucunda elde edilen verilerin bakteri ve *Drosophila* ile yapılan deneylerle elde edilen sonuçlarla korelasyon gösterdiklerini iddia etmişlerdir. Bitki kök uçlarındaki pestisitlerin deney sonuçları ile memeli hücrelerindeki kromozom aberasyonları büyük bir oranda benzerlik göstermiştir. Buna rağmen bazı pestisitlerin neden olduğu kromozom hasarları memeli hücreleriyle yapılan deneylerle elde edilen sonuçlarla uyum sağlamadığını belirtmişlerdir.

3.6. Ames/Salmonella / Mikrozom Test Sistemi

Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri bilinmeyen sayıları milyonları bulunan sentetik ve doğal maddelerin kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmeleri sağlığımız açısından gerekmektedir (Bağcı 1989).

Bir maddenin kanserojenik potansiyeli, deney hayvanlarıyla veya insanlarla yapılan uzun zamanlı testlerle veya epidemiyolojik çalışmalarla ölçülmektedir. Uzun zamanlı testler, uygun hayvan türleri seçilerek maddelerin uygulanmasını takiben

yapılan otopside patolojik ve histolojik çalışmalarla ölçülmektedir (Forman and Ames 1991, Bağcı 1989).

Bruce Ames tarafından geliştirilen *S. typhimurium* mikrozomal test sistemi, mutajen ve kanserojen maddelerin tespitinde kullanıldığı gibi, başta antioksidanlar olmak üzere çeşitli antimutajenik ve antikanserojenik etkileri olan inhibitör maddelerin de belirlenebildiği ve etkilerinin izlenebildiği çok önemli kısa zamanlı test sistemlerinden biridir (Kalaycıoğlu ve Öner 1994).

Bu test sisteminde, *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş bir seri *S. typhimurium* mutant suşları kullanılmaktadır (Maron and Ames 1983).

Ames testi genotoksik araştırmalarda hala geniş bir kullanım alanına sahip olan bakteriyel mutajenite testidir (Joseph et al. 1977). Bu testte kısaca test edilen kimyasal maddenin *S. typhimurium* his⁻ (histidin sentezleyemeyen histidin oksotrofu) mutantlarını, his⁺ (yabanıl tip, prototrof) haline çevirme gücü ölçülmektedir.

Ames testinde, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenitesinin belirlenebilmesi için histidine ihtiyaç duyan suşlar kullanılmaktadır. Genel mutajenite testleri için en çok kullanılan test suşları TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 ve TA 1538'dir. Her bir test suşu histidin operonunda değişik tipte mutasyonlar içermektedir (Maron and Ames 1983). Ames testinde kullanılan suşlar ve onların genetik özellikleri Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Histidin Mutasyonu

Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar, ya DNA'daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri ya da bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır (Ames et al. 1973).

S. typhimurium TA 100 ve TA 1535 suşlarında bulunan His G46 mutasyonu, histidin biyosentezinin ilk enzimini kodlayan hisG geni üzerindedir. Bu mutasyon, histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende lösin kodonu ^{-GAG-}~~-CTC-~~ yerine prolin kodonunun ^{-GGG-}~~-CCC-~~ gelmesine yol açar.

His D3052 mutasyonu, *S. typhimurium* TA 1538 ve *S. typhimurium* TA 98 suşlarında bulunur. His D⁺ geni histidinol dehidrogenaz enzimini kodlar. His D3052 mutasyonu (-1) çerçeve kayması şeklinde bir mutasyondur ve nükleotid eksikliği his D⁻ geni içinde 8 defa tekrarlanan ^{-GCGCGCGC-}~~-CGCGCGCG-~~ bölgesindedir. Bu nedenle bu suş daha çok çerçeve kayması tipi mutasyonlara neden olan mutajenik/kanserojenik kimyasallar ile his⁺ hale dönüşmektedir.

Rfa Mutasyonu

Bu mutasyon, bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit (LPS) tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir. Bu engelin kalkması, yani LPS kusurları mutajenin bakteri içerisine girmesini kolaylaştırarak, hücrenin daha duyarlı olmasına yol açmaktadır. Rfa mutantları, polisakkaritlerin sentezinden sorumlu bir enzim bakımından kusurludurlar. Bu nedenle de büyük moleküllere karşı duyarlıdırlar. *S. typhimurium*'un his⁻ ve onarım sistemlerinde mutasyon taşıyan test suşlarından, LPS kusurlu türevler elde edilmiş bu şekilde de sistemin mutajenlere duyarlılığı arttırılmıştır (Ames *et al.* 1973).

uvrB Mutasyonu

DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan *uvrB* genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. *uvrB* mutasyonu, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak, teknik nedenlerden dolayı *uvrB* geninin kesilerek uzaklaştırılması sırasında bu delesyon biotin genine kadar uzanmaktadır. Biotin geni ise vitamin H denilen biotin sentezinden sorumludur. Bu nedenle bakteriler üreyebilmeleri için histidinin yanında biotine de gereksinim duyarlar (Ames *et al.* 1973).

Çizelge 3.3. *S. typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri (Öksüzoğlu1997).

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA 1535	His G46	Rfa	$\Delta uvrB$	-	AT→GC transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA 1537	His C3076	Rfa	$\Delta uvrB$	-	C.....C yanına +1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 1538	His D3052	Rfa	$\Delta uvrB$	-	CG.....CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 98	His D3052	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 100	His G46	Rfa	$\Delta uvrB$	+	AT→CG transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA 97	His D6610	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CCC yanına +4	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 102	PAQ1 His G428 Δ his	Rfa	$\Delta uvrB$	-	G Ochre AT	Oksidantlar, X-ışınları, U.V., mitomisin C, bleomisin, H O ve kinonlar...

R-faktörü

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. typhimurium* TA 1538 ve TA 1535 suşlarına, ampiciline dirençlilik geni taşıyan pKM 101 R faktörü plazmidin eklenmesiyle *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları elde edilmiştir (Ames *et al.* 1973). Plazmid içeren suşların, mutajenik olduğu gösterilmiş ajanlara karşı cevapları, plazmid içermeyen suşlara göre oldukça yükselmiştir. Plazmid içeren yeni suşlar, orjinal suşlarla zayıf ya da mutajen olmayan ajanlara karşı net bir pozitif cevap

vermişlerdir. pkM 101 plazmidi bu suşların daha duyarlı olmasından sorumlu olan hata oranı yüksek onarım sistemi ile bağlantılı gen ürünleri içermektedir (Levin *et al.* 1982).

Bu plazmid, DNA'nın kesme-çıkarma yoluyla onarım mekanizmasının aktivasyonuna ve dolayısıyla spontan mutasyonların ve kimyasalların neden olduğu mutasyonların artmasına neden olur.

Bunların dışında son olarak *Salmonella*/mikrozom test sistemine daha sonra rat karaciğeri 9000xg süpernatantını ve kofaktörleri içeren metabolik aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır. Önceki çalışmalarda mutajenik aktivite göstermeyen birçok prokarsinogenler, test sisteminin metabolik aktivasyonu içeren bu uygulaması ile pozitif sonuç vermişlerdir (Ames *et al.* 1973).

4. MATERYAL ve METOD

4.1. Bitki Ekstraksiyonu Yöntemi

Linaria genistofilia türüne ait örnekler Afyon Şuhut Kasabası Başören Köyü civarlarından Haziran ayında toplanmıştır. Taksonomik tanımlaması yapıldıktan sonra kurumaya bırakılarak Biyoloji Bölümündeki Herbaryumda saklanmıştır. Kurutulmuş ve mikser ile toz haline getirilmiş bitkiden 80 g alınıp 1 litre kaynayan suda 10 dakika bekletilmiştir (Sofowora 1999). Elde edilen özüt 2,5-µm filtre kağıdı (Whatman® no. 42) kullanılarak patiküllerden uzaklaştırıldıktan sonra 4 °C'ye kaldırılmıştır. Hazırlanan bu çözelti stok çözelti olarak kullanılacak ve deney esnasında farklı konsantrasyonlar taze olarak hazırlanmıştır.

4.2 Allium Test

4.2.1 Büyüme Engelleme Testi

Lg-ekstresinin sitogenetik etkilerinin incelenmesinde kullanılacak dozları belirlemek amacıyla önce büyüme engelleme testi yapılmıştır. Bunun için önce EC₅₀ değeri belirlenmiştir. EC₅₀ değerini belirlemek için aynı büyüklükteki soğanlar (3-4 cm çapında) alınarak dış kabukları çıkarılmış ve kök primordialarına zarar vermeyecek şekilde çimlenmiş olan köklerinden temizlenmiştir. *Lg*-ekstresinin 80, 60, 40, 20 ve 10 g/L'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak ise saf su, pozitif kontrol grubu olarakta 10 mg/L MMS (Metilmetan sülsanat) kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon ve kontrol grubunda beşer adet soğan kullanılmıştır. Oda sıcaklığında (~21°C ± 4 °C) dört gün çimlendirilen soğanlardan her bir konsantrasyon ve kontrol grubu için aynı soğan yumrusundan en iyi filizlenmiş onar adet kök alınarak ortalama kök uzunlukları bulunmuştur. Bu süre zarfında çimlenen soğanların bulunduğu ortamdaki çözeltiler azaldıkça gerekli ilaveler yapılmıştır.

EC₅₀ değerini belirlemek için kök uçlarının büyümesini negatif kontrol grubuna göre % 50 azaltan doz esas alınmıştır. Uygulama dozlarının belirlenmesinde 2xEC₅₀,

EC₅₀, 1/2xEC₅₀ değerleri kullanılmıştır. Buna bağlı olarak *Lg*-ekstresinin 30, 15, 7,5 g/L'lik dozları kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak saf su, pozitif kontrol grubu için 10 mg/L MMS kullanılmıştır. *A. cepa*'nın hücre döngüsü 24 saat olduğu için uygulama süresi 12, 24, 48, 72 ve 96 saat olarak belirlenmiştir.

A. cepa kök uçlarına *Lg*-ekstresinin yukarıda verilen konsantrasyonlarını belirlenen srelerde uygulamak için, her bir konsantrasyon için beşer soğan 1 gün boyunca saf suda çimlenmeye bırakılmıştır. En iyi köklenen 5 tane soğan her bir konsantrasyon için kullanılıp ve hergün verilecek konsantrasyonlar değiştirilmiştir. Bütün kök uçları aynı gün sabah saat 9⁰⁰'da alınmıştır.

Bütün uygulamalardan sonra alınan kök uçları ayrı ayrı tüplere alınarak abslt alkol: glacial asetik asit (3:1) fiksatif içerisinde buzdolabında +4  C'de 1 geçe bekletilerek tespit edilmiştir. Daha sonra kök uçları % 70'lik alkol içerisine alınarak +4  C'de buzdolabında depolanmıştır. Mitotik indeks ve mitoz bölünmedeki anormalliklerin belirlenmesinde bu kök uçları kullanılmıştır.

Mitotik anormalliklerin, mitotik indeks (mitotik hücre sayısı/sayılan toplam hücre sayısı X 100) ve faz frekanslarının belirlenmesi için her dozun uygulama süreleri için farklı soğanlardan beşer kök ucu alınarak ezme preparatlar hazırlanmıştır. Mitotik anormalliklerin belirlenmesinde her bir konsantrasyon için 100 anafaz-telofaz hücresi, mitotik indeks ve faz frekanslarının hesaplanmasında 5000-6000 hücre sayılarak ve sonuçların değerlendirilmesi SPSS 15,0 for Windows paket programında Duncan testi ile kullanılarak yapılmıştır.

4.2.2 Feulgen Boyasının Hazırlanışı

Preparatların hazırlanmasında feulgen boyası kullanılmıştır. Feulgen çok fazla kullanma yeri olan bir boyadır. Kromozom morfolojisi ve sayımı için kök uçlarında, embriyonik yaprak ve tomurcuklardaki bitki dokularında elverişli bir şekilde kullanılır. Feulgen boyası aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

1. 1 g kristal haldeki fuksin bazik alınarak 8 cm çapında bir saat camı içerisinde ezilmiştir.
2. 500 cm³'lük bir erlenmayerde, ezilerek toz haline getirilmiş fuksin bazik kabın etrafına bulaştırılmadan konulmuştur.
3. Başka bir erlenmayerde 200 cm³ distile su kaynatılmıştır.
4. Toz halindeki fuksin bazik üzerine kaynatılmış distile su yavaş yavaş dökülerek bir cam çubuk yardımı ile sürekli karıştırılmıştır.
5. Boya 50 °C'ye düşürülünceye kadar karıştırılmaya devam edilmiştir.
6. Boyaya 20 cm³ HCl ilave edilerek filtre kağıdı yardımı ile süzölmüştür.
7. Süzölen boyaya 2 g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_3$) eklenerek 2 dakika süresince karıştırılmaya devam edilmiş ve boya kapaklı bir şişeye konularak 24 saat buzdolabında bekletilmiştir. Açık çay rengini alan boya kullanılır duruma gelmiştir. Sonraki kullanımlar için boya +4 °C de buzdolabında depolanmıştır.

