

***ALYSSUM VIRGATUM* NYAR. SULU
EKSTRELERİNİN ANTİSİTOTOKSİK VE
ANTİMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN
ALLIUM VE AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
İmren ÇALIK

DANIŞMAN
I. Doç. Dr. Sait BULUT
II. Prof. Dr. Muhsin KONUK
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Haziran, 2013

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***ALYSSUM VIRGATUM* NYAR. SULU EKSTRELERİNİN ANTİSİTOTOKSİK
VE ANTİMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN *ALLIUM* VE AMES TESTİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

İmren ÇALIK

DANIŞMAN

I. Doç. Dr. Sait BULUT

II. Prof. Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Haziran, 2013

TEZ ONAY SAYFASI

İmren ÇALIK tarafından hazırlanan “*Alyssum virgatum* Nyar. sulu ekstralarının antitotoksik ve antimutajenik özelliklerinin *Allium* ve Ames testi ile araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğini ilgili maddeleri uyarınca 06/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

- I. **Danışman** : Doç. Dr. Sait BULUT
II. **Danışman** : Prof. Dr. Muhsin KONUK

Başkan : Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU
Afyon Kocatepe Üni., Fen-Edb. Fakültesi,
Üye : Doç. Dr. Sait BULUT
Afyon Kocatepe Üni., Fen-Edb. Fakültesi,
Üye : Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ
Afyon Kocatepe Üni., Fen-Edb. Fakültesi,
Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet TEMEL
Afyon Kocatepe Üni., Fen-Edb. Fakültesi,
Üye : Yrd. Doç. Dr. Yasin EREN
Süleyman Demirel Üni., Eğitim Fakültesi,



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

.....
Enstitü Müdürü
(Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN)

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- 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.

06/06/2013

İmren ÇALIK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ALYSSUM VIRGATUM NYAR. SULU EKSTRELERİNİN ANTİSİTOTOKSİK VE ANTİMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN *ALLIUM* VE AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

İmren ÇALIK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

I. Danışman: Doç. Dr. Sait BULUT

II. Danışman: Prof. Dr. Muhsin KONUK

Bu araştırmada, *Brassicaceae* familyasına ait olan *Alyssum virgatum* Nyar. bitkisinin toprak üstü kısımlarının sulu ekstralarının (Av-eks) *Allium cepa*'nın kök uçları üzerine antisitotoksik etkisi incelenmiş olup, *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerine antimutajenik etkisi araştırılmıştır.

Av-eks'in farklı süre ve konsantrasyonlarının MMS'e karşı kök büyümesi, mitotik indeks ve anafaz-telofaz kromozom aberasyonları üzerine etkileri belirlenmiştir. *Allium* kök büyüme inhibisyonu testinde EC₅₀ değeri yaklaşık olarak 1,56 g/L olarak bulunmuştur. Antisitotoksisite testinde, distile su (negatif kontrol), MMS (pozitif

kontrol) ve 10 ppm MMS içeren Av-eks'in farklı konsantrasyonları ($0,5 \times EC_{50}$, EC_{50} ve $2 \times EC_{50}$) 24, 48 ve 72 saat süreyle kullanılmıştır. 10 ppm MMS içeren Av-eks gruplarındaki konsantrasyonun artışıyla mitotik indekste önemli bir yükselme gözlenmiştir ($p < 0,05$). Kromozom aberasyon çalışmalarında ise anomali yüzdelerinin pozitif kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. İğ iplikleri bozulmalarının sebep olduğu kalgın kromozom aberasyonu, diğer anomalilerden daha fazla tespit edilmiştir. Sonuçlar, istatistiksel olarak SPSS programında Duncan testi ile değerlendirilmiştir. Av-eks'in, *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde MMS varlığında antisitotoksik ve antigenotoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur.

Av-eks, *Salmonella typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda sırasıyla 5000 µg/plak konsantrasyonunun % 21,92 ve % 20,02 inhibisyon oranlarıyla orta dereceli antimutajenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Salmonella typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda antimutajenik aktiviteye rastlanmamıştır. Sonuçlar, istatistiksel olarak SPSS programında Dunnett-t testi (2-yönlü) ile değerlendirilmiş ve 312,5 µg/plak dışındaki konsantrasyonlar istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur.

2013, xii + 123 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Alyssum virgatum*, Ames, *Allium*, *Brassicaceae*

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF ANTICYTOTOXIC AND ANTIMUTAGENIC EFFECTS OF AQUEOUS EXTRACTS OF *ALYSSUM VIRGATUM* NYAR. BY BOTH *ALLIUM* AND AMES TESTS

İmren ÇALIK

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Sciences

Department of Biology

I. Supervisor: Sait BULUT

II. Supervisor: Prof. Dr. Muhsin KONUK

In this study, anticytotoxic effects of distilled water extract of *Alyssum virgatum* Nyar. (*Brassicaceae* family) aerial parts (Av-ext) was determined on *Allium cepa* root meristematic cells and antimutagenic effects on TA98 and TA100 *Salmonella typhimurium* strains with and without metabolic activation was investigated by *Salmonella*/microsome test system.

Effects of different concentrations and treatment periods of Av-ext on root growth, mitotic index and anaphase-telophase chromosomal aberrations, against MMS were determined. EC₅₀ value was found about 1.56 g/L in *Allium* root growth inhibition test.

In anticytotoxicity test, distilled water (negative control), MMS (positive control) and different concentration of *Av-ext* ($0.5 \times EC_{50}$, EC_{50} ve $2 \times EC_{50}$) including 10 ppm MMS were used for 24, 48 and 72 hours treatment period. It was observed that mitotic index was increased significantly parallel with to concentration rising in *Av-ext* groups including 10 ppm MMS. In chromosome aberration study, percentages of anomalies were decreased according to positive control group. Laggard chromosome aberrations caused by mitotic spindle disruptions were determined more than the other anomalies. The results were then evaluated by Duncan test in SPSS software for windows.

It was determined that 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ concentration of *Av-ext*, showed medium antimutagenic activity on *Salmonella typhimurium* TA98 strain with and without S9 by the inhibition rates % 21.92 and % 20.02, respectively. Antimutagenic activity was not found by *Salmonella typhimurium* TA100 strain with and without S9. The results were evaluated by Dunnett-t test (2-sided) on SPSS program and all of the used concentrations, except 312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ concentration, were found to be statistically significant.

2013, xii + 123 pages

Key Words: *Alyssum virgatum*, Ames, *Allium*, *Brassicaceae*

TEŐEKKÜR

Bana bu konuda alıŐma imkânı sunan ve bu tezin hazırlanmasında tüm laboratuvar desteğini sağlayan bilimsel önderliği ile yolumu aydınlatan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muhsin KONUK'a teŐekkür ederim.

Çalışma konusunun seğiminde bana fikir vererek beni destekleyen, laboratuvar çalıŐmalarım süresince yardımlarını ve bilgilerini benden esirgemeyen, tezimin tamamlanmasında büyük emek sarf eden, aynı zamanda çalıŐmalarım süresince önerileri ile destek olan değerli hocalarım ArŐ. Grv. Dr. Dilek AKYIL ve Yrd. Doç. Dr. Yasin EREN'e, deney sırasında bana yardımcı olan ve desteğini bir an olsun esirgemeyen arkadaşım merhum Harun ÜSTÜNOğLU'na sonsuz teŐekkülerimi sunarım.

Tez çalıŐmalarım sırasında her türlü sıkıntıma ortak olan ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım ArŐ. Grv. Dr. Arzu ÖZKARA ve ArŐ. Grv. Dr. Feyza ERDOęMUŐ'a ve sevgili arkadaşım Hatice DERE'ye çok teŐekkür ederim.

Bugüne kadar beni her konuda destekleyip, bana güvenerek her zaman yanımda olan ve hiçbir konuda fedakârlıklarını esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teŐekkürler.

İmren ÇALIK

AFYONKARAHİSAR, 2013

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tıbbi Bitkiler.....	4
1.1.1 Tıbbi Bitkilerin Tarihçesi ve Önemi	4
1.2 <i>Alyssum virgatum</i> (<i>Brassicaceae</i>) Bitkisinin Yayılış Alanları ve Özellikleri	7
1.3 Ağır Metallerden Nikel.....	12
1.4 Hiperakümülatör Bitkiler ve Fitoremediasyon	15
1.5 Antimutajenite ve Tıbbi Bitkilerin İçerdiği Önemli Antimutajenik Bileşikler.....	20
1.5.1 Polifenoller	22
1.5.2 Flavonoidler	23
1.5.3 α -Tokoferol	24
1.5.4 Askorbik asit	24
1.5.5 Karotenoidler.....	25
1.6 Mutajenite ve Antimutajenite Araştırmalarında Kullanılan Test Sistemleri	26
1.6.1 Sitogenetik Yöntemler.....	28
1.6.2 Mikrobiyal Yöntemler.....	29
1.7 Bu Çalışmada Kullanılan Test Sistemleri	31
1.7.1 <i>Allium</i> Testi	31
1.7.2 Ames Test (<i>Salmonella</i> /mikrozom test).....	34
2. MATERYAL ve METOD	39
2.1 Bitki Ektresinin Hazırlanması.....	39
2.2 <i>Allium</i> Test	39
2.2.1 EC ₅₀ Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	39

2.2.2 Kromozom Aberasyon Testi	40
2.2.3 Preparatların Hazırlanması	41
2.2.4 Mikroskopik Çalışma	42
2.2.5 Verilerin İstatistiksel Analizleri	42
2.3 Ames Mutajenite Testi	43
2.3.1 Bitki Ekstresi	43
2.3.2 <i>Salmonella typhimurium</i> Test Suşları	43
2.3.3 Deneyde Kullanılan Besiyerlerinin İçerikleri ve Hazırlanmaları.....	43
2.3.4 Test Maddeleri.....	53
2.3.5 Ames Deneyi	54
2.3.6 Sonuçların Değerlendirilmesi.....	60
3. BULGULAR	61
3.1 <i>Allium</i> Testine Ait Bulgular	61
3.1.1 Kök Büyümesi İnhibisyonu Testi.....	61
3.1.2 Mitotik İndeks (MI) Üzerine Etkileri	63
3.1.3 Kromozom Aberasyon Çalışmaları	66
3.2 Ames Testine Ait Bulgular	69
3.2.1 Genetik İşaretlerin Kontrolü.....	69
3.2.2 Sitotoksik Dozların Belirlenmesi	72
3.2.3 Ames Deneyi Bulguları	72
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	75
5. KAYNAKLAR.....	92
ÖZGEÇMİŞ.....	123

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
mM	Milimolar
μ g	Mikrogram
rpm	Dakikadaki dönüş hızı
sn	Saniye
°C	Santigrad derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

ATP	Adenozin trifosfat
pH	Hidrojen potansiyeli
WHO	Dünya sağlık örgütü
EPA	Çevre koruma örgütü
Ni	Nikel
ppm	Milyonda bir parça
CHO	Çin hamster ovaryum
Cd	Kadmiyum
Cr	Krom
MI	Mitotik indeks
MMS	Metil metan sülfonat
EC ₅₀	Büyüme engelleyici konsantrasyon

HCl	Hidroklorik asit
HBA	Histidin/Biyotin/Ampisilin agar
MGA	Minimal glukoz agar
ROS	Reaktif oksijen türleri

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 1 <i>Alyssum virgatum</i> Nyar.'a ait fotoğraf.....	12
Resim 3.1 Kromozom aberasyonu çalışmasında görüntülenen bazı anomaliler.....	68
Resim 3.2 <i>S. typhimurium</i> TA98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları.....	70
Resim 3.3 <i>S. typhimurium</i> TA100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları.....	70
Resim 3.4 <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları	70
Resim 3.5 <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının uvrB mutasyon kontrolü sonuçları.....	71
Resim 3.6 <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları.....	71
Resim 3.7 <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 Nikel biriktiren <i>Alyssum</i> türleri, biriktirme oranları ve dağılışları.....	11
Çizelge 1.2 Nikel metalinin kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	14
Çizelge 1.3 Mutajenitenin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar	27
Çizelge 1.4 Ames test sisteminde kullanılan bazı <i>Salmonella</i> suşları ve genetik özellikleri	38
Çizelge 3.1 <i>Allium</i> testi kök büyümesi inhibisyonu testi sonuçları.....	62
Çizelge 3.2 <i>A.virgatum</i> su ekstrelerinin mitotik indeks ve mitotik safhalar üzerine etkileri	65
Çizelge 3.3 <i>A.virgatum</i> su ekstrelerinin kromozom aberasyonu sonuçları	67
Çizelge 3.4 TA98 ve TA100 suşları ile yapılan Ames testi sonuçları	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1 <i>Alyssum virgatum</i> ekstresinin farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.....	62
---	----

1. GİRİŞ

Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımları insanlık tarihinin ortaya çıkışına kadar uzanmaktadır. Dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de tıbbi bitkiler yüzyıllardır kullanılmaktadır. Ülkemiz zengin florasıyla çok sayıda tıbbi bitkiyi bünyesinde barındırmaktadır. Son yıllarda alternatif tıbbın önemli bir kısmını oluşturan bitki ekstraları üzerine yapılan çalışmalara ilgi çok artmıştır.

Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaktadır (Vonderbank 1949, Dığrak *et al.* 1999). Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır (Kalaycıoğlu ve Öner 1994).

Geleneksel halk hekimliğinde kullanılan bitkiler bilimsel bir süzgeçten geçirilerek yeniden değerlendirilmiş ve fitoterapi bir bilim dalı haline gelmiştir. Bu bilim dalı giderek gelişmekte ve daha fazla önem kazanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verileri, gelişmekte olan ülkelerde insanların %80’inin bu terapi yöntemlerini kullandığını ve 3,3 milyar insanın da tıbbi bitkilerden terapi aracı olarak yararlandığını ortaya koymuştur (Çelik ve Çelik 2007).

Bitkiler hem geleneksel ilaçlar hem de endüstrileşmiş ürünler olarak tıpta yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Rovado *et al.* 2004). Antibiyotiklerin ve kimyasal içerikli gıdaların kullanımından kaynaklanan sağlık problemlerinin ortaya çıkmasıyla birlikte bitkilerin, gıda katkı maddesi olarak kullanımı için araştırmalar yapılmaya başlanmıştır (Wallace 2004).

Konunun bir başka ve belki de en önemli yönü ise, bazı şifalı bitkilerin yan etkilere ve hatta ölümlere yol açabilecek zehirli maddeler içerdiklerinin bilincine gereğince varılmamış olmasıdır (Qu *et al.* 1992, Chiang *et al.* 1997). Bazı medikal bitkilerin aşırı terapötik avantajları olmasına rağmen medikal bitkilerin bazı içerikleri potansiyel olarak toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olabilmektedir. (Gadano *et al.* 2006). Bu nedenle, tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin de, konvansiyonel ilaçlarda olduğu gibi kalite, güvenlik ve etkinlik yönünden test edilmeleri ve standardizasyonlarının yapılması gerekmektedir (Simaan 2009).

Çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve geriletici özelliği olan bitkisel metabolitler üzerine birçok deneysel çalışmalar yapılmakta, antimutajen ve antikarsinojenlerin önemi gün geçtikçe daha fazla anlaşılmaktadır (Karker *et al.* 2000).

Kanseri de içine alan çeşitli hastalıkların gelişmesine karşı bitkisel metabolitlerin koruyucu olabileceğini gösteren *in vivo* ve *in vitro* deneysel araştırmalardan ve epidemiyolojiden elde edilen kanıtlar; bu metabolitler üzerine antimutajenik ve antigenotoksik çalışmaların büyük ölçüde artmasını sağlamıştır (Abdullaev *et al.* 2003).

Günümüzde, kanserin de dâhil olduğu birçok önemli hastalığın mutasyonlar ile ilişkilendirilmesi; mutasyonların ortaya çıkışı ve önlenmesi üzerine yapılan çalışmaların önemli ölçüde artmasına neden olmuştur. Bu bağlamda sayısız kimyasal bileşiği sentezleme potansiyeline sahip olan bitkiler, mutajenite ve antimutajenite çalışmalarının odağını oluşturmaktadır (Loh *et al.* 2009).

Antimutajenlerin veya antikarsinojenlerin kanser etiyojisiyle ilgili olan faktörlerle mücadelede aktif rol oynadıkları bilinmektedir (Karker *et al.* 2000). Bununla birlikte antimutajenik ve antikarsinojenik özelliğe sahip kimyasal bileşikler araştırılmak ve keşfetmek, günümüzde insanlarda kanser riski ve mutasyon oranlarındaki artışın

beraberinde getirdiği istenmeyen sonuçlar nedeniyle de zorunlu hale gelmiştir (Hartman and Shankel 1990).

Bitkisel metabolitlerin antimutajenik aktivitelerinin belirlenmesinde, deney hayvanları kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalar uzun süre ve yüksek maliyet nedeniyle başlangıç aşamasında tercih edilen test sistemleri değildir (Iarc 1980). Bu nedenle araştırmacılar, antikarsinojenite taramalarına esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans and Ziger 2000).

Ames-*Salmonelle*/mikrozom test sistemi kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinden biri olup antimutajen/antikarsinojenlerin veya tersine mutajen/karsinojenlerin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan önemli bir tekniktir (Abdullaev *et al.* 2003).

Kimyasalların sitotoksik aktiviteleri *Allium cepa* (Fiskesjö 1985, Smaka-Kincl *et al.* 1996, Rank *et al.* 2002, Marcano *et al.* 2004, Fatima *et al.* 2005, Patra *et al.* 2005), *Vicia faba* (Cotelle *et al.* 1999), *Arabidopsis thaliana* (Menke *et al.* 2001) ve *Hordeum vulgare* (Nicoloff and Kappas 1987) gibi farklı bitki sistemleri ile analiz edilmektedir. Özellikle *Allium* test, çeşitli kimyasalların sitotoksik ve/veya genotoksik etkilerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılmaktadır (Fiskesjö 1985, Smaka-Kincl *et al.* 1996, Rank *et al.* 2002, Marcano *et al.* 2004, Fatima *et al.* 2005, Patra *et al.* 2005).

Bu çalışmada endemik bir bitki olan *Alyssum virgatum*'un antimutajenik aktiviteleri ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmadığından toprak üstü kısımlarının distile su ekstraktlarının antimutajenitesi Ames-*Salmonella*/mikrozom testi ile değerlendirilmiş olup, antigenotoksik etkileri de *Allium* test sistemi ile belirlenmeye çalışılmıştır.

1.1 Tıbbi Bitkiler

1.1.1 Tıbbi Bitkilerin Tarihçesi ve Önemi

Bitkilerin tedavide kullanımları insanlık tarihiyle birlikte başlamıştır. Binlerce yıl önce insan, bitkilerin tedavi edici gücünü tanımış ve sağlıklı yaşayabilmek için ondan yararlanmıştır. Bu kullanım biçimi etken madde olan doğal ürününden çok, bitkinin kendisine veya değişik yollarla elde edilen özütlerine dayanmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

Kökeni insanlık tarihinin ortaya çıkışına kadar uzanan bu gruplandırma içerisinde yer alan bitkiler; modern tıp ve eczacılık bilimleri ile olduğu kadar, komplementer (tamamlayıcı) tıp, alternatif tıp ya da geleneksel tedavi uygulamalarını da içeren birçok alan ile doğrudan ilişkilidir (Hasani-Ranjbar *et al.* 2009, Mainardi *et al.* 2009). Bu bitkilerin sağlık uygulamalarında geniş kullanım alanına sahip olmaları, içerdikleri kimyasal maddeler ile doğrudan ilişkili olan biyolojik aktivitelerine bağlıdır (Hoareau and DaSilva 1999, Barış 2004, Guarrera 2005, Abbasi *et al.* 2009, Davis and Perez 2009).

Tıbbi bitkilerin kullanımına ait ilk kayıtlardan biri M.Ö. 2600 yıllarında Mezopotamya'da çömlekler üzerine yazılan çivi yazıdır. Tıbbi bitki kullanımına ilişkin ilk kayıtlardan bir diğeri M.Ö. yaklaşık 2600 yıllarında Mısır'da ortaya çıkarılmıştır. Bunun yanı sıra Mısır'ın bilinen en iyi farmasötik madde kaydı M.Ö. 1500'lü yıllarda yazıldığı sanılan ve çoğunluğunu bitkilerin oluşturduğu 700 civarında reçete içeren Ebers papirüsüdür (Baytop 1984).

Bitkisel ilaç kullanımının gelişmesine önemli katkılar sağlayan Yunanlı filozof ve doğa bilimcisi Theophrast M.Ö. yaklaşık 300 yıllarında "History of Plants" adlı kitapta bitkilerin tıbbi özelliklerini ele almış ve bu özelliklerin yetiştirme esnasında

karakteristik özelliklerinin değışme kabiliyetlerini kaydetmiştir (Cragg and Newman 2005).

M.S. 20-79 yılları arasında yaşayan Dioscorides'in "Materia Medica" adlı kitabı 1500 yıl kadar tedavi alanında ve tedavi kitapları yazarlarınca ana kaynak olarak kullanılmıştır. Dioscorides'in bu eseri 5 kitapdan ibaret olup, bu eserde 500 tıbbi bitkinin tarifi verilmekte ve tedavi özellikleri anlatılmaktadır. Bunun yanı sıra İslam dünyasının tabii ilimler bilgini olan Ebu Reyhan Biruni "Kitab al-Saydala fi al Tıb" adlı kitabında eczacılık, droglar ve drogların muhtelif dillerdeki isimleri hakkında bilgiler vermiştir. Yine İslam dünyasının büyük filozofu ve hekimi olan İbni Sina'nın "Kanun fit Tıb" adlı kitabında 785 kadar bitkisel, hayvansal ve madensel drogun tarifi ve tıbbi kullanımları verilmiştir. 12. yüzyılda Latince'ye çevrilmiş, 15. ve 16. yüzyıllarda ise 36 kez basılmış, 17. yüzyıl ortalarına kadar tıp okullarında ders kitabı olarak okutulmuştur (Baytop 1984, 1999).

Bütün bu gelişmelerin akabinde ilk defa 19. yüzyılda bitki droglarının yapı, tanım ve işlevlerini inceleyen farmakognozi bilimi ortaya atılmıştır (Ceylan 1995).

Yüzyıllardan beri süregelen insan ve bitki arasındaki bağ sonucunda, günümüzde tüm dünyanın önemini kabul ettiği ve ciddi araştırmaların yapıldığı etnobotanik bilim dalı doğmuştur (Koçyiğit 2005).

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).

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun %80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse toplam dünya nüfusunun %64'ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır (Farnsworth 1990).

Günümüzde tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen sekonder metabolitler üzerine yapılan çalışmalarda, tedavi alanına giren yeni sentetik maddelerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkilerin bitkisel droglarda daha az görülmesi, genellikle bir tek etkiye sahip olan sentetik bileşiklere göre bitkisel drogların birkaç etkiye birden sahip olmaları ve yeterli düzeyde bir kimya endüstrisine sahip olmayan kalkınma yolundaki ülkelerin, memleketlerindeki bitkilerden yararlanarak, kolay ve ucuz tedavi olanağı elde etmek istemeleri nedenlerinden dolayı oldukça artmıştır (Aboolenein 1982).

Buna paralel olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Asya ve Afrika'daki gelişmekte olan ülkelerde geleneksel ya da yöresel tıp uygulamalarının en az komplementer tıp ve alternatif tıp uygulamaları kadar yaygın olduğunu; bu ülkelerin bazılarında popülasyonun neredeyse %80'lik bölümünün sağlık gereksinimini karşılamak amacıyla ilk etapta bu uygulamalara başvurduğunu bildirmiştir (Tang and Halliwell 2010). Sayısız kimyasal bileşen içeren tıbbi bitkilerin böyle büyük bir kitle tarafından bilinçsizce kullanılmasının doğurabileceği olumsuz sonuçlar, bu yönde yapılan araştırmaların ne denli önemli olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Ayrıca ciddi yan etkiler gösteren birçok sentetik kimyasalın aksine doğal bileşenlerin kullanılmasının daha güvenli olması da son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalara büyük ivme kazandırmıştır (Mainardi *et al.* 2009).

In vivo ve *in vitro* çalışmalar, bitkilerin yaprak, meyve, kök gibi kısımlarından elde edilen bazı doğal bileşiklerin ksenobiyotik etkiler üzerine düzenleyici rol oynadıklarını göstermiştir. Bu bileşiklerin karakterizasyonu, tanılanması, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin belirlenmesi insanlarda kanser hastalığının gelişmesini azaltmak için önemli bir stratejiyi de beraberinde getirmiştir (Rovado *et al.* 2004). Bu hastalığı önlemek için geliştirilen strateji; ya çevresel mutajenleri nötralize eden ajanların kullanımını artırmak yada bu ajanların kullanımını sınırlayan veya azaltan doğal bileşiğin tümör inhibe edici etkiye ve immun sistemi kuvvetlendirici niteliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Lien and Li 1985). Özellikle makromolekülleri içine alan birçok doğal ürün bireysel immun sisteminin modülasyonunu sağlamasından dolayı antitümör aktiviteye sahiptir. Bu makromoleküllerin, kimyasal antitümör droglarla karşılaştırıldığında daha az yan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Tsukagoshi and

Ophashi 1974). Yine çeşitli biyoaktif bileşikler ve bunların türevlerinin; başlangıç, gelişme ve yayılım safhalarını içine alan birçok deneysel sistemlerde karsinogenesisi inhibe ettiği gözlenmiştir (Huang *et al.* 1994). Bu yüzden çabalar, kanserin indüklenmesi ve sonraki gelişim safhalarını engelleyen, azaltan veya gerilemesini sağlayacak doğal antikarsinojenleri tanımlamaktır (Chuang *et al.* 2000).

1.2 *Alyssum virgatum* (*Brassicaceae*) Bitkisinin Yayılış Alanları ve Özellikleri

TÜBİTAK Tüvives veritabanlarına göre (2012) *Alyssum virgatum*'un sistematik hiyerarşisi aşağıdaki gibidir.

Alem : Plantae
Altalem : Tracheobionta
Bölüm : Magnoliophyta
Sınıf : Magnoliopsida
Altsınıf : Dilleniidae
Takım : Capparales
Aile : *Brassicaceae*
Cins : *Alyssum*
Tür : *Alyssum virgatum* Nyar.

Brassicaceae familyası dünyada yaklaşık 338 cins ve 3700 türle (Avcı 2005), Türkiye'de ise 85 cins ve 567 takson ile temsil edilir (Cullen 1965, Davis *et al.* 1988).

Brassicaceae (*Cruciferae*) familyasının bazı üyeleri sebze ve yem bitkisi olarak, bazıları tohumlarından yağ elde etmek amacıyla bir kısmı ise süs bitkisi olarak yetiştirilebilme potansiyeline sahip olup ekonomik bakımdan değerli bitkilerdir (Kürşat 1999). Önemli cinsler ve türler içeren *Brassicaceae* familyası tek yıllık veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Tohumlarından yağ ve zehirli hardal gazı elde edilip, ilaç sanayinde de kullanılmaktadır (Yıldırım 2001).

Bitkiler aleminin tohumlu bitkiler bölümü, kapalı tohumluların alt bölümü ve iki çenekliler sınıfının *Brassicaceae* familyasına giren *Alyssum* L. cinsi Türkiye florasının büyük cinsleri arasında yer almakta ve 90 türle temsil edilmektedir. Bunlardan 54'ü endemiktir. Oldukça fazla varyasyon gösteren *Alyssum* türleri, özellikle *Odontarrhena* (Meyer) Hooker seksiyonunda, serpantin bölgelerde yetişmektedir (Davis 1965). Aynı zamanda bu cins bitkileri kuduz otu olarak tanınmaktadır (İnt. Kyn. 1).

Türlerin yoğunluğu Doğu Akdeniz'de fazladır (Babaoğlu *et al.* 2004). Bazı *Alyssum* türlerinin kültürü yapılmış olup, park ve bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Beckett 1985). Genel olarak *Alyssum* türleri gerek kuraklığa dayanıklı olmaları, gerekse toprak istekleri bakımından çok seçici olmadıklarından özellikle çok yıllık olanları erozyon çalışmalarında öncü bitki olarak kullanılabilir (Dudley 1964).

Bu bitki dünyada şiddetli tektonik aktivitelere maruz kalmış birçok yerde olduğu gibi Türkiye'de de değerli ultramafik kaya ve topraklarda bulunmaktadır. Bu bölgeler tüm ülke genelinde yaygın olmakla birlikte Doğu, Güneydoğu ve Orta Anadolu'da daha seyrekdir (Reeves *et al.* 1997).