4.2.3 Feulgen Boyası İle Preparatların Hazırlanışı

% 70'lik alkolden çıkarılan kök uçları bir tüpü içerisinde alınıp üzerine 1-2 mL 1 N HCl çözeltisi ilave edilerek 60 °C'deki su banyosunda 8-10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra her 5 dakikada bir distile su ile HCl'nin etkisi seyreltilmiştir. Bu işlem üç kez uygulanmıştır. Kök uçları Feulgen boyası içerisinde alınarak oda sıcaklığında 1 saat boyanmaya bırakılmıştır. Kök uçlarının koyu boyanan kısımları 1-2 mm uzunluğunda kesilerek bir lamın üzerine 1 damla % 45'lik asetik asit konularak jilette parçalanmıştır. Daha sonra üstleri lamelle kapatılarak ezme preparatları hazırlanmıştır. Lamellerin etrafı tırnak cilası ile kapatılarak preparatlar yarı daimi hale getirilmiştir.

Kök ucu meristem hücrelerine ait mitotik indeks belirlenmesinde, her uygulama için hazırlanan 5 preparatın her birinde 1000'in üzerinde hücre olmak üzere toplam yaklaşık 5000-6000 hücre içinde mitotik giren hücreler sayılmıştır (MI=mitotik girmiş hücre sayısı / toplam hücre sayısı ×100).

Mitotik indeks hesaplamalarından sonra, preparatların incelenmesine yeniden başlanmış ve bu sefer kromozom aberasyonları her preparatta 100 anafaz veya telofaz

hücresi olmak üzere her uygulamada toplam 500 anafaz veya telofaz hücresi incelenerek belirlenmiştir. Mitotik anormallikler saptanarak en sık görülen anormalliklerin fotoğrafları x40 ve x100 objektifte çekilmiştir.

4.3 AMES Mutajenite Testi

4.3.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma Aldrich' den temin edilmiştir. 4-nitro-o-fenilendiamine, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$, 2-aminofluorene, L-Histidin HCl, D-Biyotin, Ampisilin trihidrat, D-glikoz 6-fosfat, β -NADP Fluka, Sitrikasit monohidrat, Sodyum hidroksit, Sodyum azid, KCl, NaCl, Dimetilsülfoksit Riedel, Bacto agar, Nutrient Broth No:2 Oxoid, 3-Metilkolantren Sigma Aldrich'den temin edilmiştir. Pozitif Mutajenler; Sodyum azid Riedel'den, 2-aminofluorene ve 4-nitro-o-fenilendiamine ise Fluka'dan temin edilmiştir.

4.3.2. *Salmonella typhimurium* Test Suşları

Deneyde, Prof. Dr. Ames ve arkadaşları tarafından, *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Nuran Diril'den temin edilmiştir. TA 98 suşu kodon kayması, TA 100 ise baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır.

4.3.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları

Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Kullanım: MGA ve HBA (master) plakları

	<u>1000 ml için</u>
Magnezyum sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($\text{NaH}_2\text{N}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	175 g
Distile su (45 °C)	670 ml

Temiz bir erlen içine dH_2O konularak ısıtılmıştır. Kaynama seviyesine gelmeden yukarıdaki maddeler sırayla sıcak suyun içine eklenmiştir. Kristallenmeyi önlemek için bir madde iyice çözünmeden diğeri eklenmemelidir. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilize edilmiştir.

(0,5 mM) Histidin/Biyotin Solüsyonu

Kullanım: Mutajenite deneyi (100 ml top agara 10 ml olarak)

	<u>250 ml için</u>
D-Biyotin (F.W. 247,3)	30,9 mg
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	24,0 mg
Distile su	250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülüp ve daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edilip +4°C'de saklanmıştır.

(% 0,8/0,02 NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Kullanım: Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolü ve R-faktör plazmidi taşıyan suşların master plakları

	<u>100 ml için</u>
Ampisilin trihidrat	0,8 g
0,02 N Sodyum hidroksit	100 ml

Ampisilin trihidrat, 0,02 N NaOH içinde çözülmüş ve sterilizasyon için 0,22 mµ çaplı filtreden geçirilip ve +4°C’de saklanmıştır.

(%1) Kristal Viyole Solüsyonu

Kullanım: Suşların kristal viyoleye duyarlılıkları, dolayısıyla rfa mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının kontrolü

	<u>100 ml için</u>
Kristal viyole	0,1 g
Distile su	100 ml

Kristal viyole ve distile su karıştırılıp ve solüsyon ışık geçirmeyen bir kaba konup +4°C’de saklanmıştır.

(% 0,13) Biotin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	<u>50 ml için</u>
D-biotin	0,65 mg
Distile su	50 ml

Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülüp ve otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edilmiştir.

(% 0,5) Histidin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

400 ml için

L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)

2 g

Distile su

400 ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile su içinde çözülmüş ve otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edilmiştir.

(%20) Glikoz Çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

100 ml için

Glikoz

20 g

Distile su

100 ml

Glikoz distile su içinde çözülerek otoklavda 110°C’de 15 dakika sterilize edilmiş ve 0–4°C’de saklanmıştır.

(2µg/µl) 2-aminofluorene (2AF)

Kullanım: Pozitif kontrol 1.0 mg/petri başına olmak üzere dimetilsülfoksitde (DMSO) çözülerek kullanılmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır. 0–4°C’de saklanmıştır.

(2µg/µl) 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)

Kullanım: Pozitif kontrol

200 µg/petri olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanılmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu gerektirmeyen kimyasaldır. Oda ısısında saklanmıştır.

(0.1 µg/µl) Sodyum Azid Çözeltisi

Kullanım: Pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA 100 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanılan kimyasaldır. 0-4 °C'de saklanmıştır.

Top Agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

1000 ml için

Agar	6 gr
NaCl	5 gr
Distile su	1000 ml

Agar-su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözülmüş ve otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilize edilmiştir.

(0,15 M) KCl Çözeltisi

Kullanım: Mikrozom izolasyonu

1000 ml için

KCl	11,275 g
Distile su	1000 ml

KCl, bir miktar distile suda çözülmüş ve toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavda sterilize edilmiş ve 0-4°C'de saklanmıştır.

Top Agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

	<u>1000 ml için</u>
Agar	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

Agar-su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılmış ve karıştırılarak çözülmüş ve otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edilmiştir.

Histidin/Biyotin Plakları (HB Agar)

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
% 20 glikoz	50 ml
Histidin HCl. H ₂ O	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml
50X VB	20 ml
Distile su	914 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45°C’ye soğutulup % 20 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenmiş, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin eklenmiş, karıştırılıp petri kutularına 30 ml olarak dağıtılmıştır.

Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları (HBA Agar)

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanması

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
Distile su	910 ml
50XVB tuzları	20 ml
% 20 glikoz	50 ml
Histidin HCl.H ₂ O	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml
(%0,8/0,02 NaOH) Ampisilin	3,15 ml

Agar ve su otoklavlanmış, 45°C'ye soğutulup % 20 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırılmış ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin eklenip plaklar petrilere 30 ml olarak aktarılmıştır. Bu plaklarda bakteriler 4°C'de 2 ay saklanabilir.

Minimal Glukoz Agar Plakları (MGA)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
Distile su	930 ml
50XVB	20 ml
% 20 glikoz	50 ml

Agar ve su 1 litrelik kapta karıştırılıp çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edilmiş, 45°C'ye soğutulup % 20 glikoz ve 50X VB tuzları eklenir ve besiyeri çalkalanarak karıştırılır. Daha sonra besiyeri, petri kutularına 30 ml olarak aktarılmıştır.

Nutrient Agar Plakları (NA)

Kullanım: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını belirleme ve genotip kontrolü

a. Kristal viyole b. UV duyarlılığı

	<u>1000 ml için</u>
Oxoid nutrient broth no:2	25 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Agar, broth ve su 2 litrelik kapta karıştırılıp otoklavlanmış ve petri kutularına 30 ml olacak şekilde aktarılmıştır.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Kullanım: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

	<u>200 ml için</u>
Oxoid nutrient broth no:2	5 g
Distile su	200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.

Tuz Çözeltisi (1,65 M KCl + 0,4 M MgCl₂)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	<u>500 ml için</u>
Potasyum klorür (KCl)	61,5 g
Magnezyum klorür	40,7 g
Distile su	500 ml

Maddeler distile suda çözülmüş ve 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiş ve 4°C’de ya da oda sıcaklığında saklanmıştır.

0,2 M Sodyum-fosfat Tamponu (pH=7,4)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

500 ml için

0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	13,82 g
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	14,2 g
Distile su	500 ml

Karışım pH 7,4’e ayarlandıktan sonra 121°C’de 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

0,1 M β -NADP Çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

5 ml için

β —NADP (F.W. 765,4)	383 mg
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0,22 μm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

1 M Glukoz–6-Fosfat Çözeltisi

Kullanım: Mutajenite deneyi için S9 karışımı

10 ml için

Glikoz–6-fosfat	2,82 g
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0,22 μm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

S9 Karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörler)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>50 ml için</u>
Steril distile su	19,75 ml
0,2 M fosfat tamponu pH=7,4	25 ml
0,1 M β -NADP	2 ml
1 M Glikoz-6-fosfat	0,25 ml
MgCl ₂ -KCl tuz çözeltisi	1 ml
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml

Maddeler yukarıdaki sıra ile daima buz içinde tutulan 100 lük erlene dikkatli bir şekilde konur. Karışım, her zaman taze olarak ve yeterince hazırlanmıştır. İçerikler daima buz içinde tutulmuştur.

4.3.4. Test Maddeleri

Lg-ekstresinin 3000 μ g/plak, 1500 μ g/plak, 750 μ g/plak, 375 μ g/plak, 187,5 μ g/plak ve 93,75 μ g/plak konsantrasyonları deney esnasında taze olarak hazırlanmıştır.

4.3.5. AMES Deneyi

Bu çalışmada, USA'dan elde edilen test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve Ames/Salmonella/mikrozom testi Maron ve Ames yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olarak iki grup halinde çalışılmıştır. Her doz paralel 3 plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol ve negatif kontroller deneye paralel olarak denenmiştir.

***Salmonella* Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması**

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi'nden getirilen bakteri plakları histidin biyotin ampisilin (HBA) plaklarına paralel ekimleri yapıp 37 °C'de 48 saat inkübasyona alınmıştır. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml nutrient broth (NB) ortamı içinde süspanse edilerek bir gece (12-16 saat) 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp Histidin/biyotin/ampisilin agar (HBA) üzerine çizgi ekim yapılarak plaklar 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar +4 °C'de 2 ay süre ile saklanmış ve pasajlar yapılmıştır.

***Salmonella* Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması**

Genetik kontrolleri yapılarak HBA'ya ekilmiş olan bakterilerden tek koloniler alınarak 2 ml NB içinde 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril endorff tüplerinin içerisine 1 ml bakteri kültürü ve 90 µl DMSO eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. Kapakları sıkıca kapatılarak sıvı azot içerisine daldırılıp çıkartılmış ve böylece şok donmaları sağlanmıştır. Şok dondurulan kültürler stok olarak kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırılmıştır. Bu stok kültürler 1-2 yıl süre ile tazeliklerini korumaktadır.

***Salmonella* Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması**

Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığını bilmek gerekir. Bu nedenle bakterilerin genetik özellikleri bazı testlerle kontrol edilmiştir.

Histidin Gereksinimi Kontrolü

Bakterilerin minimal glikoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺ lardan ayırt edilir. Bu amaçla NB'da, bir gece üretilen bakterilerden MGA ve histidin/biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. 37 °C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanılacak bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıdığı anlaşılır.

uvrB Mutasyonu Kontrolü

Bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB'da bir gece büyütülen bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınıp nutrient agar (NA) plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plakın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir plaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm. yüksekten 8 sn. süre ile ışınlanmıştır. Işınlanmadan sonra petri kapakları kapatılıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, *uvrB* mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Çünkü DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir.

Rfa Mutasyonu Kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre duvarının geçirgenliği artırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü NB'da bir gece büyütülen 0.1 ml sıvı kültür, 45 °C su banyosunda tutulan 2,5 ml top agar üzerine ilave edilip daha sonra NA plaklarına dökülerek plaklara 8 işareti yaptırılmıştır. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına %0,1'lik kristal viyole karışımından 10 µl damlatılmıştır. Kâğıdın boyayı emmesi beklenilmiş, sonra plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine

kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin Rfa mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır.

R-faktör Varlığı Kontrolü

Test bakterilerinin içerdiği, R-faktör taşıyan pKM 101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, büyütülen NB içinde bakteri kültürü (%0,8 Ampisilin/0.02 M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak, 37°C’de 24 saat inkübasyonu sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdüğü gözlenmiştir. Yani bakteriler R-faktör plazmidini içermektedirler.

Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığının Kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ fenotipinden his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20–50 revertant/plak; TA 100 için 75–200 revertant/plaktır. Bu test için, 37 °C’deki etüvde 110 rpm’de NB’de büyütülen bir gecelik kültürlerden 0,1 ml alınıp, 45 °C’deki su banyosunda tutulan 0,25 ml 0,5 M histidin-biyotin solüsyonu içeren 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C’deki etüvde 48–72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. Normal sınırlarda revertant sayı gösteren kültürler deneyde kullanılmıştır.

Sıvı Kültürün ml’sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml’sinde bulunan bakteri sayısını belirlemek için HBA plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml NB içerisine eklenmiştir. Daha sonra, kültür çalkalamalı inkübatörde 37 °C’ de 110 rpm’ de 12–16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gecelik kültürden 100 µl alınıp 20 ml NB içerisine eklenerek taze kültürleri hazırlanarak 140 rpm’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda taze kültürün %0,9 serum fizyolojik ile 10⁰,

10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} olacak şekilde sulandırılmaları hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına her bir konsantrasyondan 3 petri olacak şekilde 100 µl'lik miktarlarda alınarak 45 °C' deki su banyosunda tutulan 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü çalkalanarak NA plaklarına 8 işareti yapılarak yavaşça yayılmış ve 37 °C' de 24 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır.

Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Lg-ekstresinin sitotoksik etkisinin saptanması Dean et al. (1985) göre yapılmıştır. Buna göre, 2 ml top agara TA100 suşunun gecelik kültüründen 100 µl ve DMSO içerisinde çözülmüş *Lg*-ekstresinin değişik konsantrasyonlarından (93,75 µg/plak, 187,5 µg/plak, 375 µg/plak, 750 µg/plak, 1500 µg/plak ve 3000 µg/plak) 100 µl ilave edilerek NA plaklarına ekilmiştir. Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı belirlenmiş ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Her bir doz için 3 plak kullanılmıştır.

S9 Karışımının Hazırlanması

Salmonella/mikrozom test sistemi için standart S9 karışımı bileşenleri 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glukoz-6-fosfat, 4 mM β-NADP, 100 mM Na-fosfat pH:7,4 ve bu karışımın her ml'si için 0.04 ml. derişimindeki S9 fraksiyonudur. Karışım daima her mutajenite deneyi için taze hazırlanmış ve deney süresince buz içerisinde tutulmuştur.

Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

Deneydeki amacımız, daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan mutant oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüştürme gücünü ölçme temeline dayanmaktadır. Ayrıca test bileşenlerinin etkilerinin metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacı ile deneyler S9' lu ve S9' suz olmak üzere iki grup halinde yapılmıştır.

S9'suz Deney

Bu deneyde, 45 °C'lik su banyosunda tutulan ve içerisinde 0,25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml'lik top agara test maddelerinin değişik konsantrasyonlarından 100 µl ve 5 saatlik taze bakteri kültürlerinden 100 µl eklenmiştir. Tüpler düşük hızdaki vorteks ile yavaşça karıştırılarak daha önce 37 °C'de bekletilen MGA plaklar üzerine 8 işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. 15 dakika agarın donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48–72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney TA 98 ve TA 100 için her bir doz 3 ayrı plağa ekilmiştir. Bağımsız iki deney yapılmış ve sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak negatif kontrol, pozitif kontrol olarak TA 100 suşu için 0,1 µg/µl sodyum azid (NaN₃), TA 98 suşu için ise 2 µg/µl 4-nitro-o-fenilendiamine (NPD) kullanılmıştır.

S9'lu (+) Deney

Bu deneyde, 45 °C'lik su banyosunda tutulan ve içerisinde 0,25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml'lik top agara test maddelerinin değişik konsantrasyonlarından 100 µl, 5 saatlik taze bakteri kültürlerinden 100 µl ve S9 karışımından 0,5 ml eklenmiştir. Tüpler düşük hızdaki vorteks ile yavaşça karıştırılarak daha önce 37 °C'de bekletilen MGA plaklar üzerine 8 işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. 15 dakika agarın donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48–72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney TA98 ve TA 100 için her bir doz 3 ayrı plağa ekilmiştir. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak negatif kontrol ve pozitif kontrol yapılmıştır. TA 100 suşu için 2-aminofluorene, TA 98 suşu için 2 µg/µl 2-aminofluorene (2AF) kullanılarak, pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve iki bağımsız deney yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi SPSS 15,0 for Windows paket programında Duncan testi ile kullanılarak yapılmıştır.

5. BULGULAR

5.1. *Allium* Testine Ait Bulgular

5.1.1 Kök Büyümesi İnhibisyonu Testi

Lg-ekstresinin sitogenetik etkilerinin incelenmesinde kullanılacak dozları belirlemek amacıyla önce büyümeyi engelleme testi yapılmıştır. Bunun için önce EC₅₀ değeri belirlenmiştir. EC₅₀ değerini belirlemek için aynı büyüklükteki soğanlar (3-4 cm çapında) alınarak dış kabukları çıkarılmış ve kök primordialarına zarar vermeyecek şekilde çimlenmiş olan köklerinden temizlenmiştir. *Lg*-ekstresinin 80, 60, 40, 20 ve 10 g/L'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak ise saf su, pozitif kontrol grubu olarakta 10 mg/L MMS (Metil metan sülfanat) kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon ve kontrol grubunda 5'er adet soğan kullanılmıştır. Oda sıcaklığında ($\sim 21^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) dört gün çimlendirilen soğanlardan her bir konsantrasyon ve kontrol grubu için aynı soğan yumrusundan en iyi filizlenmiş onar adet kök alınarak ortalama kök uzunlukları bulunmuştur. Bu süre zarfında çimlenen soğanların bulunduğu ortamdaki çözeltiler azaldıkça gerekli ilaveler yapılmıştır. Negatif kontrolde çimlendirilen soğanların ortalama kök uzunluğu olan 27 mm uzunluğunun yarısı olan 13,5 mm veya buna en yakın olan büyüme araştırılmıştır. *Lg*-ekstresinin EC₅₀ konsantrasyonu 15 g/L olarak belirlenmiştir.

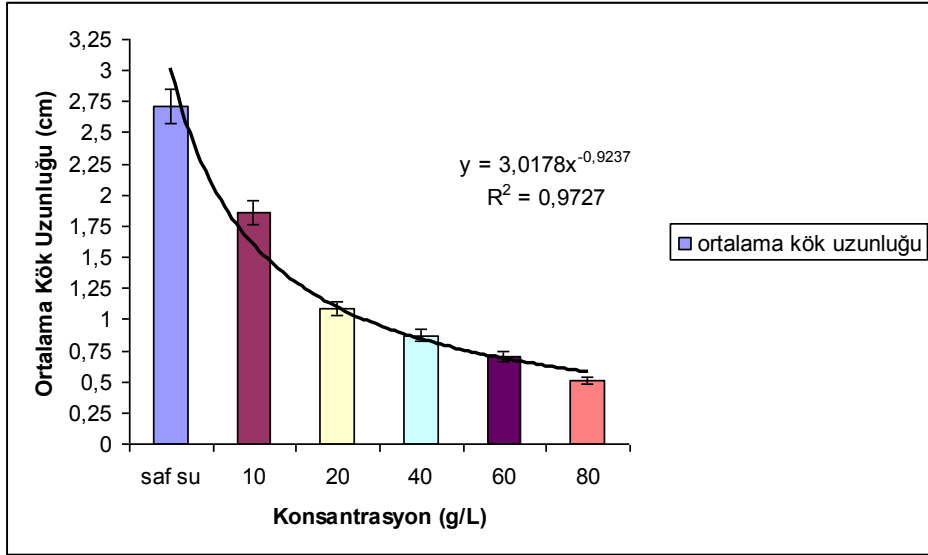


Şekil 5.1. *Lg*-ekstresinin büyümeyi engelleme testi. Dozlar soldan sağa doğru negatif kontrol, MMS, 10, 20, 40, 60 ve 80 g/L şeklinde dizilmiştir.

Çizelge 5.1 *Lg*-ekstresinin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama kök uzunlukları

Dozlar (g/L)	Ortalama uzunluk cm±S.S*	% Büyüme	% Büyümede azalma
Negatif Kontrol	2.71±0.31a	100	-
10	1.86±0.18b	68.71	31.29
20	1.09±0.17c	40.26	59.74
40	0.87±0.10d	32.21	67.79
60	0.70±0.17e	25.94	74.06
80	0.51±0.12f	18.93	81.07

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) S.S: Standart sapma



Şekil 5.2. *Lg*-ekstresinin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama kök uzunlukları

Çizelge 5.1'e bakıldığı zaman konsantrasyon 10 g/L'den yukarıya doğru arttıkça büyümenin azaldığı gözlemlenmiştir ve bu azalan kök büyümesi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. 10 g/L'den itibaren konsantrasyon arttıkça saçak köklerin renklerinin koyulaştığı, kalınlıklarının arttığı ve jelatinimsi bir yapı kazandıkları gözlemlenmiştir.

5.1.2 Mitotik İndeks ve Mitotik Faz Frekansları

Lg-ekstresinin *A. cepa* kök uçlarına uygulanmasıyla mitotik indeks ve mitotik fazlarda meydana getirdiği değişimler Duncan çoklu dağılım testi ile belirlenmiştir. Kullanılan *Lg*-ekstresinin doz ve uygulama süreleri, mitotik indeksi değişik şekilde etkilemişlerdir (Çizelge 5.1). En düşük mitotik indeks *Lg*-ekstresinin 30 g/L'lik konsantrasyonun 72 saatlik uygulamasında, en yüksek mitotik indeks ise 7,5 g/L'lik konsantrasyonun 12 saatlik uygulamasında elde edilmiştir. Mitotik indeksteki değişiklikler artış ve azalış şeklinde olup 7,5 g/L bütün saat uygulamalarında kontrol grubuna göre artış gösterirken, 30 g/L bütün saat uygulamalarında azalış göstermektedir. Bu artış ve azalışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. 15 g/L ise 12, 48, 72 saatlik uygulamalarda kontrol grubuna göre artış gösterirken 24 ve 96 saatlik uygulamalarda azalış göstermektedir. Bu artış ve azalışlar da istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Lg-ekstresinin mitotik faz frekanslarına etkisi incelendiğinde profaz frekanslarının kontrole göre 12 saatlik 30 g/L'lik uygulama hariç arttığı gözlemlenirken anafaz frekanslarının kontrole göre 72 ve 96 saatlik 7,5 g/L uygulamaları hariç, 12 saatlik 30 g/L'lik uygulama hariç telofaz indeksinin azaldığı görülmüştür. Metafaz frekanslarının ise kontrol grubuna göre artış ve azalış şeklinde değişiklikler göstermiştir.

Çizelge 5.2 *Lg*-ektresinin *A. cepa* kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi

Konsantrasyon (g/L)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± Stantard hata*	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Stantard hata*			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 12 saat MMS-10 mg/L 7,5 15 30	5102	30,04±0,59a	88,92±1,31a	1,49±0,28a	3±0,68a	6,59±1,05ab
	5255	27,08±1,56b	75,26±2,44b	4,75±0,5b	10,48±1,45b	9,51±1,27bc
	5148	45,18±0,75c	91,49±1,36a	1,73±0,39a	1,4±0,23a	5,38±1,65a
	5150	33,34±0,47d	93,29±0,54a	1,4±0,09a	1,24±0,36a	4,07±0,81a
	5136	24,31±0,6e	84,55±0,53c	3,35±0,38c	1,58±0,41a	10,52±1,11c
Kontrol- 24 saat MMS-10 mg/L 7,5 15 30	5365	32,76±1,07a	87,99±1,7ab	4,72±1,48a	1,14±0,3a	6,15±0,83a
	5136	26,67±0,63b	86,89±1,27a	3,57±0,31a	3,24±0,42b	6,3±1,08a
	5257	38,29±0,99c	95,76±0,9d	0,56±0,19b	0,78±0,21a	2,9±0,8b
	5210	28,49±0,53b	91,71±1,55bc	1,45±0,38b	0,75±0,17a	6,09±1,17a
	5355	28,12±0,69b	93,16±0,49cd	0,4±0,09b	0,88±0,37a	5,56±0,62ab
Kontrol- 48 saat MMS-10 mg/L 7,5 15 30	5229	29,14±1,04a	84,43±0,67a	3,25±0,56a	4,69±0,5a	7,63±0,42a
	5177	24,27±0,83b	86,91±0,93a	3,45±0,46a	3,86±0,36a	5,78±0,69ab
	5043	32,71±0,63c	92,79±1,06b	3,52±0,95a	2,24±0,93b	1,45±0,72c
	5183	33,96±1,03c	97,05±1,3c	1,17±0,37b	0,51±0,23c	1,27±0,86c
	5204	25,56±1,23b	95,78±0,69bc	-	0,13±0,03c	4,09±0,73b
Kontrol-72 saat MMS-10 mg/L 7,5 15 30	5288	29,37±1,52a	84,44±0,64a	3,27±0,15ab	2,98±0,56a	9,31±0,47a
	5064	25,18±1,37b	82,79±0,49a	4,71±0,12b	3,21±0,67a	9,29±0,44a
	5151	37,75±0,36c	89,4±0,61b	4,14±0,49ab	4,72±0,25b	1,74±0,22b
	5088	33,01±0,81c	93,67±0,97c	2,55±0,58a	0,67±0,22c	3,11±0,26b
	5066	22,54±1,19b	93,56±1,86c	2,73±1,11a	1,32±0,37c	2,39±1,06b
Kontrol- 96 saat MMS-10 mg/L 7,5 15 30	5142	31,58±1,04a	85,45±1,15ab	2,76±0,42a	3,01±0,46a	8,77±1,1a
	5159	20,14±0,62b	82,92±1,62a	4,61±0,32b	3,53±0,51ab	8,92±1,16a
	5168	35,45±1,38c	88,69±0,77b	2,79±0,46a	4,85±0,92b	3,65±0,66b
	5200	26,27±0,63d	94,54±1,1c	1,03±0,34c	0,66±0,27c	3,76±0,96b
	5170	24,82±0,85d	96,61±0,53c	-	0,24±0,16c	3,13±0,39b

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

5.1.3 Lg-ekstresinin Neden Olduğu Anormalliklerin Tipleri ve Oranları

Lg-ekstresinin neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları çizelge 5.3'de gösterilmiştir. Mitotik anormallik değerleri Duncan çoklu dağılım testi ile değerlendirilmiştir. En fazla anormallik olayına Lg-ekstresinin 7,5 g/L'lik konsantrasyonun 48 saatlik uygulanmasında (% 62,01), en az anormallik olayına ise 30 g/L'lik dozun 48 saatlik uygulanmasında (% 2,20) rastlanılmıştır. Ayrıca 72 ve 96 saatlik uygulamaların 30 g/L dozlarında yeterince hücre sayılamadığından anafaz-telofaz bozuklukları hesaplanamamıştır.