Alyssum virgatum ülkemizde Çankırı, Kütahya, Sivas ve Tokat civarında yayılış gösteren endemik bir bitkidir. Orman ve çıplak alanlarda 1400-2100 m arası yüksekliklerde yetişir. Çiçeklenme zamanı Mayıs, Temmuz ayları arasındadır (Anonim 2012). Türe ait fotoğraf resim 1.1'de verilmiştir.

Alyssum cinsinin bazı türleri nikel metalini kuru yaprak biokütlesinin %3'üne varan derişimlerde biriktirme özelliğine sahip olduğu için ekolojik değeri olan bir bitki grubudur (Kramer 1996, 1997).

Nikel metalinin yüksek derişimlerine (%9,21) ilk defa Minguzzi vd. (1948) tarafından, Floransa bölgesinde yayılış gösteren *Alyssum bertolonii* bitkisinin kuru yapraklarında rastlanmıştır. Başta herbaryum örnekleri üzerinden yürütülen daha sonraki çalışmalarla nikel biriktiren türlere yenileri eklenmiş ve kuru materyalinde >1000 µg/g (0,1 %) nikel bulunduran bitkiler yüksek seviyede metal biriktirici (hiperakümülatör) olarak

adlandırılmıştır. Bu terim serpentinlerde yetişen biriktirici olmayan türlerde olması beklenen en yüksek değerden 100 kat daha fazla bir derişimi temsil etmektedir. *Alyssum* türüne ait cinslerdeki Ni biriktirme oranı göz önüne alınarak 168 *Alyssum* türü incelenmiş ve 45 biriktirici tür belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 1.1) (Brooks 2000).

Türkiye florasının önemi ise neredeyse tüm *Alyssum* türlerinin ve yüksek seviyede metal biriktiren türlerin yarısından fazlasının Türkiye’de yer almasından kaynaklanmaktadır. Türkiye’de metal biriktirme özelliği *Brassicaceae*’de sadece *Alyssum*’da değil *Bornmulleria*, *Cochlearia*, *Thlaspi* ve *Aethionema* türlerinde de görülmektedir. Türkiye’nin *Alyssum* türlerinden yüksek seviyede metal biriktirenler *A. callichroum* Boiss.& Bal., *A. caricum* T.R. Dudley & Hub.-Mor., *A. cassium* Boiss., *A. cypricum* Nyar., *A. dubertretii* Gomb., *A. floribundum* Boiss. & Bal., *A. murale* Waldst & Kit. subsp. *murale*’ ye ait iki varyete (var. *murale* ve var. *haradjianii* (Rech) T.R. Dudley, *A. pterocarpum* T.R. Dudley ve *A. samariferum* Boiss & Hausskn.’dur (Reeves ve Adıgüzel 2008).

Serpentin [$Mg_3Si_2(OH)_5$] öncelikle ultramafik (yüksek magnezyum ve demir içeren) kayalarda hakim bulunan kaya oluşturan yaygın bir mineraldir. Bu kayalardan kaynaklanan topraklarda gelişen farklı bodur tipteki vejetasyona serpentin vejetasyon denmektedir. Serpentin topraklar yüksek seviyede nikel (Ni), kobalt (Co) ve krom (Cr) ve düşük seviyede nitrojen (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca) ve yüksek Mg/Ca oranı ile karakterize edilirler. Bu uç kimyasal özellikler serpentin toprakları pek çok bitki türü için yaşanmaz kılar fakat endemik serpentin taksaların evriminde de temel bir seçici güç oluşturur (Mengoni *et al.* 2000).

Nikel serpentin topraklarda, toprak çözeltisindeki yüksek çözünürlüğüne bağlı olarak zehirliliğe sebep olabilmektedir. Serpentin kayalar kıraç olarak adlandırılırlar çünkü genelde seyrek bir vejetasyonu barındırırlar. Temel elementlerce çok fakirdirler bu yüzden de tarımsal bir önemleri yoktur. Serpentinofitler kuraklık, besin stresi, yoğun ağır metaller ve yüksek yoğunlukta ısıya maruzdurlar. Serpentin habitatlar ve türler tüm dünyada tehdit altındadır. Habitat kaybına bağlı olarak pek çok serpentin endemik tür

yok olma tehlikesi yaşamaktadır. Bu habitatlar biyoçeşitliliğin merkezidirler ve mutlaka korunmaları için stratejiler geliştirilmelidir (Harrison 1999).

Ni elementi çoğu bitkilerin bünyesinde 18-51 ppm kül ağırlık (kuru ağırlık üzerinden 1.5 ppm) düzeyindedir. Ancak *Alyssum* bitkisinin %1 düzeyinin üzerinde Ni biriktiren türleri de bulunmaktadır. Dünya’da *Alyssum*’un 168, Avrupa’da 14 türü bulunmakta ve Türkiye’de ise bu türlerden bazıları doğal olarak yetişmektedir Mersin, Hatay, Kahramanmaraş, Kayseri, Malatya, Sivas, Erzincan, Tunceli, Muğla, Denizli, Antalya, Bursa, Kütahya, Eskişehir vb. gibi illerde bol miktarda, özellikle de ofiyolitik kayaların yayılım gösterdiği alanlarda yetişmektedir (Brooks 1977, Brooks *et al.* 1979, Adıgüzel and Reeves 2002).

Brooks vd. (1977, 1979); Adıgüzel vd. (2002)’in çalışmalarında bazı *Alyssum* bitki türünün 100 den fazla türünün olduğu ve bu türlerin de birçoğunun Anadolu’da yetiştiği ve Ni belirleyicisi olabileceği vurgulanmıştır.

Minguzzi vd. (1948), Florence, İtalya yakınlarında bulunan çok yıllık *Alyssum bertolonii* Desv.’nin bünyesinde aşırı konsantrasyonda nikel bulunduğunu, bu bitkinin yetiştiği toprakta 4900 ppm Ni bulunmasına rağmen bitkinin bünyesinde kuru ağırlıkta 7900 ppm Ni bulunduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 1.1 Nikel biriktiren *Alyssum* türleri, biriktirme oranları ve dağılışları (Prasad 2005)

Nikel biriktirme oranları (kuru ağırlığında) (mg/kg)	Latince adı	Dağılımı
9090	<i>Alyssum akamasicum</i> B.L. Burt	Yayıllı. Kıbrıs
4480	<i>Alyssum alpestre</i> L	Yayıllı. G. Avrupa
8170	<i>Alyssum anatolicum</i> Nyar.	Yayıllı. Türkiye
29400	<i>Alyssum argenteum</i> All.	Yayıllı. İtalya
10200	<i>Alyssum bertolonii</i> subsp. <i>Scutarinum</i> Nyar.	Yayıllı. Balkanlar
10900	<i>Alyssum callicrum</i> Boiss. and Balansa	Yayıllı. Türkiye
16500	<i>Alyssum carcium</i> T.R. Dudley & Huber-Morath	Yayıllı. Türkiye
20000	<i>Alyssum cassium</i> Boiss.	Yayıllı. Türkiye
16300	<i>Alyssum chondrogynum</i> B.L. Blurt	Yayıllı. Kıbrıs
13500	<i>Alyssum cilicium</i> Boiss. and Balansa	Yayıllı. Türkiye
4900	<i>Alyssum condensatum</i> Boiss. And Hausskn.	Yayıllı. Irak, Suriye
18100	<i>Alyssum constellatum</i> Boiss.	Yayıllı. Türkiye
13500	<i>Alyssum corsicum</i> Duby	Yayıllı. Korsika
10400	<i>Alyssum crenulatum</i> Boiss.	Yayıllı. Türkiye
23600	<i>Alyssum cypricum</i> Nyar.	Yayıllı. Kıbrıs
19600	<i>Alyssum davisianum</i> T.R. Dudley	Yayıllı. Türkiye
11700	<i>Alyssum discolor</i> T.R. Dudley & Huber-Morath	Yayıllı. Türkiye
16500	<i>Alyssum dubertretii</i> Gombault	Yayıllı. Türkiye
4550	<i>Alyssum euboicum</i> Halacsy	Yayıllı. Yunanistan
11500	<i>Alyssum eriophyllum</i> Boiss. and Hausskn.	Yayıllı. Türkiye
3960	<i>Alyssum fallacinum</i> Boiss. and Balansa	Yayıllı. Girit adası
7700	<i>Alyssum floribundum</i> Boiss. and Balansa	Yayıllı. Türkiye
7390	<i>Alyssum giosnanum</i> Nyar.	Yayıllı. Türkiye
12500	<i>Alyssum heldreichii</i> Hausskn.	Yayıllı. Yunanistan.
13500	<i>Alyssum huber-morathii</i> T.R.Dudley	Yayıllı. Türkiye
22400	<i>Alyssum lesbiacum</i> (P. candargi) Rech.f	Yayıllı. Yunanistan
13700	<i>Alyssum markgrafii</i> O.E. Schulz	Yayıllı. Arnavutluk
24300	<i>Alyssum masmenkaeum</i> Boiss.	Yayıllı. Türkiye
7080	<i>Alyssum murale</i> Wealdst and Kit	Yayıllı. Balkanlar
4590	<i>Alyssum obovatum</i> (C.A. Mey) Turez	Yayıllı. Rusya
7290	<i>Alyssum oxycarpum</i> Boiss. And Balansa	Yayıllı. Türkiye
7600	<i>Alyssum peltarioides</i> subsp. <i>Virgatiforme</i> Nyar. T.R. Dudley)	Yayıllı. Türkiye
21100	<i>Alyssum pinifolium</i> (Nyar.) T.R Dudley	Yayıllı. Türkiye
22200	<i>Alyssum pterocarpum</i> T.R. Dudley	Yayıllı. Türkiye
12500	<i>Alyssum robertianum</i> Bernard ex Godronand Gren	Yayıllı. Korsika
7860	<i>Alyssum penjwinensis</i> T.R. Dudley	Yayıllı. Irak
18900	<i>Alyssum samariferum</i> Boiss. & Hausskn.	Yayıllı. Samar
10000'e kadar (yapraklarda)	<i>Alyssum serpyllifolium</i>	Yayıllı. Portekiz
1280	<i>Alyssum singarense</i> Boiss. And Hausskn.	Yayıllı. Irak
10200	<i>Alyssum syriacum</i> Nyar.	Yayıllı. Suriye
6600	<i>Alyssum smolikanum</i> Nyar.	Yayıllı. Yunanistan
3420	<i>Alyssum tenium</i> Halacsy	Yayıllı. Yunanistan
11900	<i>Alyssum trapeziforme</i> Nyar.	Yayıllı. Türkiye
17100	<i>Alyssum trodii</i> Boiss.	Yayıllı. Türkiye
6230	<i>Alyssum virgatum</i> Nyar.	Yayıllı. Türkiye



Resim 1 *Alyssum virgatum* Nyar.'a ait fotoğraf

1.3 Ağır Metallerden Nikel

Fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 gr/cm^3 'ten daha yüksek olan metaller “ağır metaller” olarak adlandırılır. Bunların başlıcaları krom, demir, bakır, nikel, çinko, kobalt, civa, kurşun, kadmiyum olmak üzere 60'tan fazla metal bulunmaktadır. Bu metaller doğada genellikle silikat, karbonat, oksit ve sülfür halinde güçlü bileşikler olarak veya silikat mineralleri içinde tutulur halde bulunurlar (Baba *et al.* 2009).

Ağır metaller asıl kayaçlarındaki derişimlerine bağılı olarak tüm dünyada farklı bölgelerde değışen seviyelerde bulunurlar. Örneğın; Ni, Cr, Co serpentin topraklarda bulunurken Zn, Pb ve Cd kalamın topraklarda yüksek seviyededir. Ağır metaller çevrede kalıcıdır ve temizlenmeleri güçtür (Shaw *et al.* 2004).

Bir metalin yaşamsal olup olmadığı söz konusu organizmaya bağılı olarak değışir. Örneğın; nikel bitki metabolizmasında toksik etki gösterirken hayvanlarda iz elementi olarak bulunması gerekir. Ağır metalin etkisi ve etkileme biçimi konsantrasyona göre değışiklik gösterir (Duffus and Worth 1996).

Potansiyel toksik iz elementler de toprakların kirlenmesine neden olan önemli kirleticiler olarak dikkate alınmaktadır. Bu elementler doğada tolerans değerlerini aşan bir konsantrasyona ulaştıklarında hızlı bir şekilde ekosisteme yayılarak bitki, hayvan ve insan için toksik etkilere neden olurlar. Yaşayan organizmalara zarar veren, küçük miktarlarda dahi doğal sistemi bozan bu elementler Adriano (1986) tarafından iz elementler olarak tanımlanmıştır. Başlıca toksik iz elementleri belirtecek olursak; arsenik (As), bor (B), krom (Cr), kadmiyum (Cd), bakır (Cu), kurşun (Pb), mangan (Mn), civa (Hg), molibden (Mo), nikel (Ni), selenyum (Se) ve çinko (Zn) olarak belirtebiliriz.

Baker vd. (1990), metal hiperakümülatörü olarak bilinen bitkilerin, diğer bitkilere oranla daha yüksek konsantrasyonlarda metal ihtiyaçları olduğunu ve bu özellikleri ile metal açısından zengin olan topraklarda endemik bitkiler olduklarını belirtmişlerdir. Çünkü ultramafik kayaçların üzerinde gelişen topraklar yüksek derişimlerde Co, Pb, Ni gibi toksik metal içermekle tanımlanmaktadır (Sequeira and DaSilva 1991). Kontamine olmamış doğal topraklardaki Ni konsantrasyonu 100 mg/kg^{-1} 'dan düşüktür. Ancak, serpentin gibi minerallerce zengin, ultra bazik püskürük kayaçlardan oluşan topraklarda Ni konsantrasyonu 5000 mg/kg^{-1} 'a kadar ulaşabilir (Kaçar ve Katkat 2006).

Araştırmacılar bazı bitki türlerinin metal ağırlıklı topraklarda endemik olduğunu ve ağır metallerin ve diğer toksik bileşenlerin alışılmış miktarından daha fazlasını tolere edebileceğini bildirmişlerdir (Banuelos *et al.* 1997, Blaylock and Huang 2000, Raskin and Ensley 2000, Dahmani-Muller *et al.* 2000).

Minguzzi vd. (1948) tarafından yapılan çalışmada, *Alyssum bertolonii* Desv. bitkisinin kuru materyalinde yaklaşık 10000 ppm (%1) Ni bulunduğu tespit edilmiştir (Brooks *et al.* 1997). Gabrielli vd. (1990) yaptığı çalışmalarda *Alyssum* cinsinin metal biriktirici türlerinin aynı metalle kirlenmiş topraklarda gelişen ve biriktirici olmayan türlere oranla nikel çok fazla tolerans gösterdiği belirtilmiştir. *Alyssum* cinsinin bazı türleri nikel metalini kuru yaprak biokütlesinin %3'üne varan derişimlerde biriktirme özelliğine sahip olduğu için ekolojik değeri olan bitki grubudur (Kramer 1997).

Nikel (Ni), bitkiler için çok az miktarda da olsa gerekli olan ve bitki gelişimi için mutlak gerekliliği en son keşfedilen bitki besin elementidir (Marschner 1995, Chen *et al.* 2009). Azot metabolizması için gereksinim duyulan temel bir element olan Ni, bitkilerde üreaz ve hidrogenaz enzimlerinin yapısında ve aktivitesinde rol alır (Chen *et al.* 2009, Akinci ve Akinci 2011, Akinci ve Ongel 2011). Ancak bitki, hayvan ve insan bünyesinde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu karsinojen etkiye sahip olabilir (Marschner 1995, Grimsrud and Andersen 2010).

Yeryüzünde bulunma sıklığı 24. sırada olan nikelin ortalama derişimi %0,008'dir. Nikel, fueloil ve bunun kalıntılarının yakılmasıyla, belediye atık insineratörleri aracılığıyla, kömürün yakılmasıyla, nikel madeninin işlenmesiyle ve rafinerasyonu ile atmosfere karışmaktadır (Haghiri 1973). Nikelin fiziksel ve kimyasal özellikleri, Çizelge 1.2'de verilmiştir (The Merck Index 1983).

Çizelge 1.2 Nikel metalinin kimyasal ve fiziksel özellikleri

Atomik numarası	28
Mol kütlesi	58,69 g/mol
Yoğunluğu	8,908 g/cm ³ (20 °C)
Kaynama sıcaklığı	2913 °C
Erime sıcaklığı	1455 °C
Elektron dağılımı	[Ar] 3d ⁸ 4s ²

Nikelin kullanım alanlarının başında paslanmaz çelik, bakır-nikel alaşımları ve korozyona dayanıklı alaşım üretimleri gelir. Saf nikel ise kimyasal katalizör olarak elektrolitik kaplamada ve alkali pillerde, miktatıslarda, elektrik fişlerinde, tıbbi protezlerde, makine parçalarında, madeni para yapımında kullanılmaktadır (Haghiri 1973).

Nikel, kilyet bileşiklerini kolaylıkla oluşturduğu için, bitkilerdeki enzimlerde ve fizyolojik aktif merkezlerde bulunan ağır metallerle yer değiştirir. Nikel üreaz ve birçok hidrogenaz enzimlerinin metal yapı maddesidir (Kaçar ve Katkat 2006).

Bitkide ihtiyaçtan fazla nikel bulunduğunda klorofil sentezi ve yağ metabolizması olumsuz yönde etkilenir. Bu etkiyle bitkinin kökleri gerekli besin elementlerini yeterli seviyede alamadığından bitkide besin elementleri eksiklikleri meydana gelir (Zengin ve Munzuroğlu 2005).

Toksik madde içeren ağır metaller, özellikle bakır (Cu), çinko (Zn), nikel (Ni) ve kurşun (Pb) toprak yüzeyine yüksek konsantrasyonlarda lağım suyu içeren sulu çamur bırakırlar (Schmidt 1997), bunlar gıda zinciri içerisine taşınabilir, yüksek toksik madde içermelerinden dolayı, insan ve hayvan sağlığı ve ürün üretimi üzerinde bir tehdit unsuru olabilirler (Korentajar 1991). Ağır metaller su ve tarımsal ekosistemlerden gıda zincirine girebilir ve insan sağlığını doğrudan tehdit edebilirler (Chen *et al.* 2001).

Nikelin gerek insan gerekse hayvan metabolizmasındaki fizyolojik rolü oldukça önemlidir. Tavşanlarda ve köpeklerde bağırsak dışındaki dokularda bulunan nikel, insülin hormonunun kan şekerini düşürme etkisini artırır. Yüksek dozlardaki Ni ise yağ metabolizmasını değiştirir. İnsanlarda ise, adrenalinin kan basıncını yükseltme etkisine karşı bir panzehir görevi yapmaktadır (Davies and Stewart 1995).

1.4 Hiperakümülatör Bitkiler ve Fitoremediasyon

Topraktaki metal iyonu derişimlerinden bağımsız olarak, yapraklarında kuru kütle bazında 1000 mg/kg'dan fazla Pb, Ni, Co, Cu, Cr veya 10000 mg/kg'dan fazla Zn ve Mn içeren bitkiler hiperakümülatör olarak isimlendirilmektedir (Raskın *et al.* 1997).

Bitkiler normal büyümelerini ve gelişimlerini sürdürebilmek için topraktan ve sudan ağır metalleri alabilme ve bunları dokularında biriktirebilme kabiliyetine sahiptir. Bu ağır metaller Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo ve Ni olarak sayılabilir (Langille and MacLean 1976). Bazı bitkiler ise bilinen biyolojik fonksiyonları olmayan ağır metalleri bile biriktirme kabiliyetine sahiptir. Bu ağır metaller ise Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se ve Hg olarak sayılabilir (Hanna and Grant 1962, Baker and Brooks 1989). “Hiperakümülatör Bitkiler” diyerek bu tanımı ilk kez kullanan ve literatüre kazandıran Brooks toprak üstü bünyesinde kuru ağırlık olarak %0,1 (1000 µg/g) oranından daha fazla miktarda Ni, Co,

Cu, Cr veya Pb ve veya yapraklarında %1 oranında (10000 µg/g) Zn biriktirebilen bitkilerin olduğunu ortaya koymuşlardır.

Metal hiperakümüasyonu metal içerikli topraklara ekofizyolojik bir adaptasyondur (Maywald and Weigel 1997). Boyd and Martens (1992), hiperakümüasyonun oluşum nedenini beş hipotez ile açıklamışlardır. Bunlar;

1. Bitkilerin elementlere karşı toleransları
2. Kuraklığa dayanma stratejisi
3. Metal toleransı az olan bitkilerle rekabetten kaçmak
4. Elde olmayan metal alımı
5. Otçul hayvanlardan ve patojenlerden korunmadır.

Baker vd. (1990), metal hiperakümülatörü olarak bilinen bitkilerin, diğer bitkilere oranla daha yüksek konsantrasyonlarda metal ihtiyaçları olduğunu ve bu özellikleri ile metal açısından zengin olan topraklarda endemik bitkiler olduklarını belirtmişlerdir.

Reeves vd. (2004), yaptıkları araştırmalar sonucunda dünya çapında hiperakümülatör bitkiler için Türkiye’de yeterli bir potansiyelin olduğunu belirtmişlerdir. Dünya çapında taksonomik olarak bilinen hiperakümülatör bitki türlerinin yaklaşık dörtte üçü (317 takson ve 17 familya) Ni hiperakümülatörüdür (Baker *et al.* 2000, Reeves and Baker 2000, Ingle *et al.* 2005).

Brooks vd. (1977, 1979); Adıgüzel vd. (2002)’in çalışmalarında bazı *Alyssum* bitki türünün 100 den fazla türünün olduğu ve bu türlerin de birçoğunun Anadolu’da yetiştiği ve Ni belirleyicisi olabileceği vurgulanmıştır.

Reeves vd. (2000), son yaptıkları araştırmalara dayanarak 300000’i aşkın yüksek yapılı bitkinin yalnızca 418 tanesinin en az bir element için hiperakümülatör olduğunu belirtmişlerdir.

Baker vd. (2000), bitkilerin hiperakümülatör olabilmeleri için civayı (Hg) en az 10 ppm, kadmiyumu (Cd) 100 ppm, kobalt (Co), krom (Cr), bakır (Cu) ve kurşunu (Pb) 1000 ppm veya çinko (Zn) ve nikeli (Ni) 10000 ppm akümüle etmeleri gerektiğini belirtmişlerdir. Bugüne kadar en az 45 bitki familyasından yaklaşık 400 türün hiperakümülatör olarak belirlendiğini ve bu türlerin büyük bir çoğunluğunun nikel (Ni), yaklaşık 30 tanesinin kobalt (Co), bakır (Cu) veya çinko (Zn), çok az bir miktarının da mangan (Mn) ve kadmiyum (Cd) hiperakümülatörü iken kurşun (Pb) hiperakümülatörüne henüz rastlanmadığını belirtmişlerdir.

Brooks vd. (1979), *Alyssum* olarak tanımlanan 168 bitki türünün nikel için hiperakümülatör olup olmadığının anlaşılması için Ni içerikleri saptamıştır. Bu çalışmada 14'ü Avrupa türü olmak üzere toplam 31 tane hiperakümülatör bitki saptamışlardır (1 gr kuru ağırlıkta >1000µg).

Robinson (1997), doğal olarak binlerce yıldır sorun olmayan ağır metallerin, günümüzde tümüyle insanoğlunun etkinlikleri sonucu son derece önemli bir sorun olmaya başladıklarını ve günümüzde, sadece büyük kent civarlarını ve tarım alanlarını değil, bütün doğayı tehdit etmeye başladıklarına dikkat çekmişlerdir. Tüm bitkilerin buldukları ortamlardaki metalleri topraktan kaldırdıklarını, mutlak gerekli mikroelementler arasında yer alan çinko, mangan, nikel ve bakır'ın hiperakümülatör olmayan bitkiler tarafından genellikle metabolik ihtiyaçlarından fazla alınmadıklarını belirtmişlerdir. Buna karşın hiperakümülatör bitkilerin metalleri ihtiyaç duyduklarından daha fazla miktarlarda topraktan kaldırdıklarını ve bünyelerinde biriktirebildiklerini belirtmişlerdir. Dünya üzerinde bir veya daha fazla ağır metali hiperakümüle ettiği bilinen, karada yaşayan yaklaşık 400 bitki türünün olduğunu ve bunlara ek olarak denizde yaşayan türlerin de bulunabileceğini belirtmişlerdir. Yedi farklı element için familya isimleri ve tür sayıları şöyledir; kadmiyum (*Brassicaceae*) 1 tür, kobalt (*Lamiaceae, Scrophulariaceae*) 26 tür, bakır (*Cyperaceae, Lamiaceae, Poaceae, Scrophulariaceae*) 24 tür, mangan (*Apocynaceae, Cunoniaceae, Proteaceae*) 11 tür, nikel (*Brassicaceae, Cunoniaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae, Violaceae*) 290 tür, selenyum (*Fabaceae*) 19 tür, talyum (*Brassicaceae*) 1 tür ve çinko (*Brassicaceae, Violaceae*) 16 tür.

Tarihsel olarak hiperakümülatör olan bazı yabancı bitki türleri, Avrupa’da maden arayıcıları için orada metal cevheri olduğunun göstergesi olarak kabul edilirdi (Barak 1995). Maden aramalarında kullanılan belirtgen bitkilerin, toprak kirliliğinin ortaya çıkartılmasında ve bitkilere toksik etki yapan element fazlalığının giderilmesinde (fitoremediasyon) kullanılabileceği önerilebilir (Özdemir *et al.* 2003, Kocaer ve Başkaya 2003, Uysal 2004, Özdemir 2005).

Chaney (1995), zehirli atık maddeleri fazlaca tüketen bitkiler üzerine çalışmış ve bir gün bu bitkileri maden ocakları doldurulmuş araziler, nükleer atıkların döküldüğü yerler, çiftlikler, şehir ve kırsal arazilerde Pb, Cd, Zn, Ni ve radyoaktif izotoplarca (uranyum ve kobalt) kirlenmiş bölgelerin temizlenmesinde kullanmış ve bu toplayıcı bitkileri hiperakümülatör (metal-scavenging) olarak adlandırmıştır.

Bitkilerin metalleri akümüle etme kapasiteleri, zararlı bir özellik olarak kabul edilir. Çünkü bazı bitkiler doğrudan veya dolaylı olarak, insanların beslenme yoluyla almış oldukları zehirli ağır metallerin bir bölümünün sorumluluğuna sahiptirler (Brown 1985). “Metal hiperakümülatörler” diye adlandırılan doğal olarak ortaya çıkan bitkiler, ekimi yapılan bitkilere kıyasla 10 ile 500 kez daha yüksek düzeyde element toplayabilmektedirler (Ow 1996).

Günümüzde ağır metal kaynaklı toprak kirliliği dikkat çeken bir konu haline gelmektedir. Kirliliği gidermek amacıyla ağır metallerin kaynakları ve yayılımları, insan sağlığı ve çevre üzerine etkileri araştırılarak bir takım çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesi “bitkisel arıtım” (fitoremediasyon) metodudur. Bitkisel arıtım, ağır metaller ile birçok organik ve inorganik kirleticinin çevreden arıtılmasını amaçlayan ve doğaya en az tahribatı veren bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır (EPA 2000).

Fitoremediasyon çevredeki kirleticilerin alınmasında ya da onların zararsız hale getirilmesinde yeşil bitkilerin kullanımı olarak tanımlanır (Raskin *et al.* 1997). Chaney vd. (1997), bu süreci “Yeşil İyileştirme” olarak adlandırmaktadır. Bitki anlamındaki “*phyto*” ile ıslah anlamındaki “*remediation*” kelimelerinden türetilen ve 1991’de

terminolojiye giren “*phytoremediation*”, “*bioremediation*”, “*botanical remediation*” ve “*green remediation*” olarak da anılmaktadır (EPA 2000). 1991 yılında kullanılmaya başlanan fitoremediasyonun ilk uygulama alanları, yapay sulak alanları ile petrol döküntü alanları olmuştur (EPA 2000).

Kimyasal arıtma yerine kullanılan ve kısaca bitkiler kullanılarak topraktan yerinde (*in situ*) organik ve metal kirleticilerin giderimi olarak tarif edilen fitoremediasyon yöntemi, yeni ortaya konmuş, ekonomik ve ekolojik olması ile özel donanım gerektirmemesi ve uygulanan bölgenin yeniden kullanılabilmesine imkan vermesi gibi avantajlara sahip olması nedeniyle günümüzde tercih edilen bir yöntem haline gelmektedir (İnt. Kyn. 2).