Lg-ekstresinin bütün konsantrasyon ve uygulama sürelerinde en fazla görülen anormallikler kalgın kromozom, yapışıklık, anafaz köprüsü ve bozulmuş anafaz-telofazdır. Bozulmuş anafaz-telofaz en fazla görülen anormallik olup % 36,28 oranında tespit edilmiştir. Bunu % 19,59 oranında kalgın kromozom ve % 15,78 oranında yapışıklık izlemektedir. Bunların dışında anafaz köprüsü anormallikleri % 14,83 oranında belirlenmiştir.

Bozulmuş anafaz-telofaz olayına en fazla % 36,28 oranında 7,5 g/L'lik dozun 72 saatlik uygulanmasında en az olarak da kontrol grubunun 12 saatlik uygulamasında (% 1,4) rastlanılmıştır. Kalgın kromozom olayı 7,5 g/L'lik dozun 24 saatlik uygulamaları ve 15 g/L'lik dozun 96 saatlik uygulamaları hariç bütün uygulamalarda gözlenmiştir.

Anafaz köprü olayı en fazla 48 saatlik uygulamanın 7,5 g/L'lik dozunda, en az olarak da 24 saatlik uygulamanın 30 g/L dozunda görülmüştür.

Lg-ekstresinin neden olduğu diğer bir anormallik de yapışıklıktır. En fazla 48 saatlik uygulamanın 7,5 g/L'lik uygulamasında görülmüştür.

Bu anormalliklerden başka diğer anormallikler de (c-metafaz, prometafaz, poliploidi ve binüklear hücre bozuklukları) gözlemlenmiştir. En düşük anormallikler, 12 saatlik uygulamanın 15 g/L dozunda (%0,04±0,02) gözlemlenirken, en yüksek anormallikler 48 saatlik uygulamanın 7,5 g/L dozunda (%0,72±0,46) gözlemlenmiştir.

12 saatlik uygulamanın 7,5 g/L dozu, 24 saatlik uygulamalar, 72 saatlik uygulamanın 15 ve 30 g/L dozu ve 96 saatlik uygulamanın 7,5 g/L dozu hariç diğer uygulamalar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. 48 ve 96 saatlik uygulamanın 30 g/L'lik dozunda bu bozukluklara rastlanılmamıştır. C-metafaz olayı en fazla 7,5 g/L'lik dozun 72 saatlik uygulamasında % 0,23 oranında gözlemlenmiştir.

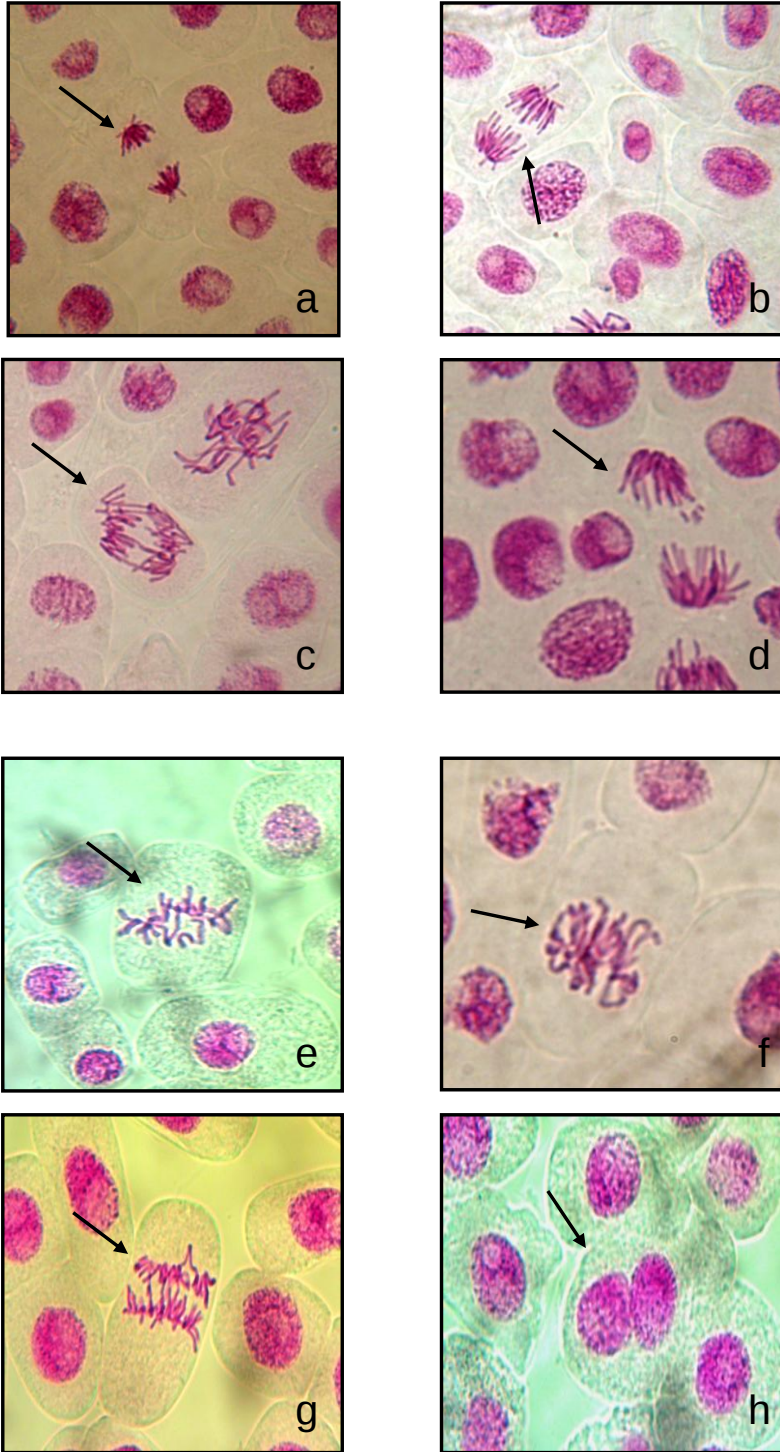
Çalışmada görülen diğer bir anormallik prometafaz olayıdır. Prometafaz olayı 30 g/L'lik dozun 48 ve 96 saatlik uygulamalarında, 15 g/L'lik dozun 96 saat uygulaması hariç *Lg*-ekstesinin bütün uygulamalarda görülmüştür.

Ayrıca çeşitli konsantrasyon ve saat uygulamalarında şekil 5.3'te görüldüğü gibi poliploidi ve binükleer hücre anormalliklerine rastlanmıştır.

Çizelge 5.3 *Lg*-ekstresinin neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları

Konsantrasyon (g/L)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)					Diğer Anormallikler (%)					
		Yapışkanlık	Anafaz köprüsü	Kalgın kromozom	Bozulmuş anafaz- telofaz	Toplam Anormallikler (%± SH)	Sayılan hücre sayısı	C-metafaz	Prometafaz	Poliploidi	Binükleer Hücre	Toplam (%± S.H)
Kontrol- 12 saat	400	3,84	11,69	14,21	1,4	31,14±2,5a	5102	0,06	0,06	-	0,1	0,21±0,06a
MMS-10 mg/L	500	3,6	3,8	10,6	7,6	25,6±1,28a	5255	0,17	0,4	0,04	0,02	0,63±0,12b
7,5	371	10,84	2,51	2,65	14	30±2,55a	5148	0,08	0,17	-	0,02	0,27±0,07a
15	429	2,52	2,04	10,2	26	40,76±1,48b	5150	0,07	0,06	0,02	-	0,15±0,03a
30	291	1,93	2,36	4,55	7,4	16,24±1,99c	5136	0,04	0,07	-	-	0,11±0,03a
Kontrol- 24 saat	500	10,26	4,64	17,24	14,4	46,55±0,7a	5365	0,5	0,63	-	-	1,13±0,15a
MMS-10 mg/L	500	19	3	15	19,2	56,2±1,82b	5136	0,07	0,02	-	0,22	0,31±0,08b
7,5	252	8,27	0,77	-	4,94	13,97±1,11c	5257	-	0,06	-	0,05	0,11±0,05b
15	152	1,32	0,71	2,26	5,68	9,98±0,73d	5210	0,03	0,04	-	-	0,07±0,03b
30	137	1,82	0,42	0,8	5,77	8,82±0,86d	5355	-	0,03	-	0,04	0,07±0,04b
Kontrol- 48 saat	500	10,99	5,7	19,59	9,99	46,25±1,46a	5229	0,08	0,03	-	-	0,11±0,04a
MMS-10 mg/L	500	7,82	8,65	13,49	26,27	56,22±1,61b	5177	0,2	0,02	-	0,32	0,54±0,11a
7,5	389	15,78	14,83	12,2	19,19	62,01±3,31b	5043	0,1	0,6	0,02	-	0,72±0,46a
15	289	0,4	1,6	1	2,4	5,4±0,97c	5183	0,12	0,32	0,02	-	0,46±0,16a
30	196	0,38	-	-	1,82	2,20±1,76c	5204	-	-	-	-	-
Kontrol-72 saat	500	14,6	4	10,6	10,2	39,4±3,14a	5288	0,09	-	-	-	0,09±0,05a
MMS-10 mg/L	500	11,69	5,55	7,42	19,16	43,82±1,22b	5064	0,14	-	0,01	-	0,15±0,03a
7,5	352	7,91	2,82	5,87	36,28	59,87±2,94c	5151	0,23	0,41	0,04	-	0,68±0,1b
15	301	3,47	11,13	4,23	9,75	28,58±1,84d	5088	-	0,49	-	-	0,48±0,08b
30	-	-	-	-	-	-	5066	0,08	0,01	-	-	0,09±0,02a
Kontrol- 96 saat	500	3,82	2,02	6,63	6,67	19,13±2,37a	5142	0,1	0,03	-	-	0,13±0,03a
MMS-10 mg/L	500	22,2	1,4	5,4	20,2	49,2±2,26b	5159	0,08	0,01	-	-	0,09±0,02a
7,5	170	2,68	10,09	1,03	17,1	30,9±4,07c	5168	0,1	0,21	0,02	0,02	0,35±0,08b
15	144	4,16	3,54	-	19,48	27,18±0,98c	5200	-	-	-	0,04	0,04±0,02a
30	-	-	-	-	-	-	5170	-	-	-	-	-

* Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi SH: Standart Hata



Şekil 5.3 *Lg*-ekstresi ile muamele edilen *A. cepa* kök hücrelerinde görülen anormallikler
 a) Yapışıklık b) Kalın kromozom c) Anafaz köprüsü d) Bozulmuş anafaz-telofaz
 e) C-metafaz f) Prometafaz g) Poliploidi h) Binükleer hücre

5.2. AMES Testine Ait Bulgular

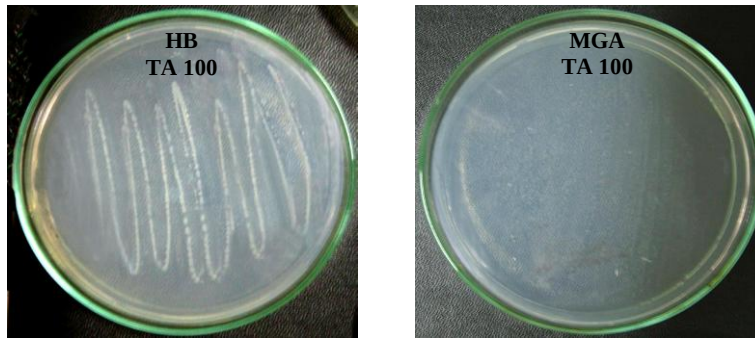
Bu çalışmada *Lg*-ekstresinin mutajenik aktivitesi *S. typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 mutant suşları ile araştırılmıştır.