Salt vd. (1995), bitkileri kullanarak toprakları ve suları ağır metallere temizleme yöntemi olarak bilinen fitoremediasyon işleminin dört farklı yöntemi içerdiğini belirtmişlerdir. (1) fitoekstraksiyon; bitkilerin topraklardaki ağır metalleri kökleri ile alması ve toprak üstü kısımlarında biriktirmesidir, (2) rizofiltrasyon; kök bölgesindeki ağır metallerin bitkilerin kökleri içerisine akümüle edilmeleridir, (3) fitostabilizasyon; bazı bitki türlerinin köklerini kullanarak toprak ve yeraltı suları içerisindeki ağır metallerin hareketsiz hale getirilmesidir, (4) fitovolatilizasyon; ağır metallerin veya diğer kontaminatların bitki kökleri tarafından alımı ve terleme yolu ile atmosfere serbest bırakılmalarıdır.

Reeves vd. (2001), birçok arazi çalışması sonucunda (Ezine, Dursunbey-Kütahya, Fethiye-Marmaris, Fındıklı, Pozantı-Çamardı ve Ankara çevresi) *Alyssum pinifolium*, *Aethionema dumanii*, *Thlaspi carianse*, *Silene cserei ssp. aeoniopsis*, *Cochlearia sempervivum* ve *Centaurium serpentinicola* gibi ender türleri toplamışlar ve çok sayıda *Alyssum*, *Thlaspi* ve *Cochlearia*'nın kuru maddede %2'den fazla Ni depolayan türlerini bulmuşlardır.

Memon vd. (2001), bitkilerde ağır metal biriktirme ve detoksifikasyon mekanizmasını çalıştıkları makalelerinde son yıllarda çevresel temizlemenin yapılabilmesi için endemik veya genetik olarak elde edilmiş bitkilerin geliştirilmelerinde fark edilir gelişmeler

yaşandığını bildirerek bitkilerle iyileştirmenin önemi ve potansiyel ticari uygulamasını da tartışmışlardır.

Toprakları bitkilerle iyileştirmenin amacı sadece biyolojik anlamda kirleticilerin ayrışmasını ve taşınmasını artırmak değil aynı zamanda toprak kalitesini de korumaktır (Karthikeyan and Singh 2002)

Thlapsi, *Urtica*, *Chenopodium*, *Polygonum sachalase* ve *Alyssum*, *Brassica Juncea* gibi bazı bitkilerin kadmiyum, krom, bakır, kuşun, nikel ve çinkoyu bünyelerinde biriktirme yetenekleri vardır. Bu nedenle, söz konusu bitkilerin yetiştirilmesi kirlenmiş toprakların arıtılmasında indirekt bir metot olarak kabul edilmektedir (Mulligan *et al.* 2001). Örneğin, çoğu bitkiler yaklaşık 100 ppm'lik bir çinko birikiminde toksisite semptomları gösterirken, en yaygın metal hiperakümülatörü olarak bilinen *Thlapsi caeruledcens*'in 26000 ppm'in üzerinde bir birikimi sağlayabildiği literatürden bilinmektedir (Lasat 2000).

Reeves vd. (2004), Türkiye'de endemik olarak yetişen ve Ni hiperakümülatörü bitkilerden *Alyssum*'un bazı çeşitlerinde Ni derişimlerini belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre g/kg olarak *Alyssum cassium* 5,59-20, *Alyssum callichroum* 0,033-10,9, *Alyssum huber-morathi* 1,22-13,5, *Alyssum masmenaeum* 5,48-24,3, *Alyssum pinifolium* 6,67-12,6 ve *Alyssum pterocarpum* 1,19-6,74 g Ni/kg bitki olduğu belirtilmiştir.

1.5 Antimutajenite ve Tıbbi Bitkilerin İçerdiği Önemli Antimutajenik Bileşikler

Antimutajenite; mutajenik maddelerin mutajen veya karsinojen etkilerinin ortadan kaldırılması veya bunların DNA ile etkileşimlerinin önlenmesidir. Genellikle antimutajenik maddeler etki etme şekillerine göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olmak üzere ikiye ayrılır (Nakasugi *et al.* 2000).

Desmutajenler, mutajen ajanların hücreye girişini bloke eden veya onları DNA ile etkileşimlerinden önce etkisiz hale getiren antimutajenik ajanlardır (Samejima *et al.* 1995, Özbek 2006). Desmutajenlerin etki mekanizmalarına, nitrozolandırma

reaksiyonlarının (nitrosation reactions) engellenmesi, serbest oksijen radikallerinin (ROS: reaktif oksijen türevleri) giderilmesi, faz I ve faz II detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu gibi örnekler verilebilir (Nakasugi *et al.* 2000).

Biyoantimutajenler ise mutajen maddelerin DNA ile etkileşmesinin ardından genetik materyal replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarının işleyişini düzenleyerek antimutajenik etkinlik gösteren ajanlardır. Bu maddeler desmutajenlerden farklı olarak, mutasyonun meydana gelmesinin ardından etkinlik kazanırlar. Mutajenlerin zararlı etkilerine maruz kalmış hücrelerde DNA polimeraz I ve III enzimlerinin sentezini arttırmak ve error-prone DNA tamir mekanizmasının etkinliğini azaltırken error-free DNA tamir mekanizmasının etkinliğini arttırmak biyoantimutajenlerin etki mekanizmalarına örnek olarak verilebilir (Samejima *et al.* 1995, Özbek 2006).

Günümüzde mutajen maddeler ile başta kanser olmak üzere birçok genetiksel hastalığın ortaya çıkışının ilişkilendirilmesi, mutajenlerin etkilerini ortadan kaldırarak bu hastalıkların meydana gelişinin önlenmesinde veya tedavilerinde etkili olabilecek antimutajenik kimyasalların araştırılmasına yönelik çalışmalara ivme kazandırmıştır (Feil and Metzger 2007). Bu noktada, doğal kökenli bileşenlerin en temel kaynağı konumundaki bitkiler, yapılarında bulundukları zengin kimyasal madde içeriği ile antimutajenik madde araştırmalarının en gözde grubunu oluşturmaktadır (Özbek 2006).

Tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen sekonder metabolitler üzerine yapılan araştırmalar; çeşitli hastalıkların tedavilerinde kullanılan sentetik kimyasalların bazılarında görülen tehlikeli yan etkilerin bitkisel kökenli bileşiklerde daha az oranda ortaya çıktığını göstermiştir. Ayrıca bitkisel kökenli preparatların genellikle tek bir etkiye sahip sentetik bileşenlere nazaran daha çok yönlü etkilerinin olduğu da bilinmektedir (Tsukagoshi and Ophashi 1974, Özbek 2006).

Yapılan birçok çalışmada bitkisel sekonder metabolitlerin antiameboik, antioksidan, antihemoroid, antidiabetik, antihipertansif, antipiretik, antihepatotoksik, anti-inflamatuar, analjezik, antitümör ve antikanser biyoaktivitelerinin olduğu ifade

edilmiştir (Kim *et al.*2000, Cimanga *et al.* 2006, Rahimuddin *et al.* 2007, Srivastava and Gupta 2007, Backhouse *et al.* 2008b).

Farmakolojik olarak önemli bitki sekonder metabolitlerinden bazıları; alkaloidler, askorbik asit, tokoferoller, isoflavonlar, terpenoidler, glikozitler, flavonoidler, uçucu yağlar, askorbik asit, taninler, polifenolik bileşiklerdir (Briskin 2000).

1.5.1 Polifenoller

Polifenoller bitki orijinli gıdaların yaygın bileşenleri olup çok geniş molekül çeşitliliğine sahip bir gruptur. Polifenoller aromatik halkalar üzerinde birkaç hidroksil grup taşıyan polifenil bir yapıya sahip olabileceği gibi fenolik asit ve fenolik alkoldeki gibi moleküle bağlı sadece bir fenil halkasından da oluşabilirler. Kimyasal yapıları nedeniyle polifenoller tıbbi açıdan oldukça önemli etkilere sahiptirler. Polifenollerin özellikle antikarsinogen aktiviteleri dikkat çekicidir. Polifenoller karsinogenik kimyasal maddelerin yan etkilerini; karsinogenleri detoksifiye ederek, karsinogenlerin alınımını inhibe ederek, aktivasyonlarını ve yapılarını bozarak, DNA'ya bağlanmasını önleyerek ve DNA tamir mekanizmasının doğruluğunu artırarak önlerler. Ayrıca araşidonik asit metabolizmasını inhibe ederek ve oksijen radikalleriyle reaktif elektrofilleri gidererek aktivite gösterirler. (Özbek 2006, Nicenametlia and Taruscio 2006, Nichols and Katiyar 2010).

Fenolik bileşiklerin sahip olduğu antioksidan aktivite esas olarak metal şelatlama, singlet oksijen giderme, hidrojen verici ve indirgeyici ajan olarak davranmalarını sağlayan redox özelliklerinden kaynaklanır (Ancos *et al.* 2000). Ayrıca fenoller ROS radikallerini süpürücü özelliğe sahiptir ve bu özellik fenolik molekülün aromatik halkası üzerindeki hidrojen-donating hidroksil grupların pozisyonuna-sayısına, fenolik hidrojenlerin mevcudiyetine ve hidrojen vererek oluşan fenoksi radikallerinin kararlı hale geçebilmesine bağlıdır (Silva *et al.* 2000, Chai *et al.* 2004).

Polifenoller içerdikleri fenil halkalarına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elementlere göre beş gruba ayrılırlar. Polifenollerin bu grupları; flavonoidler, fenolik

asitler, fenolik alkoller, stilbenler ve lignanlar şeklinde sıralanabilir (Archivio *et al.* 2007).

1.5.2 Flavonoidler

Bitki pigmentleri olarak bilinen flavonoidler, polifenolik bileşikler grubuna dahil olup bitkilerin herhangi yerinde oluşabilirler (Wenzel 2004, Chai *et al.* 2004, Galati and O'Brien 2004). Doğal olarak oluşabilen 4000 farklı flavonoid tanımlanmış ve bu sayı gün geçtikçe artış göstermektedir (Galati and O'Brien 2004).

Flavonoidler moleküler yapılarına göre çeşitli gruplara ayrılabilirlerse de; temelde flavonlar, flavononlar, kateşinler ve antosiyaninler olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Jang *et al.* 2008).

Sağlık üzerine olan yararlı etkilerinden dolayı bilim açısından her zaman dikkat çekici olmuşlardır (Backhouse *et al.* 2008a, 2008b, Cosentino *et al.* 2008, Zhang and Chen 2008, Ntandou *et al.* 2010). Son yıllarda çeşitli karsinojenlere, mutajenlere ve genotoksinlere karşı koruyucu etkilerinin gösterilmesinden ve antioksidan özelliklerinden dolayı flavonoidlere ilgi artmıştır (Pirker *et al.* 2006). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar gıdalarla birlikte flavonoid alımının kalp-damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir. Yine bu yönde yapılan çalışmalar, flavonoid alımı ile ömür uzunluğu arasında korelasyon olduğunu açığa çıkarmıştır (Nijveldt *et al.* 2001).

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

Flavonoidlerin en önemli etkilerinden biri serbest oksijen radikallerine karşı koruma sağlamalarıdır. Bununla birlikte, yapılan *in vitro* çalışmalar flavonoidlerin anti-inflamatuvar, antialerjik, antiviral, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin

olduğunu göstermiştir (Tshikalange *et al.* 2005, Cimanga *et al.* 2006, Ooi *et al.* 2006, Kuete *et al.* 2006, Gulluce *et al.* 2010).

1.5.3 α -Tokoferol

E vitaminin bir formu olan α -tokoferol sekiz (α -, β -, δ -, γ -tokoferol ve α -, β -, δ -, γ -tokotrienol) bileşenden oluşan bir grup içerisinde yer almaktadır. Bu bileşenler kimyasal yapılarındaki doygunluk durumları ve metil gruplarının yerleşim şekillerine göre birbirinden ayrılmaktadır. Bununla birlikte, yapılan araştırmalar insan vücudunda en baskın oranda bulunan E vitamini formunun α -tokoferol olduğunu göstermiştir (Nikolić *et al.* 2004, Özbek 2006).

α -Tokoferol serbest radikal reaksiyonlarının yayılımını engelleyen zincir kırıcı özelliğe sahip bir antioksidan ve yağda eriyebilen önemli bir vitamindir (Ramanathan *et al.* 2005).

Bilimsel literatürde bazı E vitamini formlarının insan kanser hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği ve belirli kanser hücrelerine karşı seçici olan apoptozis mekanizmalarını uyardığı rapor edilmiştir (Cameron *et al.* 2003).

1.5.4 Askorbik asit

C vitamini olarak da bilinen askorbik asit, etkili biçimde serbest radikalleri toplama özelliğine sahip kuvvetli bir antioksidan maddedir. Yapılan çalışmalar bu maddenin bilinen birçok mutajene karşı antimutajenik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (Gentile *et al.* 1998).

Askorbik asidin antimutajenik aktivitesindeki bilinen etki mekanizmalarına; hücrelerde bulunan α -tokoferolün rejenerasyonuna katkı sağlaması ve genetik materyalde hasarlara sebep olan serbest radikallerin bu etkilerini antioksidan özelliği ile ortadan kaldırması örnek olarak verilebilir (Özbek 2006).

Son yıllarda askorbik asitin genotoksik ve antigenotoksik etkilerine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Hartman and Shankel 1990). *In vitro* ve *in vivo* ortamlarda insan lenfositleri (Susan *et al.* 1995), *Allium* mikronükleus testi (Panda *et al.* 1995) ve *Drosophila* wing spot testi (Graf *et al.* 1998) gibi farklı ökaryotik sistemlerde yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin çoğu askorbik asitin antimutajenik olduğunu göstermiştir (Konopacka *et al.* 1998). Oksidatif hasara karşı askorbik asit antioksidan koruma özelliği üstlenmesine rağmen, bazı durumlarda antioksidan işlevin yerine ko-genotoksik özelliğe sahip olduğu görülmüştür (Kaya 2003).