5.2.1. Genetik İşaretlerin Kontrolü

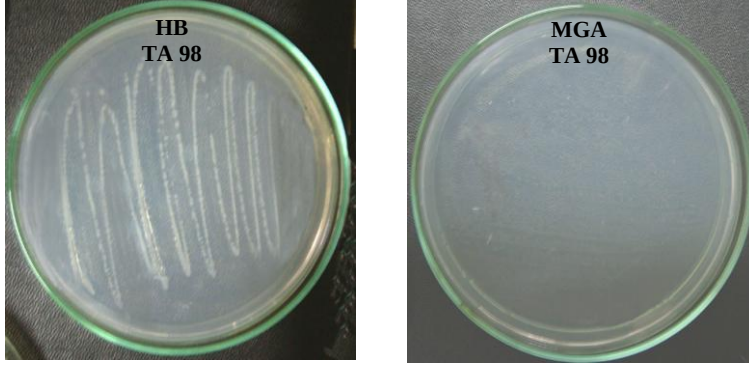
TA 98 ve TA 100 suşlarının histidin gereksinimi, *uvrB* mutasyonu, *rfa* mutasyonu, R-faktör varlığı ve spontan olarak geriye dönen koloni sayısı bakımından genetik işaretlerinin kontrolü yapılmıştır.

Histidin Gereksinim Kontrolü

Bakterilerin *his*⁻ yapısından *his*⁺ yapısına geçişi MGA üzerine ekilmeleri sonucu ayırt edilmiştir. Bu kontrol için, bir gece NB içerisinde büyütülen kültürlerden steril öze ile alınan *his*⁻ bakteriler MGA ve HB plaklarına çizgi ekim yapılmış ve 37 °C'de 48–72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Bu sonuç TA100 ve TA98 suşlarının *his*⁻ mutasyonunu taşıdığını göstermektedir (Şekil 5.4 ve Şekil 5.5).



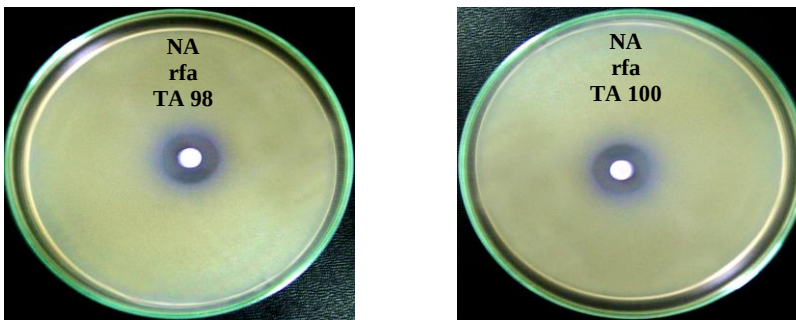
Şekil 5.4. *S. typhimurium* TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



Şekil 5.5. *S. typhimurium* TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları

Rfa Mutasyon Kontrolü

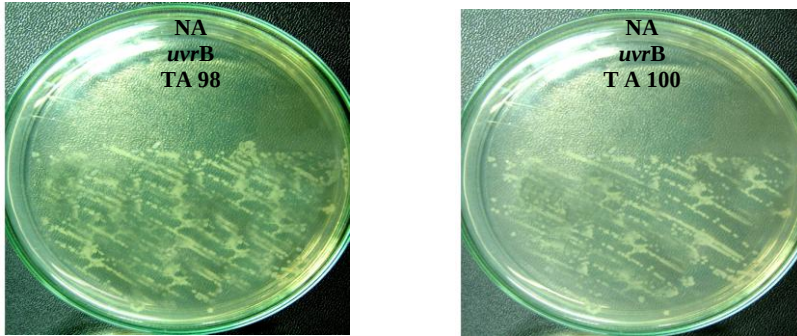
Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuş olup hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Rfa mutasyonun varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir (Şekil 5.6). Bu test için 45 °C’ deki su banyosunda tutulan 2 ml top agara 0,1 ml gecelik bakteri kültürü ilave edildikten sonra NA plaklarına karışımın homojen dağılması için 8 işareti yapılarak ekilmiştir. 10 dakika donması beklendikten sonra plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril disk yerleştirilip diskin ortasına %0,1’lik 10 µl kristal viyole damlatılmıştır. Disk boyayı emdikten sonra plaklar 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm’lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda bize kullandığımız bakteri suşlarının Rfa mutasyonunu taşıdıklarını göstermiştir.



Şekil 5.6. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları

***uvrB* Mutasyon Kontrolü**

UvrB mutasyon kontrolü Şekil 5.7’de gösterilmiştir. Bu mutasyon ile bakterilerin ultraviyole (UV) ışınlarının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizması engellenmiştir ve bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testiyle kanıtlanmıştır. Bu test için, NB’de bir gece büyütülen bakteri kültüründen steril bir öze yardımıyla bir öze dolusu alınıp NA plağının tamamına yüzey ekim yapılmıştır. Plağın yarısı plastik bir plaka ile kapatılıp 33 cm yüksekten 8 sn süre ile 15 watt gücündeki UV lambasına maruz bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda plaklar kapatılıp 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek bakterilerin üreme durumlarına bakılmıştır. Bu süre sonucunda UV’ye maruz kalan bölgede üreme gözlemlenmezken diğer kısımlarda gözlenmiştir. Bu sonuçta bize TA98 ve TA100 suşlarının *uvrB* mutasyonunu taşıdığını göstermektedir

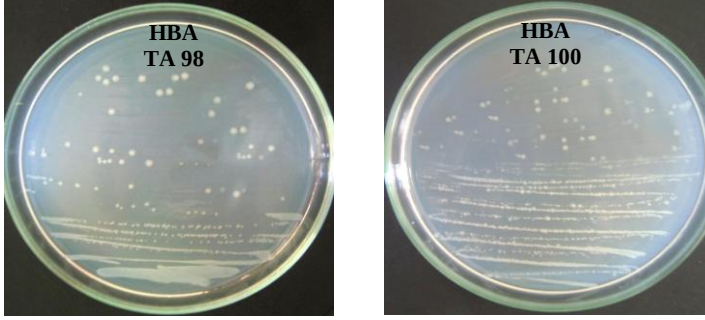


Şekil 5.7. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının *uvrB* mutasyon kontrolü sonuçlar

R-Faktör varlığı kontrolü

Deneyde kullanılan her iki test suşuda ampisiline dirençlilik geni içeren R-faktör taşıyan pKM 101 plazmitini içermektedir. Bu plazmitin varlığı suşların ampisiline dirençliliklerinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir (Şekil 5.8). Bu amaçla, NB içerisinde büyütülen bakteri kültürleri ampisilin (%0,8 Ampisilin/0,02 M NaOH) içeren HBA plaklarına çizgi şeklinde ekimleri yapılmış ve daha sonra 37 °C’deki etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda, plazmit içeren mutant

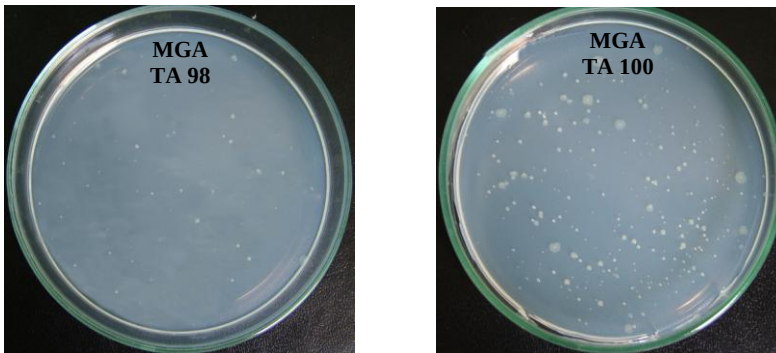
bakterilerin ampisilinli ortamda üremeleri kullandığımız suşların R-faktörü taşıyan pKM 101 plazmitini içediğini göstermiştir.



Şekil 5.8. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları

5.2.2. Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığının Kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his^- durumundan his^+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20–50 revertant/plak; TA 100 için 75–200 revertant/plaktır. Yaptığımız çalışma sonucunda spontan olarak geriye dönüş sıklığı TA 98 suşu için S9'suz ortamda $32 \pm 3,31$, S9 varlığında $34,8 \pm 1,48$ bulunmuşken, TA 100 suşu için sırasıyla $105 \pm 7,21$ ve $147,6 \pm 12,05$ değerleri bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar da her iki suş içinde bu değerlerin arasında çıkmıştır (Şekil 5.9).



Şekil 5.9. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları

5.2.3. Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşlarının kullanılarak yapıldığı mutajenite deneylerinde ml'deki bakteri sayısının $1-2 \times 10^9$ ml/bakteri olması gerekmektedir. Yaptığımız deney sonucunda ml'deki bakteri sayısı $1,2 \times 10^9$ ml/bakteri olarak belirlenmiş ve bu sayıda istenilen değerler arasında çıkmıştır.

5.2.4. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Lg-ekstresinin sitotoksik etkisinin saptanması Dean et al. (1985) göre yapılmıştır. Deney sonucunda test edilen konsantrasyonların hiç birisi sitotoksik etki göstermemiştir. Çalışmada uygulanacak dozların sitotoksik etki göstermemesi gerekmektedir. Bu yüzden *Lg*-ekstresinin 93,75 µg/plak, 187,5 µg/plak, 375 µg/plak, 750 µg/plak, 1500 µg/plak ve 3000 µg/plak dozları kullanılmıştır.

5.2.5. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

Revertant sayısındaki değişiklikler *S. typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu varlığı ve yokluğunda negatif kontrol grubuna göre azalışlar şeklinde olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. S9 fraksiyonunun varlığı revertant koloni sayısını uygulanan bütün dozlarda azaltmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında 2-aminofluorene ve S9 fraksiyonu yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamine kullanıldığında revertant koloni sayısı artmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur.

S. typhimurium TA 100 suşunda ise revertant sayısındaki değişiklikler S9 fraksiyonu yokluğunda kontrol grubuna göre artış ve azalış düzeyinde olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. S9 varlığında ise 93,5 µg/plak konsantrasyonu hariç artış şeklinde olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

TA 100 suşunda da suşların geriye dönüş sıklığını ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için mutajenik etkileri bilinen pozitif kimyasal maddeler kullanılarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. TA 100 için S9 fraksiyonu varlığında 2-aminoantracen, yokluğunda ise pozitif mutajen olarak sodyum azid kullanıldığında revertant koloni sayısı her ikisinde de artmış (2279,2±108,72 ve 1646,2±112,34) ve bu artışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 5.4 *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile denenen ekstrenin (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon testi sonuçları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/plak)	Revertant Sayısı			
		Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma*			
		TA 98		TA 100	
		S9'suz	S9'lu	S9'suz	S9'lu
<i>Lg</i> -ekstresi	3000	30,2±3,42a	28,6±1,81a	110,6±8,56a	214±10,41a
	1500	31±3,67a	28±1,58a	111,4±4,33a	184±7,44a
	750	30±2,73a	25,6±1,14a	105,2±2,38a	216,4±11,78a
	375	31,6±1,81a	27,2±0,83a	109±8,09a	177,8±6,3a
	187,5	29,4±3,2a	27±1,58a	108±6,72a	183,6±21a
	93,75	31,2±2,38a	26,2±3,56a	102,2±4,43a	112,4±10,6a
Kontrol		32±3,31a	34,8±1,48a	105±7,21a	147,6±12,05a
Sodyum azid	10			1646,2±112,34b	
2-aminoanthracene	5				2279,2±108,72b
2-aminofluorene	200		885,6±81,15b		
4-nitro-o-fenilendiamine	200	1380,4±114,61b			

* Kontrol grubuna göre revertant sayısı p< 0.05 düzeyinde anlamlı (Duncan çoklu dağılım testi)

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Linaria türleri halk ilacı olarak Anadolu'da, Japon ve Hint halk tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır. Antidiyabetik, pürgatif, diüretik etkileri yanında emoliyan ve yara iyi edici özelliklere sahip olmaları nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldıkları bildirilmiştir (Kitagawa *et al.* 1973, Baytop 1984, Sing and Prakash 1987). Ayrıca antiallerjik etkileri nedeniyle ekzema tedavisinde de faydalanılmıştır (Dobrescu *et al.* 1985). Bitkinin kimyasal yapısı üzerinde yapılan araştırmalarda başlıca monoterpenler, diterpenler, iridoitler, flavonoidler ve alkaloidler olmak üzere birçok etken madde grubunun varlığı tespit edilmiştir (Bianco *et al.*, 1996; Otsuka, 1992, Ilieva *et al.*, *et al.*, 1993, Bianco *et al.*, 1996, Hua *et al.*, *et al.*, 2002, Ahmad *et al.*, *et al.*, 2006, Tundis *et al.*, *et al.*, 2005, Ferhat *et al.*, *et al.*, 2010).