1.5.5 Karotenoidler

Karotenoidler; sarı, turuncu ve yeşil renkteki sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunmaktadır. Domates, havuç, portakaldan elde edilen çeşitli karotenoid fraksiyonlarının antimutajenik etkileri (hidrokarbon karotenoidleri, ksantofiller, karotenoid esterleri) iki farklı mutajenle indüklenmiş *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde araştırılmış ve tüm bu fraksiyonların antimutajenik etki gösterdikleri kanıtlanmıştır (Raucher *et al.* 1998). Örneğin; önemli karotenoidlerden biri olan β -karoten yönünden zengin gıdaların tüketilmesi ile kanser olma riski arasında ters orantının olduğu bilinmektedir (Peto *et al.* 1981, Scolastici *et al.* 2008). Ayrıca likopen ile yapılan benzer çalışmalarda; kuvvetli antioksidan etki gösteren bu maddenin; kalp hastalıklarını önleyici, anti-inflamatuvar, antimutajenik ve antikarsinojenik özellikte olduğu belirlenmiştir (Bhuvanewari and Nagini 2005, Scolastici *et al.* 2008).

Karotenoidlerin mutasyon ve kanser gelişimi üzerine olan engelleyici etkilerinin mekanizması; onların serbest oksijen radikallerini inaktive etme, hücrel detoksifikasyon olaylarına olumlu yönde katkıda bulunma, hücre proliferasyonunu düzenleme, hücreler arası haberleşme oranını artırma, hücre döngüsünü sınırlama ve sinyal transdüksiyon yollarının modülasyonunu sağlama gibi özelliklerine dayanmaktadır (Zhang *et al.* 1991, Astrong *et al.* 1997, Pastori *et al.* 1998, Bhuvanewari and Nagini 2005, Scolastici *et al.* 2008, Barcelos *et al.* 2009).

1.6 Mutajenite ve Antimutajenite Araştırmalarında Kullanılan Test Sistemleri

Günlük hayatta sıklıkla kullanılan doğal ya da sentetik kimyasal bileşiklerin büyük çoğunluğu canlıların kalıtsal materyallerinde istenmeyen değişikliklere neden olacak genotoksik ve karsinojenik etkilere sahiptir. Bu kimyasalların olumsuz etkilerinden korunmak; onların tespiti, tanınması ve etkilerinin araştırılması ilkelerine dayanmaktadır. Bu bağlamda birçok maddenin mutajenik ve karsinojenik etkilerini ortaya çıkarmak için uygulanabilecek en akıllıca yaklaşım, deney hayvanları ile yapılan *in vivo* araştırmalardır. Bu testler, kimyasal maddelerin uygulanmasıyla deney sonuçlarının alınması arasındaki sürenin fazla oluşundan dolayı uzun zamanlı testler olarak da adlandırılmaktadır (Petek 1999, Özbek 2006).

Memelilerde mutasyon testlerinin yapılmasında en önemli zorluk memelilerin bu test sistemlerine oldukça az duyarlı olmaları yüzündendir. Bunun yanında mikroorganizmalar mutajenlere karşı çok daha fazla duyarlıdır (Vural 1984).

Uzun zamanlı test sistemleri, mutajenite ve kanser araştırmalarında bilinen en hassas ve en güvenilir test sistemleri olmalarına karşın; yüksek maliyet ve zaman gereksinimlerinden dolayı yüzlerce kimyasalın mutajenik ve karsinojenik etkinliklerinin araştırıldığı öncü testlerde kullanışlı değildir (Özbek 2006).

Bu nedenle araştırmacılar, mutajen veya karsinojen özellikteki kimyasalların bu potansiyellerinin araştırılmasında esas teşkil edebilecek birçok *in vitro* kısa zamanlı test sistemi geliştirmiştir. Uzun zamanlı test sistemlerinin aksine daha kısa sürede sonuç veren ve daha ekonomik olan bu testler; çok sayıdaki kimyasal madde ile yapılacak olan öncü testler için oldukça uygundur. Bu testlerin uygulama esası; test edilen kimyasal maddelerin belirli genetik özelliklere sahip sistemlerde belirli sonuçlar vermesi ve elde edilen bu sonuçlarla test materyalinin mutajenik ya da karsinojenik potansiyeli arasındaki ilişkinin kurulmasına dayanır. Ayrıca bu sonuçların insan da dâhil birçok canlıya uygulanabilir olması genetik kodun evrenselliği ve mutajenite ile karsinojenite

arasındaki korelasyonun yüksek oluşuna bağlanmaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000, Özbek 2006).

Karsinojenlerin taranmasında mutajenitenin esas alınması, iki önemli nedene dayanır:

1. Genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu,
2. Karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşu (Akın 1990).

Çizelge 1.3 Mutajenitenin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar (Akın 1990)

Kısa zamanlı testler	İzlenen genetiksel/biyokimyasal yollar
1. <i>Salmonella typhimurium</i>	Histidin okzotrofları
2. <i>Escherichia coli</i>	Arjinin-triptofan okzotrofları Profaj indüksiyonu Onarım eksikliği olan suşların büyümlerinin inhibisyonu SOS cevabı
3. <i>Bacillus subtilis</i>	DNA onarımı hatalı suşları
5. Çin hamsteri ovaryum	HGPRT (Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz) ve akciğer hücreleri ile lokusunda mutasyonlar
6. Fare karaciğer epitel hücreleri	8-Azaguanine dirençlilik
7. <i>Drosophila melanogaster</i>	Kromozomal hatalar
8. Suriye Hamsteri embriyo hücreleri	Morfolojik transformasyonlar
9. Çin Hamsteri hücreleri, İnsan periferel lenfositleri	Kromozomal hatalar Kardeş kromatit değişimi
10. HeLa hücreleri, fare hepatositleri, insan deri fibroblastları	Programsız DNA onarımı
11. <i>In vivo</i> DNA sentezi	Hata sıklığının artması
12. Soğan ve fasulye kök hücreleri	Kromozom anormallikleri

Kısa zamanlı testler diye bilinen bu testlerle kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin karsinojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Bağcı 1985). Kısa dönemli *in vitro* çalışmalar, kimyasal maddenin bakterilerde mutajenik etkisinin

hücrelerde değişmeye neden olup olmadığı, DNA değişim ve tamiri üzerindeki etkisi memelilerde mutajenik etkisinin araştırılmasını kapsar (Vural 1984).

Mutasyonlar, normal hücre proliferasyonu, reproduksiyon, fizyoloji ve hücre biyolojisinde temel sonuçlar oluşturan DNA ve RNA'daki değişimlerdir. Mutasyonlar doğrudan veya dolaylı sonuçlar gösterebilir fakat aynı zamanda fenotipik değişikliklerle sonuçlanan gen sekansındaki sabit kalıtsal değişimler de gösterebilmektedir. Mutasyonların sonuçlarının tipi ve boyutu, doza, frekansa, uygulama süresine ve başlangıç değişikliklerine organizmanın verdiği karşılığın sebep olduğu sekonder etkilere bağlıdır (Barile 2008).

Genetik mutasyonlardan kaynaklı değişimler, genetik bilginin transferine engel olur ve genellikle kendini letal bir etki olarak gösterir. *In vitro* testlerin avantajları birçok sayıda kimyasal hızlı bir şekilde değerlendirme imkanı vermesi, mutajenite ve karsinojenitenin mekanizmasını önermesi, hayvansal test sistemlerinin azalması, insan ve hayvan risk tayinine katkı sağlaması olarak sayılabilir (Barile 2008).

Mutajenlerin ya da karsinojenlerin belirlenmesi için kullanılan kısa zamanlı test sistemleri, çeşitli modifikasyonlar ile antimutajenlerin veya antikarsinojenlerin belirlenmesini sağlayan test sistemlerine kolayca dönüştürülebilir (Özbek 2006). Bu test sistemleri sitogenetik yöntemler ve mikrobiyal yöntemler olmak üzere iki alt gruba ayrılır (Korkmaz 2005).

1.6.1 Sitogenetik Yöntemler

Bu test sistemleri genellikle; kimyasalların uygulanması ve çeşitli boyama aşamalarının ardından genetik materyaldeki değişimlerin doğrudan mikroskop altında incelenmesi esasına dayanmaktadır (Korkmaz 2005).

In vivo ve *in vitro* sitogenetik testlerin üç farklı tipi klastojeniteyi göstermektedir. Bu ışık mikroskobu testleri kromozomların sayısı veya yapısındaki kimyasal olarak indüklenen değişimleri belirlemek için kullanılmaktadır. Özellikle hücre kültürü

adaptasyonları çok daha kullanışlı, ekonomik ve birçok bileşiği görüntüleme kabiliyetine sahiptir. Sitogenetik çalışmaları, çevresel olarak ya da çalışma ortamında klastojenlere ve radyasyona maruz kalan belirli populasyonlar için (Barquinero 1993) ya da bireysel olarak etkilenme dozunu saptamak için kullanılabilir (Fender and Wolf 1998, Sram *et al.* 1998). Kimyasalların mutajenliğini araştırmada kullanılan en yaygın sitogenetik yöntemler, yapısal kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleridir (Albertini *et al.* 2000). Bu testler *in vivo* olarak laboratuvar hayvanlarında (Topaktaş ve Speid 1990, Desesso *et al.* 2000), *in vitro* olarak da insan kan lökositleri, mesane, mide nasal ve sperm hücreleri ile çeşitli kültür hücrelerinde uygulanabilmektedir (Surralles *et al.* 1998). Bu test sistemleri dışında *Allium* test, kimyasal mutajenlerin, kirleticilerin ve bitki ekstraktlarının *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde sitogenetik etkilerinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

1.6.2 Mikrobiyal Yöntemler

Genellikle bakterilerin kullanıldığı mikrobiyal yöntemler, kısa zamanlı test sistemleri içerisinde yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında yer alır. Mikroorganizmaların basit besiyerlerinde kolayca üremesi, kısa hayat devirlerine sahip olmaları ve buna bağlı olarak yapılan uygulamaların pratik, hızlı ve düşük maliyetli olması gibi özellikler bu test sistemlerinin genel avantajlarıdır (Mortelmans and Zieger 2000).

Mikrobiyal yöntemlerin kullanıldığı mutajenite ve antimutajenite testlerinin kullanım alanları 7 başlık altında toplanabilir (Barış 2007);

1. Çeşitli kimyasalların potansiyel mutajenik ve karsinojenik etkinliklerinin araştırılması
2. Kompleks içerikli materyallerden biyolojik olarak etkin bileşiklerin saflaştırılması
3. Prokarsinojenlerin öncül veya nihai metabolitlerinin saptanması

4. Çeşitli vücut sıvılarının analizine bağlı olarak, insanların mutajenlere ve karsinojenlere maruz kalma potansiyelinin takibi
5. Mutajenik, antimutajenik, karsinojenik ya da antikarsinojenik bileşiklerin etki mekanizmalarının aydınlatılması
6. Mutasyonlar ve konukçu organizma ilişkileri (host mediated) ile ilgili araştırmalar
7. Mutajen veya karsinojen kimyasalların sebep olduğu özgül DNA hasarlarının sınıflandırılmasına yönelik çalışmalar

Mikrobiyal yöntemlerden yaygın olarak kullanılan test sistemlerine, mutant *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin kullanıldığı maya delesyon testi (Yeast DEL Assay), histidin oksotrofu *Salmonella typhimurium* mutant bakteri ırklarının kullanıldığı Ames/*Salmonella* test sistemi ve triptofan oksotrofu *Escherichia coli* mutant bakteri ırklarının kullanıldığı *E. coli* WP2 test sistemi örnek olarak verilebilir (Mortelmans and Riccio 2000, Mortelmans and Zeiger 2000, Kirpnick *et al.* 2005).

Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanları bakteriyel testlerdir. Ames-*Salmonella*/mikrozom test yöntemi (*Salmonella typhimurium*'un TA ve YG suşları), S.O.S kromotest (*Escherichia coli*) bakteriyel test sistemlerinden bazılarıdır. Bakteriyel test sistemleri genellikle dünyanın birçok laboratuvarında güvenle uygulanabilen, mutajen ve karsinojenlerin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen testlerdir (Purchase *et al.* 1978, McMahon *et al.* 1979, De Serres and Ashby 1981). Bu testlerin tercih edilme nedenleri, bakterilerin basit üreme ortamlarında hızlı bir şekilde üreyebilmeleri, ayrıca basit, ucuz ve çabuk uygulanabilir olmalarıdır (Josephy *et al.* 1997).

1.7 Bu Çalışmada Kullanılan Test Sistemleri

1.7.1 *Allium* Testi

Toksisite, test edilen kimyasalların toksik durumlarını belirlemek için hasar derecesinin kullanıldığı makroskobik parametrelerle (büyüme inhibisyonu gibi) birlikte mutajenezi kanıtlamak için kromozom kırık ve hasarlarının oranlarının belirlendiği mikroskobik parametrelerle de ölçülebilir (Grant 1982).

Günümüzde genetik çalışmaların büyük bir bölümü genetik toksikoloji alanındadır (Lüleyap 2008). Genetik toksikoloji hücre ve organizmada kalıtımın mekanizması ve genetik materyal üzerinde çeşitli kimyasalların ve radyasyonun etkilerini ortaya çıkarmaya çalışır (Hoffman 1991). Özellikle son yıllarda yeni genetik analizler geliştirilmektedir. Bu bağlamda gen mutasyonları ile kromozomların sayısında ve yapısında meydana gelen değişimler, genetik toksikolojinin başlıca ilgi odağını oluşturmaktadır. Bu mutasyonların herhangi birini belirlemek amacıyla çok çeşitli *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri geliştirilmiştir. Sıklıkla kullanılan genotoksisite testleri arasında; *Allium* testi (Hoffman 1991), mikronukleus testi (Pereira 2008), *Salmonella* testi (Bulmer 2007), kardeş kromatid değişimi testi (SCE) (Alink 2007), tek hücre jel elektroforezi (SCGE) ve *Drosophila* testlerini (Watanabe 1996) sayabiliriz.

Topraktaki ve sudaki kirliliği belirlemek için pek çok fiziksel ve kimyasal analizler yapılmaktadır. Fakat bu analizler tek başlarına yeterli olmamaktadır. Bu kirleticilerin canlılar üzerindeki etkilerini belirlemek için genotoksisite çalışmalarının yapılması gerekir. (Békaert *et al.* 1999). Kromozom hasarlarının saptanması için en etkin test organizmaları olarak hacim, yapı ve sayı bakımından analizi kolay olan kromozomlara sahip bitki ve hayvanlar seçilmektedir. *Allium cepa*, *Tradescantia paludosa* ve *Vicia faba* bitkileri az sayıda ve monosentrik kromozomlara sahip olmalarından dolayı çevresel mutajenite çalışmalarında en uygun test organizmaları olarak kabul edilmektedirler (Rank and Nielsen 1998, Grover and Kaur 1999, Kong and Ma 1999, Moraes and Jordao 2001, Patra and Sharma 2002, Koca 2008).