Bilim ve teknolojinin gelişmesi sonucunda insan yaşantısına yeni giren bazı fiziksel ve kimyasal ajanlar, insan hayatını kolaylaştırdığı gibi bazı sağlık sorunlarına da neden olmaktadır. Günümüzde halen yeni kimyasal ürünler hayatımızdaki yerlerini almaya devam etmektedirler. Bu ürünlerin kullanımından önce insan sağlığına etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Bunun yanında günümüzde alternatif tıbbın önemli bir kısmını oluşturan bitki ve bitki ekstraktlarının mutajenik etki oluşturan kimyasallara veya çevresel etmenlere karşı antimutajenik etki göstererek olumsuz doğabilecek mutasyonları önlediği bilinmektedir. Bunun yanısıra bitki ekstraktları mutajenik etki de gösterebilmektedir. Mutajenik etkileri göstermek amacıyla çok çeşitli *in vitro* test sistemleri kullanılmaktadır. Bu amaçla da bu çalışmada *Linaria genistifolia* (Linnaeus) Miller subsp. *genistifolia* bitkisinin sulu ekstrelerinin muhtemel mutajenik etkileri *in vitro* test sistemlerinden *S. typhimurium* TA98, TA100 suşları kullanılarak S9 varlığında ve yokluğunda Ames/*Salmonella*/mikrozom testi ile, sitotoksik ve genotoksik özellikleri ise Allium testi ile araştırılmıştır.

Mutajenite çalışmalarında bitkilerin kullanımı ilk defa Levan (1938) tarafından kolşisinin *Allium cepa* kök hücrelerinde iğ ipliklerinin dağılmasına ve poliploidiye yol açtığını göstermesiyle başlamıştır. Bu test sistemine ek olarak kimyasalların kromozomlar üzerindeki etkisi araştırmak için *Vicia faba* (Amer and Ali 1983), *Tradescantia paludosa* (Dryanosvka 1987), *Hordeum vulgare* (Kluge and Podlesak

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Yazı tipi rengi: Otomatik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi rengi: Otomatik

1985), *Pisum sativum* (Amer vd. 1999) ve *Crepis capillaris* (Dimitrov 1994) gibi pek çok bitki türü yaygın olarak kullanılmaktadır.

Toksisitenin izlenmesi için uygun test sistemleri arasında, *Allium* testi çok iyi bilinmekte olup birçok laboratuarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Fiskesjö 1985, Rank *et al.* 2002, Yüzbaşıoğlu vd. 2003, Smaka-Kincl *et al.* 1996, Evseeva *et al.* 2003, Kara vd. 1994, Grant 1992). Çünkü soğanların depo edilmesi ve kullanılması oldukça kolay olup, kök ucu hücrelerinde makroskopik (büyüme, EC₅₀) ve mikroskopik parametreler (c-mitoz, yapışıklılık, kromozom kırıkları) için uygun bir sistem oluşturmaktadır. Ayrıca *Allium* testinin sonuçları ökaryotik ve prokaryotik diğer test sonuçları ile iyi bir korelasyon göstermektedir (Fiskesjö 1985).

Bu çalışmada *Lg*-ekstresinin *A. cepa* kök ucu hücrelerine olan etkileri araştırılmıştır. *Lg*-ekstresinin *Allium cepa* kök ucu hücrelerine olan etkilerini araştırmada kullanılacak doz miktarlarını belirlemek için büyüme engelleme testi uygulanarak EC₅₀ değeri tespit edilmiştir. EC₅₀ değerini belirlemek için kök uçlarının büyümesini kontrole göre % 50 oranında azaltan doz esas alınmaktadır (Fiskesjö 1988, Yüzbaşıoğlu vd. 2003, Rank and Nielsen 1994, Rank *et al.* 2002). Bu çalışmada *Lg*-ekstresinin EC₅₀ değeri yaklaşık olarak 15 g/L olarak bulunmuştur. Ancak etkileri araştırılacak maddelerin EC₅₀ değerinin belirlenmediği çalışmalar da bulunmaktadır (Evseeva *et al.* 2003, Panda and Sahu 1985).

EC₅₀ değerini belirlemek için kullanılan *Lg*-ekstresinin konsantrasyonu uygulanan bütün dozlarda, konsantrasyona bağlı olarak saçak köklerin renklerinin koyulaştığı, kalınlıklarının arttığı, jelatinimsi bir yapı kazandıkları ve kök uçlarındaki büyümenin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı görülmüştür. Soğan kök uçlarındaki büyümenin kontrol grubuna göre % 45'den daha fazla azalması, bitkiler üzerinde büyük bir olasılıkla subletal etkiye sahip toksik maddelerin varlığına işaret etmektedir (Fiskesjö 1985, Hidalgo *et al.* 1989, Wierzbicka 1988, Antonsiewicz 1990). Bu bilgiye dayanarak *Lg*-ekstresinin 20 g/L ve üzerindeki dozların, *A. cepa* kök uçlarına subletal etkisinin olduğu sonucunu söylenebilir. Kök büyümesinin inhibisyonu genellikle apikal meristematik aktivite (Webster and Macleod 1996) ve farklılaşma

sırasında hücrenin uzaması (Fusconi *et al.* 2006) ile ilgilidir. Gordaliza ve arkadaşları (1997) *Linaria saxatilis* var. *glutinosa* bitkisinden neoclerodane diterpenoidleri izole etmişler ve bunların farklı neoplastik hücre kültürlerinde sitotoksik etkisini göstermişlerdir. Tundis ve arkadaşları (2005) *L. reflexa* bitkisinden birçok flavonlar izole etmişler ve bunları belirli insan kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif etkilerine bakmışlardır. Pektolinarijenin ve pektolinarin gibi bazı flavonoid glikositlerin büyük akciğer kanser hücre hattına sitotoksik etkisinin olduğunu göstermişlerdir ve IC₅₀ (inhibitör konsantrasyon) değerini sırasıyla 5,03 ve 4,07 µM olarak hesaplamışlardır. *L. genistifolia* (L.) Mill. kök ekstraktlarının 24 saatlik uygulama sonucunda *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvalarına karşı LD₅₀ değeri 490 ppm olarak bulunmuştur (Pavela 2008). Parra ve arkadaşları (2001) *Plantago major* L. bitkisinin farelere karşı LD₅₀ dozunu 4,74 µg/mL olarak bulmuşlardır. Buna karşılık Akkol ve Erçil (2009) bazı *L. grandiflora*, *L. genistifolia* subsp. *confertiflora* ve *L. aucherii* ekstraktlarının toksisite göstermeden ağrı kesici ve ateş düşürücü etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada *Allium cepa*'nın hücre döngüsünü 24 saatte tamamlamasından dolayı (Rank and Nielsen 1994, Yüzbaşıoğlu vd. 2003) uygulama süresi olarak 12, 24, 48, 72 ve 96 saat seçilmiştir. Ancak literatürde farklı uygulama sürelerine de rastlanılmaktadır. 6 ve 24 saat (Kara vd. 1994), 2 ve 4 gün (Fiskesjö 1988), 5 gün (Rank *et al.* 1993) ve 7 gün (Smaka-Kincl *et al.* 1996) gibi değişik uygulama süreleri kullanılmış birçok çalışma bulunmaktadır.

EC₅₀ değeri yaklaşık olarak 15 g/L olarak belirlendikten sonra uygulama dozlarının belirlenmesinde 2xEC₅₀, EC₅₀ ve 1/2xEC₅₀ değerleri kullanılmıştır. Buna bağlı olarak *Lg*-ekstresinin 30, 15 ve 7,5 g/L'lik dozları kullanılmıştır. Saf su negatif kontrol grubu olarak, MMS ise pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Seçilen bu dozlar *A. cepa* kök uçlarına 12, 24, 48, 72 ve 96 saat uygulanarak mitotik indeks belirlenmiştir. En düşük mitotik indeks *Lg*-ekstresinin 30 g/L'lik konsantrasyonun 72 saatlik uygulamasında (22,54±1,19), en yüksek mitotik indeks ise 7,5 g/L'lik konsantrasyonun 12 saatlik uygulamasında (45,18±0,75) elde edilmiştir. Mitotik indeksteki değişiklikler artış ve azalış şeklinde olup 7,5 g/L ve 15 g/L (24 ve 96 saatlik

uygulamar hariç) dozları bütün saat uygulamalarında kontrol grubuna göre artış gösterirken, 30 g/L dozu bütün saat uygulamalarında azalış göstermiş olup bu artış ve azalışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Sitotoksik seviyesinin mitotik indeks değerinin artış ve azalışıyla belirlenebilir. Mitotik indeks değerinin kontrol grubundan düşük olması, test edilen bileşiğin büyüme ve gelişmeyi negatif yönde etkiler buna karşılık yüksek olması durumunda ise hücre bölünmesi uyarılır, kontrolsüz çoğalmaya ve hatta tümör oluşumuna sebep olabilir (Fernandes *et al.* 2007, Hoshina *et al.* 2002). Hücre çoğalmasının artması DNA tamiri için gerekli olan zamanın azalması sonucunda gerçekleşebilir (Evseeva *et al.* 2003).

Mitotik indekste önemli düzeydeki azalma, test edilen maddenin mitodepresif etki yaptığını göstermektedir. Test maddesinin interfaza geçen hücrelerin sayısını azaltarak hücre siklusunun normal işleyişini bozmaktadır (Badr and İbrahim 1987). Mitotik aktivitenin azalması S safhasındaki DNA sentezinin engellenmesiyle de meydana gelmektedir (Sadia and Vahidy 1994). Hücre döngüsünün baskılanmasıyla proteinler test maddesine hedef olmakta, böylece hem DNA sentezi için gerekli olan DNA polimeraz enzimi hem de iğ oluşumuyla ilgili olan birçok enzim baskılanmaktadır. Bu durum antimitotik etki olarak açıklanmaktadır (Hidalgo *et al.* 1989, Yüzbaşıoğlu vd. 2003). Ayrıca mitotik indekste düşüş, ATP miktarının azalması ve enerji üretim merkezi fonksiyonun baskılanması sonucunda da olabilmektedir (Jain and Andsorbhoy 1988).

Lg-ekstresinin mitotik faz frekanslarına etkisi incelendiğinde profaz frekanslarının kontrole göre 12 saatlik 30 g/L'lik uygulama hariç arttığı gözlemlenirken anafaz frekanslarının kontrole göre 72 ve 96 saatlik 7,5 g/L uygulamaları hariç, 12 saatlik 30 g/L'lik uygulama hariç telofaz indeksinin azaldığı görülmüştür. Metafaz frekanslarının ise kontrol grubuna göre artış ve azalış şeklinde değişiklikler göstermiştir. Bu artış ve azalışların birçoğu istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Bu durumun sebebi chfr (profaz ve metafaz arasındaki kontrol noktası) noktasının engellenmesinden olabilir. (Scolnic and Halazonetis 2000) mitotik strese karşı hücrelerin metafaza geçişini geciktiren chrf kontrol noktasını tanımlamışlardır.

Lg-ekstresinin bütün konsantrasyon ve uygulama sürelerinde en fazla görülen anormallikler kalgın kromozom, yapışıklık, anafaz köprüsü ve bozulmuş anafaz-telofazdır. *Lg*-ekstresinin kromozom aberasyonu üzerine etkileri 12 saat 7,5 g/L'lik uygulaması hariç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). 7,5 g/L'lik dozun 12 ve 24 saatlik uygulamaları hariç ve 15 g/L'lik dozun 12 ve 96 saatlik uygulamaları kromozom aberasyonlarını uyarırken diğer *Lg*-ekstrelerinin uygulamaları kromozom aberasyonlarını azaltmıştır.

En fazla anormallik olayına *Lg*-ekstresinin 7,5 g/L 48 saatlik uygulanmasında (% 62,01), en az anormallik olayına ise 30 g/L'lik dozun 48 saatlik uygulanmasında (% 2,20) rastlanılmıştır. Ayrıca 72 ve 96 saatlik uygulamaların 30 g/L dozlarında yeterince anafaz-telofaz hücresi sayılamadığından bozukluklar hesaplanamamıştır.

Bozulmuş anafaz-telofaz olayına en fazla % 36,28 oranında 7,5 g/L'lik dozun 72 saatlik uygulanmasında en az olarak da kontrol grubunun 12 saatlik uygulamasında (% 1,4) rastlanılmıştır. Kalgın kromozom olayı 7,5 g/L'lik dozun 24 saatlik uygulamaları ve 15 g/L'lik dozun 96 saatlik uygulamaları hariç bütün uygulamalarda gözlenmiştir. Bu iki bozukluk *Lg*-ekstresinin mikrotübül oluşumunu etkilemesi sonucunda kaynaklanmış olabilir (Amer and Ali 1983, Kumari *et al.* 2009).

Anafaz köprü olayı en fazla 48 saatlik uygulamanın 7,5 g/L'lik dozunda, en az olarak da 24 saatlik uygulamanın 30 g/L dozunda görülmüştür. Anafaz-telofaz köprüleri translokasyon sırasında eşit olmayan kromatid değişimi ya da kromozom ve kromatidlerin kırılıp birleşmeleri sonucunda ya da disentrik kromozomların varlığında oluşabilir. Bu köprüler yapısal kromozom mutasyonlarına sebep olurlar (El-Ghamery *et al.* 2000, Luo *et al.* 2004).