Yüksek yapılı bitkiler, çevresel kimyasalların sitotoksik (hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan etkileri), sitogenetik (kromozomlar üzerindeki etkileri) ve mutajenik (genetik değişime neden olan etkileri) etkilerinin mükemmel bir göstergesidir. Bu bağlamda yüksek yapılı bitkiler, kimyasalların kullanımı veya çevresel kirliliğin neden olduğu muhtemel genetik hasarın belirlenmesinde birinci sırada yer alan alternatif test sistemleri olarak deneysel çalışmalarda özgül avantajlara sahiptir. Yani, bitki köklerinin meristematik mitotik hücreleri çevresel kirlleticilerin klastojenitesinin (kromozom kırılması ve/veya buna bağlı olarak kromozom parçalarındaki kayıp, artma ya da düzensizliklerin olması) belirlenmesi için uygun bir sitogenetik materyaldir (Ma *et al.* 1995).

Mutajenlerin belirlenmesi için bitki biyotestleri uzun yıllardan beri kullanılmakta olup; sitogenetik aberasyonlar ve gen mutasyonlarına neden olan çevresel kimyasalların izlenmesi ve denetlenmesi için çok kullanışlı sistemlerdir (Nilan and Vig 1976, Constantin and Owens 1982, Grant 1994).

Bitki biyotestleri arasında en yaygın olarak kullanılanı *Allium* testidir. Bitkilerde kök uçları, toprak veya sudaki kimyasallar ve kirleticilerle temas eden ilk kısımdır. Soğanın (*Allium cepa*) kök ucu sisteminin gözlenmesi, bu bitkinin çevresel kontaminantlar gibi zararlı etkilere karşı özellikle duyarlı olduğunu göstermiştir. Kök hücreleri bazı karışık fonksiyonlu oksidaz enzimlerine sahiptir ve bunlar birçok promutajenin mutajene aktive edilmesinde kullanılan enzimlerdir. Bu aktive edici sistem, reaktif bir metabolit aracılığıyla toksik etkilerini kullanan kimyasalların tespitini kolaylaştırır. Bu sistemin, saf maddeleri, içme sularını, doğal suları ve endüstriyel atıkları ve bitki ekstraktları gibi madde veya çözeltilerin test edilmesinde geniş bir kullanım alanı vardır ve çevresel kimyasalların toksisite sıralaması ve değerlendirilmesinde kullanışlıdır (Fiskesjö 1981, Fiskesjö 1983, Fiskesjö 1985).

Allium test, çeşitli maddelerin sitotoksik ve/veya genotoksik etkilerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek yapılı bitkiler kromozomlarının boyutlarından dolayı sitolojik analizler için uygundur (Fiskesjö 1985). *Allium* testinin sonuçları, ortamdaki canlı organizmalar için direkt veya indirekt riskleri temsil eden belirli

sitotoksik/genotoksik veya mutajenik maddelerin varlığını işaret edebilir. *Allium* testinde büyümedeki gerileme genellikle toksisite ve temel kromozom aberasyonları ise genotoksisite ile açıklanmaktadır (Kovalchuk *et al.* 1998). Bununla birlikte, kromozom aberasyonlarının varlığı büyüme inhibisyonu ile iç içe olaylardır (Fiskesjö 1985).

Çevresel kirleticilerin (atık sular, pestisitler, herbisitler vb.) toksik ve genotoksik etkileri, yaygın olarak kullanılan *Allium* kök büyümesi inhibisyonu testi ile belirlenen etkili konsantrasyon ve farklı uygulama süreleri temelinde mitotik indeks, mitotik anormallikler, kromozom aberasyonları ve mikronükleus oluşumları ile belirlenebilmektedir. Mitotik indeksteki azalma, kontrole göre %22'nin altına düşerse letal etki (Antonsie-wiez 1990), %50'nin altına düşerse subletal etki (Panda and Sahu 1985) değeri olarak kabul edilmektedir. Bu değerler, sitotoksik sınır değerleridir (Sharma 1983). Bitkilerde ve hayvanlarda gözlenen kromozom aberasyonları, kardeş kromatid değişimleri ve mikronükleus oluşumları, kimyasalların DNA ile etkileşime girdiklerini ve hasara neden olduklarını göstermektedir (Saxena *et al.* 2005). Kromozom aberasyonları ve mikronükleus analizleri genotoksitenin değerlendirilmesi için son derece güvenilir analizler olarak gösterilmektedir (Rieger *et al.* 1990, Angelis *et al.* 2000, Panda and Sahu 2002, Patra *et al.* 2003).

Bu test, 1938 yılında Levan adlı araştırmacı tarafından geliştirilmiştir. Test materyali olarak kullanılan *Allium cepa* L. (mutfak soğanı)'dan, çok rahat kök ucu preparatları hazırlanabilmektedir. Mutfak soğanı; kromozom sayısının az olması, kromozomlarının büyük, kolay gözlemlenebilir ve kolay boyanabilir olması; kısa zamanda ve hızlı sonuçlar vermesi; çok sayıda mitotik hücre içermesi ve ekonomik olması nedeniyle *Allium* test önemli avantajlara sahiptir (Rank 2003, Kuras *et al.* 2006). Bu nedenle, mitoz bölünme üzerine fiziksel ve kimyasal mutajenlerin, kirletici etkenlerin, bitki ekstreleri ve benzer etkin maddelerin sitogenetik etkilerinin araştırılmasında uzun yıllardır çeşitli araştırmacılar tarafından test materyali olarak kullanılmaktadır. *Allium* testinin, memeli test sistemleri ile benzer sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Teixeira *et al.* 2003, El-Shabbaby *et al.* 2003).

Test, kök sistemlerinin gelişimi üzerine herhangi bir açık etki olmaksızın geniş bir pH aralığında (3,5-11,0) çalışabilmektedir. pH tek başına köklerin gelişimini etkilemese de bazı durumlarda pH iyonizasyon durumunu değiştirmesiyle toksik potansiyeli çarpıcı bir şekilde değiştirebilir. Bu durum bileşiklerin toksisitesinin değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulmalıdır. Sistemin dezavantajları test edilen bileşenlerin fiziksel halleriyle ilişkilidir. Başka bir problem sularda veya endüstriyel atıklarda bulunan çözünemeyen bileşenlerdir (Fiskesjö 1985).

Allium test yüksek oranda hassastır ve diğer test sistemlerinde test edildiğinde zararlı olmadığı varsayılan birkaç bileşen için pozitif toksik etkiler verebilir. Bu bazen hatalı pozitif sonuçlarla sonuçlanmasına rağmen bu ayrıca kontaminasyonların gözden kaçmamasını sağlar. Bu, özellikle kompleks karışımlar test edildiğinde önemlidir (Fiskesjö 1985).

1.7.2 Ames Test (*Salmonella*/mikrozom test)

Kısaca Ames testi olarak da adlandırılan Ames/*Salmonella* test sistemi, 1970'li yılların başında Dr. Bruce Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilmiştir (Maron and Ames 1983). Ames testi bakteriyel mutasyon testleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Russell, 1998, Gatehouse *et al.* 1990, Friedberg 1995). Bu testin devam eden popülaritesi DNA'ya zarar veren tehlikelerin (genotoksik) teşhis edilmesi ve yüksek hassasiyetteki mutajenez biyokimyasal mekanizmaların açıklanması yeteneği ile bağlantılıdır (Josephy 1997). Bu sistem; sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, okzotrofik, histidin aminoasitine ihtiyaç duyan, mutant, *Salmonella typhimurium* test bakterileri kullanılarak yapılmaktadır (Jorgensen *et al.* 1987).

Bu testin temeli, yapay *Salmonella typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (his^- = oksotrof) olan suşlarının test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip his^+ hale geri dönüşmesine dayanır. Geri dönüşen (revertant)

bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde de mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakteriler olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan revertant koloni sayısı sayılması gerekir (Maron and Ames 1983).

Salmonella/mikrozom test sistemi başlıca iki varsayıma dayanmaktadır. Bunlardan birincisi, bakteri DNA'sı ile etkileşime girerek mutasyona neden olan ajanların, insan dâhil diğer canlı türlerinde de benzer mutasyonlara yol açma yeteneğinde olabilecekleridir. İkincisi ise, mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur (Mortelmans and Zeiger 2000).

Salmonella/mikrozom testinin kullanıma başlandığı 1975 yılından 1982 yılına kadar geçen süre içinde, beş binden fazla kimyasal maddenin mutajenik etkileri araştırılmıştır. Bu test sisteminde, karsinojen olarak bilinen 179 madde teste tabi tutulmuş ve bunlardan 156'sının (%87'si) mutajenik olduğu bulunmuştur. Aynı sistem 117 karsinojenik olmayan maddeyi de %86'lık bir başarı ile nonmutajenik olarak sınıflandırmıştır. Bu değerden anlaşılacağı gibi *Salmonella*/mikrozom testi, karsinojenik maddelerin %13'ünü mutajenik etkili olarak saptayamamaktadır. Diğer taraftan aynı test, nonmutajenik maddelerinde %14'ünü mutajenik olarak tanımlamaktadır (Akin 1990). Ames test sistemi aynı zamanda, kimyasalların mutajen veya karsinojen etkilerini ortadan kaldıran, bu kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyen antimutajenlerin ve antikarsinojenlerin tayininde de kullanılmaktadır (Rosin and Stich 1978, 1979, Shamberger *et al.* 1979, Alekperov *et al.* 1986, Victorin *et al.* 1987).

Kimyasal karsinojenler veya bunların metabolitleri DNA'ya kovalent olarak bağlanırlar (Miller and Miller 1976). Bu temel ilişki *Salmonella*/mikrozom test sistemi antimutajenlerin araştırılmasını sağlamaktadır. Birçok doğal ve sentetik bileşiklerin bu test sistemiyle karsinojenlerin genotoksik aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Rosin and Stich 1979, Bhattachariya *et al.* 1987).

Salmonella typhimurium LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş suşlarının genetik özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Histidin mutasyonu: Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde ya operondaki baz değişimleri ya da çerçeve kaymasına yol açan baz ilavesi veya çıkarması ile mutant hale getirilmiştir.

His G 46 mutasyonu: His G geni bakteriler tarafından histidin sentezinde kullanılan ilk enzimi kodlayan genidir. Bu mutasyon TA1535 ve TA100 mutantlarında vardır. His G geninde lösin amino asidinin kodonu -GAG- baz çifti değişimi sonucu prolin amino asidi kodonu olan -GGG-ye dönüşmüştür. Bu mutasyon her iki mutantda da baz çifti değişimlerine neden olan mutajenik kimyasallar tarafından geri dönüştürülür.

His D 3052 mutasyonu: His D geni de histidin sentezinde kullanılan histidinol dehidrojenaz enzimini kodlamaktadır. Bu mutasyon gendeki tek bir nükleotidin eksikliği sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. TA98 ve TA1538 mutantlarında vardır.

His D 6610 mutasyonu: Bu mutasyon gene bir nükleotid eklenmesi sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. Mutasyonda etkilenen bölgede beş yerine altı sitozin dizisi bulunmaktadır.

His G 428 mutasyonu: “ochre” stop kodonu varlığından dolayı His G geni inaktif durumdadır.

Başlangıçta geliştirilen his⁻ mutantlarının çeşitli test maddelerine karşı duyarlılığını arttırmak için bu suşlara aşağıdaki mutasyonlar eklenmiştir.

Rfa mutasyonu: Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelmiştir. Lipopolisakkarit tabakanın kısmen yok olması ile normalde hücre içine giremeyen büyük moleküller hücre içine girmektedir.

UvrB mutasyonu: Bu mutasyon DNA onarım sisteminde kesip-çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan *UvrB* genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. Delesyon sonucu “chl” ve “bio” genleri de çıkarılmıştır. “Bio” geni bakterinin biotin sentezinden

sorumlu bir enzimi kodlamaktadır. Dolayısıyla bakteriler üreyebilmeleri için histidin aminoasidine olduğu gibi biyotin aminoasidine de ihtiyaç duyarlar.

R faktörü: Ampisilinin dirençlilik geni olup bu geni taşıyan bakterilerde normalde hücrelerde bulunan ve hata frekansı yüksek olan DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve gerek pozitif sonuçlarının artmasına, gerekse spontan olan mutasyonların artmasına neden olur. R faktörüne sahip olmayan suşlar zayıf mutajenik sonuçlar verirken R faktör genini taşıyan pKM 101 plazmidine sahip yeni suşlar oldukça kuvvetli sonuçlar vermişlerdir (Nakamura *et al.* 1992, Cerna *et al.* 1998, Durusoy and Kambur 2003).

Diğer bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik olan unsur, memelilerde detoksifikasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin olmayışıdır. Bu sistem pek çok kimyasal grubu reaktif olmayan hale getirirken, bazı bileşikleride DNA ile etkileşime girebilen yüksek ölçüde elektrofilik, mutajenik hatta karsinojenik forma dönüştürmektedir (Haack *et al.* 2001). Mutajenik etkisi test edilen herhangi bir ajanın bu enzim aktivasyonunun etkisi ile nasıl bir potansiyele sahip olacağını belirlenmesi kaçınılmazdır. Bu yöndeki sakıncanın giderilmesi için memeli laboratuvar hayvanlarından izole edilen karaciğer enzim ekstresi bakteriyel sisteme dahil edilerek testler prosedüre uygun olarak tekrarlanmaktadır.

En yaygın olarak kullanılan enzim preparatı, sıçanların, enzim aktivasyonu uyarılmış olan karaciğer dokularından homojenize edilen post mitokondriyel süpernatandır (Hass *et al.* 1986; Vrijssen *et al.* 1990). Bu materyal, ilaç metabolize edici enzimlerin bir çeşidini, sitokrom bağımlı monooksijenazları, sitokrom bağımsız oksidazları, amidaz, esteraz, glutatyon-S-transferaz, sülfotransferaz, açil transferaz, metil transferaz, dehidrogenaz ve peroksidazları içermektedir. Enzim özütü, kofaktörler, tuzlar ve tampon sistemle tamamlandığında, S9 karışımı adını almaktadır (Eren 2011).