Lg-ektresinin neden olduğu diğer bir anormallik de yapışıklıktır. En fazla 48 saatlik uygulamanın 7,5 g/L'lik uygulamasında görülmüştür. Yapışkanlığın kromozomlar arasındaki subkromatit bağlantılardan oluşabileceği açıklanmıştır (McGill *et al.* 1974). Kromozomlardaki yapışıklık durumu, *Lg*-ekstresinin etkisiyle kromozom hareketinin engellenmesi sonucunda da oluşabilir. Böylece kromozomlar kutuplara

ulaşamaz, ortada kalırlar ve yoğunlaşarak yapışık bir grnt sergilerler (Ajay and Sarbhoy 1988). Ayrıca yapışıklık kromatinin proteince yoğun içeriğinin bir tip fiziksel adezyonu olarak açıklanmıştır (Patil and Bhat 1992). Yapışıklık olayı kromozom fragmentlerine ve anafaz-telofaz safhasında kprlere sebep olmaktadır (Yüzbaşıoğlu vd. 2003). Yapışıklık ve fragmentlerin kromozom yapısında değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (El-Ghamery *et al.* 2000). Ayrıca yapışıklık, kullanılan maddenin toksik olmasının göstergesi olarak kabul edilmekte ve hcreninlmne yol açtığı düşünülmektedir (Fiskesjö 1985).

Bu anormalliklerden başka diğer anormallikler de (c-metafaz, prometafaz, poliploidi ve binüklear hücre bozuklukları) gözlemlenmiştir. En düşük anormallikler, 12 saatlik uygulamanın 15 g/L dozunda ($0,04 \pm 0,02$) gözlemlenirken, en yüksek anormallikler 48 saatlik uygulamanın 7,5 g/L dozunda ($0,72 \pm 0,46$) gözlemlenmiştir. 12 saatlik uygulamanın 7,5 g/L dozu, 24 saatlik uygulamalar, 72 saatlik uygulamanın 15 ve 30 g/L dozu ve 96 saatlik uygulamanın 7,5 g/L dozu hariç diğer uygulamalar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. 48 ve 96 saatlik uygulamanın 30 g/L'lik dozunda bu bozukluklara rastlanılmamıştır. C-metafaz olayı en fazla 7,5 g/L'lik dozun 72 saatlik uygulamasında % 0,23 oranında gözlemlenmiştir. Bu bozukluk *Lg*-ekstresinin iğ ipliklerinin yapısını bozmasıyla ortaya ıkımış olabilir. Bazı durumlarda c-metafaz anöploidi ile sonuçlanmaktadır (Fiskesjö 1988, Shahin and El-Amodi 1991, Odeigah *et al.* 1997).

Çalışmada görülen diğer bir anormallik prometafaz olayıdır. Bazı hücrelerde metafaz kromozomlarının profaz safhasındaymış gibi düzenlendikleri görülmüş olup prometafaz olarak adlandırılmaktadır (Amer and Ali 1983). Prometafaz olayı 30 g/L'lik dozun 48 ve 96 saatlik uygulamalarında, 15 g/L'lik dozun 96 saat uygulaması hariç *Lg*-ekstresinin bütün uygulamalarda grlmştir.

Ayrıca çeşitli konsantrasyon ve saat uygulamalarında poliploidi ve binüklear hücre anormalliklerine rastlanmıştır. Poliploidi hücreler fragmoplastın eksikliğinden kaynaklanabilir (Videkoviv-Cifrek *et al.* 2002, Fernandes *et al.* 2007). Binklear hücre oluşumu ise normal sitokinez olayının engellediğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Kanserojen ve mutajen maddelerin araştırılmasında farklı test yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları DNA hasarına sebep olan kimyasal mutajen ve kanserojenlerin test edildiği sitogenetik metodlardır. Bu testler, kardeş kromatid değişimi (SCE = sister chromatid exchange) (Trosko, J.E. 1997 and Hamasaki *et al.* 1992), mikronükleus testi (MN) (Wyszynska *et al.* 1991, Majone *et al.* 1990), kromozom bozulma testi (CA = chromosome aberration) (Bakale *et al.* 1990), Ames testi (Ames 1983) ve comet testi (gen konversiyonları ve DNA kırılmaları) (Hayashi *et al.* 1994, Zhuleva *et al.* 1994) olarak bilinmektedir.

Salmonella/mikrozom test sistemi, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik özelliklerini bulmak adına geliştirilmiş ve birçok ülkede yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden biridir. Çünkü bu test, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallar ile geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa zamanlı test sistemlerinden birisidir (Maron and Ames 1983, Kaplan vd, 2004, Watanabe-Akanuma 2005, Reid 2006, İpek vd 2005, Kutlu 2005).

Deneyde *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT-2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar sonucu elde edilen TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bu mutantlar his⁻ bakteriler olup, his operonun değişik bölgelerinde farklı birer mutasyon içerirler. *Salmonella*/mikrozom testi ile kimyasal maddelerin bu test suşlarını his⁺ revertantlar haline dönüştürme özellikleri belirlenmektedir. TA 98 suşu çerçeve kayması mutasyonlarına (frameshift), TA 100 suşu ise baz-çifti değişim mutasyonlarına (base-pair) karşı duyarlıdır. Deneylerde bu bakterileri kullanmamızın nedeni baz-çifti değişim mutasyonları ve çerçeve kayması tipi mutasyonların diğer mutasyonlara göre daha fazla sıklıkta görülmesidir.

Bu çalışmada Lg-ektresinin mutajenik aktiviteleri kısa zamanlı test sistemlerinden biri olan Ames/*Salmonella*/mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır. Ames/*Salmonella*/mikrozom testinde bir maddeye mutajen denilebilmesi için histidin protroflarının sayısının kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katı olması ya da iki katından az olduğu durumlarda doza bağlı bir artış göstermesi gerekmektedir (Maron and Ames 1983).

Çalışma sonucunda TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında ortalama revertant koloni sayısı $34,8 \pm 1,48$, yokluğunda ise $32 \pm 3,31$ olarak bulunmuştur. TA 100 suşu için ise bu değerler sırasıyla $147,6 \pm 12,05$ ve $105 \pm 7,21$ olarak bulunmuştur. Ames'e (1973) göre mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his^- durumundan his^+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20–50 revertant/plak; TA 100 için 75–200 revertant/plaktır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar da bu değerler arasındadır. Bu sayı değerleri; minimal ortamın tipi, glikoz–6-fosfat, β -NADP, fosfat tamponu, glukoz ve tuz çözeltisinin derişimi, petrilerdeki minimal agarın hacmi, top agarın miktarı ve yayılma şekli, ortamdaki hava sirkülasyonu ve sıcaklığı, etüvdeki nem oranı, S9 fraksiyonunun miktarı, minimal agarın bileşimi ve hazırlanmasındaki farklılıklar gibi etkilerinden dolayı değişebilmektedir (Belser *et al.* 1981, Boath *et al.* 1980).

Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında bu çalışmada da olduğu gibi genellikle *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları daha çok kullanılmaktadır. Bunun sebebi de bu iki suşun çeşitli mutajenlere karşı duyarlılığının diğer suşlara göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Asal 1985).

Revertant sayısındaki değişiklikler *S. typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu varlığı ve yokluğunda negatif kontrol grubuna göre azalışlar şeklinde olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. S9 fraksiyonunun varlığı revertant koloni sayısını uygulanan bütün dozlarda azaltmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında 2-aminofluorene ve S9 fraksiyonu yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamine kullanıldığında revertant koloni sayısı artmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. *S. typhimurium* TA 100 suşunda ise revertant sayısındaki değişiklikler S9 fraksiyonu yokluğunda kontrol grubuna göre artış ve azalış düzeyinde olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. S9 varlığında ise $93,5 \mu\text{g/plak}$ konsantrasyonu hariç artış şeklinde olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. TA 100 suşunda da suşların geriye dönüş sıklığını ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için mutajenik etkileri bilinen pozitif kimyasal maddeler kullanılarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. TA 100 için S9 fraksiyonu varlığında 2-aminoantracen, yokluğunda ise pozitif mutajen olarak sodyum azid

kullanıldığında revertant koloni sayısı her ikisinde de artmış ($2279,2 \pm 108,72$ ve $1646,2 \pm 112,34$) ve bu artışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. En yüksek revertant koloni sayısına TA 100 suşunda S9 varlığında $750 \mu\text{g/plak}$ ($216,4 \pm 11,78$), en düşük değere ise TA 98 suşunda S9 varlığında $750 \mu\text{g/plak}$ ($25,6 \pm 1,14$) konsantrasyonunda rastlanılmıştır. *Lg*-ekstresinin TA 98 ve TA 100 suşlarında ortalama revertant sayılarının doza bağlı bir ilişki göstermediği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda kullanılan *Lg*-ekstresinin bütün dozları *S. Typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşunda S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik etkiye rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak *Lg*-ekstresi kullanılan doza bağlı olarak *Allium* testinde sitotoksik ve genotoksik olarak bulunurken, Ames testinde mutajenik etki göstermemiştir. Bazı *Linaria* türleri insanlar tarafından çeşitli amaçlar için kullanıldığından, geleneksel hazırlama metodlarına uygun hazırlanarak dikkatli bir biçimde kullanılmalıdır. *L. genistifolia* subsp. *genistifolia* bitkisinin aktif içerik ve bileşimleri belirlenerek onların sitotoksik, genotoksik ve mutajenik potansiyelleri ortaya çıkarılmalıdır.

KAYNAKLAR

Ahmad, V.U., Kousar, F., Zubair, M., Khan, A., Ali, M.S., Choudhary, M.I. and Sener, B. (2006). A new iridoid glycoside from *Linaria genestifolia*. *Fitoterapia* 77 (1): 12-14.

Biçimlendirilmiş: Aralık Önce: 0 nk

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: Kalın, İtalik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik

Ajay, K.L. and Sarbhoy, R.K. (1988). Cytogenetic studies on the effect of some chlorinated pesticides. *Cytologia*. 53 : 427–436.

Alade, A., Olufunsho, A., Gbenga, A. and Herbert, A.B.C. (2009). Mutagenic screening of some commonly used medicinal plants in Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 125 : 461–470.

Amer, S.M. and Ali, E.M. (1983). Cytological effects of pesticides XVII. Effects of the insecticide dichlorvas on root mitosis of *Vicia faba*. *Cytologia*, 51: 21-25.

Amer, S.M., Mohammed, F.I. and Ashry, Z.M. (1999). Cytogenetic effects of the fungicide benomyl on *Vicia faba* and *Pisum saivum*. *Bulletin of the National Research Center* 24(4): 481-494.

Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *The Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 70 : 782-786.

Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Research* 113: 173–215.

Antonsiewicz, D. (1990). Analysis of the cell cycle in root meristem of *Allium cepa* under the influence on Ledakrin, Folia Histochem. *Cytobiology*, 28: 79-86.

Asal, S. (1985). Bazı pestisitlerin mutajenik etkileri üzerinde araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi*, 9(1) :72-78

Ateş, A. (2002) Moleküler Biyoloji, 9. Bölüm, Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Konya, 113–121 p.

Ateş, B., Abul Ferah, M., Niamat Ali M. and Ahmad W. (2002). Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research*, 514: 105-113.

Badr, A. and İbrahim, A.G. (1987). Effect of herbicide Glean on mitosis, chromosomes and nücleic acids in *Alium cepa* and *Vicia faba* root meristems. *Cytologia*, 52: 293-302.

- Bağcı, H. (1985), Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları.
- Bahçeci, Z., (2002). Moleküler Biyoloji, 2. Baskı, **10**. Bölüm, Gazi Üniversitesi, Kırşehir Eğitim Fakültesi, Ankara, 209-216.
- Bakale, G. and Mc Creary, R.D. (1990). Response of k_e Test to NCI/NTP-Screened Chemicals. Non- Genotoxic Carcinogens and Genotoxic Non-Carcinogenenes. Carcinogenesis, **11**(10) : 1811–1818.
- Başaran, A., Başaran, N., Solak, M. and Güneş, H. (1995). Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 117-123.
- Baytop (1984). T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Yayınları, No:3255 , Sanal Matbaacılık, İstanbul, 420.
- Belser, Jr., Shaffer, W.B., Bliss, S.D., Hynds, E.D., Yamamoto, H.M., Pitts L. and Winer, J.A. (1981). A standardized procedure for quantification of the Ames/Salmonella/Mammalian-Microsome mutagenicity test. *Environmental Mutagenesis*,**3**: 123-139
- Bianco, A., Guiso, M., Mazzei, R.A., Piccioni, F., Nicoletti, M., Serafini, M. and Ballero, M. (1996). 69-O-Acetylantirrhinoside, a new iridoid glucoside from *Linaria flava* subsp. *sardoa*. *Fitoterapia*, **67**: 364–366.
- Boath, S.C., Welch, A.M. and Garner, R.C. (1980). Some factors affecting mutant numbers in the Salmonella/microsome assay. *Carcinogenesis*, **1**(11): 911-923.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Constantin, M.J. and Owens, E.T. (1982). Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays: a report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, **99**: 1-12.
- Davis (1978). P. H. Flora of Turkey and The East Aegean Islands, University Press, Edinburgh, **6**: 654-72.
- Dean, B.J., Brooks, T.M., Hodson-Walker, G. and Hutson, D.H. (1985). Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. *Mutation Research*, **153**: 57-77.
- Demirsoy, A. (1991). Biyoloji Genetik, Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Lisans Tamamlama Programı.

Biçimlendirilmiş: Girinti: Sol: 0 cm, Asılı: 0.63 cm

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, Portekizce (Brezilya)

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: Kalın, İtalik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: Kalın Değil

- Dimitrov, B. (1994). Types of chorosomal aberrations induced by seed aging in *Crepis capillaris* L.. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **37**: 199-209.
- Dobrescu, D., Cristea, A. and Susanu, M. (1985). Experimental pharmacodynamic study of *Linaria vulgaris* used in folk medicine for the treatment of eczemas. *Farmacia Bucharest*, **33**: 215-20.
- Dökmeci, I. (1994). Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 364-547.
- Dryanosvka, O.A. (1987). Mutagenic of the herbicide alachor during meiosis in *Tradescantia paludosa*. *Acad. Bulg. Sci.*, **40**: 73-76.
- El-Ghamery, A.A., El-Nahas, A.I. and Mansour, M.M. (2000). The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*. **65**: 277-287.
- Esra, K.A. ve Dilek E. (2009). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of some *Linaria* species from Turkey. *Pharmaceutical Biology March 2009*, **47**(3) : 188-194
- Evseeva, T., Geras'kin, S.A. and Shuktomova, I.I. (2003). Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. *Jour. Of En. Radioactivity*, **68**: 235-248.
- Falakalı, B. (1993). Genel Genetik, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir, 84-97
- Ferhat, M., Harkat, H., Lavaud C., Haba, H., Long, C. and Benkhaled, M. (2010). Iridoids and flavonoid from *Linaria aegyptiaca* (L.) Dum. subsp. *fruticosa*. *Biochem Sys. Ecol* **38**(4) : 833-835.
- Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C. and Marin-Morales, M.A. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **88**, 252-259.
- Fiskeşjö, G. (1985). The Allium test as standart in enviromental monitoring. *Hereditas*, **102**: 99-112.
- Fiskeşjö, G. (1988). The Allium Test-an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*. **197** : 243-260.
- Fusconi, A., Repetto, O., Bona, E., Massa, N., Gallo, C., Dumas-Gaudot, E. and Berta G. (2006). Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Env Exp Bot*, **58**: 253-260.

Biçimlendirilmiş: Varsayılan Paragraf
Yazı Tipi, Yazı tipi: İtalik

Biçimlendirilmiş: Aralık Önce: 0 nk,
Sonra: 0 nk

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik

Biçimlendirilmiş: Türkçe

- Gadano, A.B., Gumi, A.A. and Carballo, M.A. (2006). Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology*, **103**: 246–251.
- Gordaliza, M., Miguel Del Corral, J.M., Luz de la puente M., Garcia-Grávalos, M.D. and San Feliciano, A. (1997). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**: 1649.
- Grant, W.F. (1992). Cytogenetics studies of agricultural chemicals in plants In Genetic Toxicology AnAgricultural Perspective (R. Fleck and A., Hollaender eds.). *Plenum Press*, Newyork, 335-378.
- Hamasaki, T., Sato, T., Nagase, H. and Kito, H. (1992). The Genotoxicity of Organotin Compounds in SOS Chromotest and Rech-Assay. *Mutat. Res.*, **280**: 195-203.
- Hayashi, M., Tice, R.R., Mac Gregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Volders, M.K., Oleson, F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutov, S. and Vannier, B. (1994). In vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutat. Res.*, **312**: 293-304.
- Hidalgo, A., Gonzales, J.A., Navas, P. and Garcia-Herdugo, G. (1989). Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by protham and chlorprotham. *Cytobios*, **57**: 7-17.
- Hoshina, M.M. (2002). Evaluation of a possible contamination of the waters of the Claro River-Municipality of Rio Claro, part of the Corumbataí River Basin, with the mutagenicity tests using *Allium cepa*. State University Of São Paulo, Rio Claro, Sp. (In Portuguese).
- [Hua, H., Cheng, M., Li, X. and Pei, Y. \(2002\). A new pyrroloquinazoline alkaloid from *Linaria vulgaris*. *Chem Pharm Bull* **50**: 1393–1394.](#)
- [Ilieva, E., Handjieva, N., Spassov, S. and Popov, S. \(1993\). 5-O- allosylantirrhinoside from *Linaria species*. *Phytochem* **32\(4\)**: 1068-1070.](#)
- İpek, E., Zeytinoğlu, H., Okay, S., Tüylü, B., Kürkcüoğlu, M. ve Can Başer, K.H. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, **93** : 551-556.
- Jain, A.K. and Andsorbhoy, R.K. (1988) Cytogenital studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding Remarks. *Cytologia*, **53**: 427-436.
- Kaplan, Ç., Diril, N., Şahin, S. ve Cehreli, M.C. (2004). Mutagenic potentials of dental cements as detected by the Salmonella/microsome test. *Biomaterials*, **25**: 4019–4027.

Biçimlendirilmiş: Girinti: Sol: 0 cm, Asılı: 0.63 cm

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik, İtalyanca (İtalya)

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: Kalın Değil, İtalik, İtalyanca (İtalya)

- Kara, M., Sanda, M.A., ve Ateş, A. (1994). Cytogenetics effect of the insecticide cypermethrin on the root meristems of *Allium cepa* L.. *Turkish Journal of Bio.*, **18**(4): 323-331.
- Kitagawa, L., Tani, T., Akita, K., Yosioka (1973). I. Constituents of *Linaria japonica*, I. Sttucture of linarioside, a new chlorinated iridoid glucoside and identification of two related glucosides. *Chem. Pharm. Bull.*, **21**(9) : 1978-87.
- Klug, W.S. and Cummings M.R. (2002). Concept of Genetics, 6 th Edition, 0-13-081626-4 (Çev: ÖNER, C. Genetik Kavramlar, Palme yayıncılık,816)
- Kluge, R. and Podlesak, W. (1985). Plant critical levels for the evaluation of boron toxicity in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Soil*, **83**: 381-388.
- Kumari, M., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*. **407** : 5243–5246
- Kutlu, M., Aydoğın, G., Susuz, F. ve Özata, A. (2004). The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **17**:111-116.
- Lagarto Para, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I. and Iglesias, L. (2001). Buela Comparative study of the assay of *Artemia salina* L and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) **8**(5): 325-409
- Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B.N. (1982). A new Salmonella tester strain, TA 97 for the detection of framshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot *Mutat. Res.*, **94** : 315-330.
- Luo, L.Z., Werner, K.M., Gollin, S.M. and Saunders, W.S. (2004). Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutation Research*. **554** : 375–385.
- Majone, F., Brunetti, R., Fumagalli, O., Gabriela, M. and Levis, A.g. (1990). Induction of Micronuclei by Mitomycin C and Colchicine in the Marine Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. *Mutat. Res.*, **244**: 147-151.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**: 173-215.
- Mc Cann, J. and Ames, B.N. (1976) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test:Assay of 300 chemicals:Discussion. *The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, **73**: 950-954.

- Mc-Gill, M., Pathak, S. and Hsu, T.C. (1974). Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible maternal basis chromosomes stickiness. *Chromosoma*, **47**: 157–167.
- Odeigah, P.G.C., Nurudeen, O. and Amund, O.O. (1997). Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. *Hereditas*, **126**: 161–167.
- Oraler, G. (1990). Genetik, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 177-122.
- Otsuka HJ (1992). Isolation of isolinariin A and B, new flavonoid glycosides from *Linaria japonica*. *J Nat Prod* **55**: 1252–1255.
- Öner, C. (2003). Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, 6. baskıdan çeviri, Türkiye, 455-467
- Özerol, E. (1996). Sitokrom P-450 monooksijenaz enzim sistemleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, **3**(3): 257-275.
- Panda, B.B. and Sahu, U.K. (1985). Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfothion. *Cytobios*, **42**: 147-155.
- Patil, B.C. and Bhat, G.I. (1992). A comparative study of MH and EMS in the induction of chromosomal aberrations on lateral root meristem in *Clitoria ternata* L. *Cytologia*, **57**: 259-264.
- Pavela R. (2008). Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae).
- Poppenga, R.H. (2002). Herbal medicine: Potential for intoxication and interactions with conventional drugs. *Clinical Techniques in Small Practice*, **17**: 6-18.
- Quillardet, P. and Hofnung, M. (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, **147**: 65-78.
- Ramel, C. and Rannung, U. (1980). Short- term mutagenicity test. *Environmental Health*, **6**: 1065-1076.
- Rank, J. and Nielsen M.H. (1994). Evaluation of *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation Research*, **312**: 17-24.
- Rank, J. (2003). The method of *Allium* Anaphase-Telophase Chromosome Aberration Assay. *Ekologiia*, 38–42.

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: İtalik

- Reid, K.A., Maes, M.A., Staden, J.V., Kimpe, N.D., Mulhollve, D.A. and Verschaeve, L. (2006). Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **106**: 44-50.
- Roy-Byrne, P.P., Bystritsky, A., Russo, J., Craske, M.G., Sherbourne, C.D. and Stein, M.B. (2005). Use of herbal medicine in primary care patients with mood and anxiety disorders. *Psychosomatics*, **46**: 117-122.
- Saad, B., Dakwar, S., Said, O., Abu-Hijleh, G., Al Battah, F., Kmeel, A. and Aziaze, H. (2006). Evaluation of medicinal plant hepatotoxicity in co-cultures of hepatocytes and monocytes. *eCAM*, **3**: 93-98.
- Sadia, K.B. and Vahidy, A.A. (1994). Cytotoxic effect of herbicide ronstar on meristematic cells of *Allium cepa*, L. *Pak. J. Bot.*, **26**: 69-74.
- Scolnic, D. and Halazonetis, T. (2000). Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*. **406**: 430-435.
- Shahin, S.A. and El-Amoodi, K.H.H. (1991). Induction of numerical chromosomal aberrations during DNA synthesis using fungicides nimrod and rubigan-4 in root tips of *Vicia faba* L. *Mutation Research*. **261**: 169-176.
- Simaan, J.A. (2009). Herbal medicine, what physicians need to know. *Lebanese Medical Journal*, **57**: 215-217.
- Singer, B. and Gerunbeger, D. (1994). Molecular Biology of Mutagenesis and Carcinogenesis, 335.
- Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M. and Toman and M.J. (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*, **368**: 171-179.
- Sofowora, A. (1999). *The state of medicinal plants research in Nigeria*, In: Proceeding of workshop held at Ile-Ife, Nigeria, **1**:373.
- Steff, L.B. (2007). Herbal hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease*. **11**: 577-596.
- Trosko, J.E. (1997). Challenge to the Simple Paradigm that 'Carcinogens' are 'mutagens' and to the in vitro and invivo Assay Used to Test the Paradigm. *Mutat. Res.*, **373**:245-249.
- Tundis, R., Deguin, B., Loizzo, MR., Bonesi, M., Statti, GA., Tillequin, F. and Menichini, F. (2005). Potential antitumor agents: Flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. *Bioorg Med Chem Lett* **15**: 4757-4760.

- Vidakovivé-Cifrek, Z., Pavlica, M., Regula, I. and Papers, D. (2002). Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry High-Density Brines. *Environmental Contamination and Toxicology*, **43**: 284–291.
- Vural, N. (1984). Toksikoloji, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları Ankara, No. **56**:, 32-81.
- Vural, N. (1996). Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 344-363.
- Wang, K., Shindoh, H., Inoue, T. and Horii, I. (2002). Anvantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. *Journal of Toxicological Sciences*. **27**: 229-237.
- Watanabe-Akanuma, M., Ohta, T. and Sasaki, Y.F. (2005). A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria ve cultured human cells. *Toxicology Letters*, **158**:213-219.
- Webster, P.L., and Macleod, R.D. (1996). The root apical meristem and its magrin, In: Waishel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U., (Eds.), Plant roots. the hidden half (Second Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 51–76.
- WHO (1985). The WHO traditional medicine programme: policy and implementation. *International Traditional Medicine Newsletter* **1**: 1-5.
- Wierzbicka, M. (1988). Mitotic disturbances induced by low doses of inorganic lead. *Caryologia*, **41**: 143-163.
- Wyszyn'ska, K. and Liro, W.C. (1991). The Use of Cytogenetic Tests For Evaluation of Mutagenic Properties of Selected Dyes Applied in Textile and Cosmetic Industry. *Genetica Polonica*, **32**(3)
- Yüksel, N. (1999) Sitokrom P-450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşmeleri, 35. Ulusal Psikiyatri Kongresi, Trabzon.
- Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Sancak C. ve Kasab, R. (2003). Cytological effects of herbicide racer flurochloridone on *Allium cepa*. *Caryologia*, **56**: 97-105.
- Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y. and Lee, E.J. (2004). Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sciences*, **74**: 935-968.
- Zhuleva, L.Y. and Dubinin, N.P. (1994). Use of the Micronucleus Test For Ecological Monitoring İn Astrachan Oblast. **30**(7): 999–1004.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Uğur Gürol GÖKÇE
Doğum Yeri : Kadıköy/İstanbul
Doğum Tarihi : 11/12/1987
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : ugurgurolgokce@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Üsküdar Burhan Felek Lisesi
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi (2006-2010)
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi (2010-2012)