Ames yönteminde pozitif sonuç veren bir ajan için, insan ya da diğer memeliler de mutajenik veya karsinojeniktir denilemez. Bakteriyel mutasyonun pozitif olması, ajanın

potansiyel zararı konusunda bir ön uyarı anlamı taşır. Ayrıca yüksek organizmalarda yapılacak olan daha kapsamlı çalışmaları yönlendiren önemli bir belirteçtir (Eren 2011).

Ames testinde, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenitesinin belirlenebilmesi için histidine ihtiyaç duyan suşlar kullanılmaktadır. Bilinen bakteriyel mutajenlerin büyük bir kısmını belirlemede çok hassas oldukları için TA98 ve TA100 suşları genel bir kabul görmüştür (Gatehouse *et al.* 1990). Bunların dışında en çok kullanılan test suşları ise TA97, TA102, TA1535 ve TA1538'dir. Bu test suşlarının her biri histidin operonunda değişik tipte mutasyonlar içermektedir (Maron and Ames 1983). Ames testinde kullanılan suşlar ve onların genetik özellikleri Çizelge 1.4'de verilmiştir.

Çizelge 1.4 Ames test sisteminde kullanılan bazı *Salmonella* suşları ve genetik özellikleri (Öksüzoğlu 2000)

Suş	Histidin Mutasyonu	Lipopolisakkarit (LPS)	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA1535	His G46	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	-	AT_GC Transisyon	Baz Çifti Yer değişimine Neden Olan Mutajenler
TA1537	His C376	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	-	C.....C yanına +1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA1538	His D3052	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	-	CG.....CG yanından -1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA97	His D6610	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+	CCC yanına +4	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA102	His G428 pAQ1_his	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	-	GC ochre AT	Oksidanlar, X-Isınları, U.V., Mitomisin C, Bleomisin ve Kinonlar
TA98	His D3052	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+	CG yanından -1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA100	His G46	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+	AT_CG Transisyon	Baz Çifti Değişimine Neden Olan Mutajenler

2. MATERYAL ve METOD

2.1 Bitki Ektresinin Hazırlanması

Alyssum virgatum bitkisi Muratdağı (Afyonkarahisar) bölgesinden toplandıktan sonra Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda taksonomik sınıflandırması Doç. Dr. Mustafa Kargıoğlu tarafından yapılmıştır. Oda şartlarında kurutulmuş bitkilerin toprak üstü kısımları toz haline getirilmiştir. Çözücü olarak bu çalışmada distile su kullanılmıştır. Distile su ekstraksiyonu Sofowora (1999)'ya göre yapılmıştır. Kapalı şişelere konulan toz halindeki 25'er gramlık bitki örneklerine 250 ml distile su eklendikten sonra toz halindeki bitkiler 80 °C'de 30 dakika su banyosunda bekletilmiş ve daha sonra ekstreler 300 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kısım alınıp filtre kağıdından geçirilmiştir. En son elde edilen ekstrelerin çözücüleri, 45 °C'deki rotary cihazında vakumla uçurulmuştur. Hazırlanan 100 g/L çözelti stok olarak kullanılmış ve deneylerde kullanılan çözeltiler deney esnasında bu stok çözeltiden taze olarak hazırlanmıştır.

2.2 *Allium* Test

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak soğan (*Allium cepa*, 2n=16) kullanılmıştır. Kimyasal madde olarak da fuksin, potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$), glasiyal asetik asit, metanol kullanılmıştır. *Allium* testi, Fiskesjö (1985)'den modifiye edilerek yapılmıştır.

2.2.1 EC₅₀ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bitki ekstrelerinin antisitotoksik etkileri belirlenmeden önce kök büyümesini inhibe eden dozlar belirlenmiştir. Bu amaçla 10 farklı konsantrasyon (100 g/L, 50 g/L, 25 g/L, 12,5 g/L, 6,25 g/L, 3,125 g/L, 1,56 g/L, 0,8 g/L, 0,4 g/L ve 0,2 g/L) soğan kök hücrelerine uygulanmış ve EC₅₀ değeri belirlenmiştir.

Uygulama protokolü sırasıyla şu basamaklardan oluşmaktadır:

1. Soğanların kuru kök kısımları kazandıktan sonra 24 saat süreyle distile suda bekletilip köklendirilmiştir (her bir konsantrasyon için 8 adet).
2. Homojen (büyüklük ve ağırlık açısından) olan soğanlardan her bir konsantrasyon için 5'er adet seçilmiştir.
3. Bu soğanlar daha sonra 96 saat belirtilen konsantrasyonlarda ve kontrol grubunda bekletilmiştir. Çözeltiler her gün değiştirilmiştir.

Bu sürenin sonunda kontrol grubundan elde edilen kök uzunluklarıyla, farklı konsantrasyonlardaki kök uzunlukları karşılaştırılmıştır. Kontrol ve farklı konsantrasyonların her birine ait 5'er soğandan 10 kökün uzunluğu (mm) ölçülerek, o konsantrasyona ait ortalama kök uzunluğu belirlenmiştir (her konsantrasyon için $50 \text{ kök} = 5 \text{ soğan} \times 10 \text{ kök}$). Ortalama kök uzunluğunu kontrole göre %50 azaltan konsantrasyon değeri, etkili konsantrasyon (EC_{50}) değeri olarak tanımlanmıştır.

2.2.2 Kromozom Aberasyon Testi

Allium cepa'nın kök ucu meristem hücrelerinin hücre döngüsü 24 saattir (Elçi, 1994). Bu durum dikkate alınarak, mitotik indeks ve kromozom aberasyonları için her bir konsantrasyonun uygulama süreleri 24, 48 ve 72 saat olarak yapılmıştır.

1. Distile suda 24 saat süreyle bekletilen soğanlardan homojen uzunluktaki köklere sahip soğanlar, bitki ekstresinin etkin konsantrasyonu (EC_{50}) + 10 ppm MMS (Methyl Methane Sulfonate), etkin konsantrasyonun yarısı ($EC_{50}/2$) + 10 ppm MMS ve etkin konsantrasyonun iki katı ($2 \times EC_{50}$) + 10 ppm MMS, içeren tüplere 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır.
2. Fiksasyon, boyama ve daimi preparasyon için 5 soğanın kök uçlarından örnekleme yapılmış ve her soğana ait kökler ayrı bir tüpe konulmuştur. Soğandaki en yüksek mitoz

sıklığının sabah saat 6:00 ile 9:00 arasında elde edilmesinden dolayı kök ucu materyallerinin alınması sabah saat 7:00-8:00 arasında tamamlanmıştır.

2.2.3 Preparatların Hazırlanması

Fiksasyon

1. Her bir uygulama süresi sonunda soğan kök ucundan itibaren yaklaşık 1-2 cm uzunluğunda kesilen materyaller Carnoy's fiksatifine (3 kısım %95'lik metanol:1 kısım glasiyal asetik asit) alınarak 24 saat 4 °C'de tespit edilmiştir.
2. Fiksasyon işleminden sonra kökler kullanılıncaya kadar %70'lik alkol içerisinde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Hidroliz

1. Hücreleri birbirlerinden ayırıp mikroskopta daha iyi gözlenebilmelerini sağlamak amacıyla bu işlem yapılmıştır.
2. Kökler %70'lik alkol içerisinden çıkartıldıktan sonra 1N HCl içerisine alınarak 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda 7 dakika hidroliz edilmiştir.

Boyama

1. Hidroliz işleminden sonra kökler distile su içerisine alınarak 15 dakika bekletilmiştir.
2. Kökler Feulgen boyası ile oda sıcaklığında bir saat boyanmıştır.

Feulgen boyasının (Elçi 1994) hazırlanışı:

1 g fuksin (Sigma) üzerine 200 ml kaynatılmış su ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu karışıma 20 ml 1N HCl ilave edilerek bir gün bekletilir. Süzülen bu karışıma 2 g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$, Sigma) eklenerek boya kapaklı bir şişeye konulmuştur. Buzdolabında 24 saat bekleyen ve açık çay rengini alan boya kullanıma hazır hale gelmiştir.

Daimi Preparasyon

1. Boyanmanın en yoğun olduğu yaklaşık 1-2 mm uzunluğundaki kök ucu dokusu kesilerek geriye kalan kısım atılmıştır.
2. Kök ucu üzerine %45'lik glasiyal asetik asit damlatılıp üzerine lamel kapatılarak ezme-yayma preparat yapılmıştır.

2.2.4 Mikroskopik Çalışma

Mikroskopik analizler; mitotik indeks, anafaz ve telofazdaki kromozom aberasyonları ile diğer aberasyonların belirlenmesini içermektedir.

1. Kök ucu meristem hücrelerine ait mitotik indeksin belirlenmesinde, her uygulama için hazırlanan 5 preparatın her birinde 1000'in üzerinde hücre olmak üzere toplam yaklaşık 5000-6000 hücre içinde mitoz giren hücreler sayılmıştır (MI=mitoz girmiş hücre sayısı / toplam hücre sayısı \times 100).
2. 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. Anafaz-telofaz hücrelerinde görülebilen kromozom aberasyonları şunlardır: Yapışıklık, anafaz köprüleri, kalgın kromozomlar, bozulmuş anafaz-telofaz oluşumlarıdır. Diğer anomaliler ise C-mitoz, poliploidi ve binükleer hücre oluşumlarıdır.
3. Belirlenen kromozom aberasyonları 10 \times 40 büyütmede dijital fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.2.5 Verilerin İstatistiksel Analizleri

Elde edilen veriler, SPSS programında Oneway ANOVA Duncan çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve homojen gruplar belirlenmiştir. Verilerin ortalamaları arasındaki önem düzeyi $p < 0,05$ alınarak istatistiksel analizler yapılmıştır.

2.3 Ames Mutajenite Testi

2.3.1 Bitki Ekstresi

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan *Alyssum virgatum* bitkisinin toprak üstü kısımlarının distile su ekstresi bu çalışmada kullanılmıştır.

2.3.2 *Salmonella typhimurium* Test Suşları

Deneyde, Prof. Dr. Bruce Ames ve arkadaşları tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Bu suş Hacettepe Üniversitesi Biyoloji bölümü öğretim üyelerinden olan Prof. Dr. Nuran Diril'den sağlanmıştır. TA98 suşu çerçeve kayması, TA100 ise baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır.

2.3.3 Deneyde Kullanılan Besiyerlerinin İçerikleri ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan kimyasallardan nutrient broth no:2, Oxoid markalı olup diğer kimyasallar, magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), sitrikasit monohidrat, potasyum fosfat (K_2HPO_4), sodyum amonyum fosfat ($NaH_2NH_4 PO_4 \cdot 4H_2O$), D-Biyotin, L-Histidin-HCl, ampisilin trihidrat, sodyum hidroksit, kristal viyole, glukoz, agar, NaCl, sodyum azid (SA), 2-aminoanthracene (2AA), 4-nitro-o-fenilendiamine (4NPD), 2-aminofluorene (2AF), potasyum klorür, magnezyum klorür, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, β -NADP, glukoz-6-fosfat ve S9 fraksiyonu Sigma'dan alınmıştır.

Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Kullanım: Minimal glukoz agar (MGA) ve Histidin/Biyotin/Ampisilin agar (HBA) plakları

1000 ml

Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g
Sitrikasit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2NH_4 PO_4 \cdot 4H_2O$)	175 g
Distile su (45 °C)	670 ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya eklenmiştir. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilmiştir.

(0,5 mM) Histidin/Biyotin (HB) Solüsyonu

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

	<u>250 ml</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 çözülmüş, daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilmiştir. Solüsyon +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

100 ml

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 µm çaplı filtreden geçirilmiş ve +4 °C’de saklanmıştır.

(%1) Kristal Viyole Solüsyonu

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

100 ml

Kristal viyole 0,1 g

Distile su 100 ml

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

(%0,13) Biotin Çözeltilisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

50 ml

D-biyotin 0,65 mg

Distile su 50 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir.

(%0,5) Histidin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	<u>400 ml</u>
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	2 g
Distile su	400 ml

Madde distile su içinde çözülmüş ve otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilmiştir.

(%20) Glukoz Çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

	<u>100 ml</u>
Glukoz	20 g
Distile su	100 ml

Glukoz distile su içinde çözülerek otoklavda 110 °C'de 15 dk sterilize edilmiş ve 0-4 °C'de saklanmıştır.

(2 µg/µl) 2-Aminofluorene (2AF)

Kullanım: Pozitif kontrol

200 µg/plak başına olmak üzere dimetilsülfoksit (DMSO)'de çözülerek kullanılmıştır. TA98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır. +4 °C'de saklanmıştır.

10 ml

2AF	0,02 g
DMSO	10 ml

(0,02 µg/µl) 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)

Kullanım: Pozitif kontrol

2 µg/plak olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanılmıştır. TA98 suşu için S9 fraksiyonu gerektirmeyen kimyasaldır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

	<u>10 ml</u>
NPD	0,02 g
DMSO	10 ml

(0,1 µg/µl) Sodyum Azid (SA)

Kullanım: Pozitif kontrol

10 µg/plak başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA100 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanılan kimyasaldır. +4 °C'de saklanmıştır.

	<u>100 ml</u>
Sodyum azid	0,01 g
Distile su	100 ml

(0,05µg/µl) 2-Aminoanthracene (2AA)

Kullanım: Pozitif Kontrol

5 µg/plak başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA100 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır.

	<u>100 ml</u>
2-aminoanthracene	0,005 g
DMSO	100 ml

Top Agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

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

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

Histidin/Biyotin Plakları (HB agar)

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

1000 ml

Agar	15 g
%20 glukoz	50 ml
Histidin HCl. H ₂ O	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml
50XVB	20 ml
Distile su	914 ml

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

Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanması

	<u>1000 ml</u>
Agar	15 g
Distile su	910 ml
50XVB tuzları	20 ml
%20 glukoz	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 glukoz, 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 saklanabilmektedir.

Minimal Glukoz Agar Plakları

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>1000 ml</u>
Agar	15 g
Distile su	930 ml
50X VB	20 ml
%20 glukoz	50 ml

Agar ve su 2 L'lik kaptaki karıştırılıp çözülmüş ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45 °C'ye soğutulup %20 glukoz ve 50XVB tuzları eklenip petri kutularına 30 ml olarak aktarılmıştır.

Nutrient Agar Plakları (NA)

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

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

Distile su 1000 ml

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

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Kullanım: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

200 ml

Oxoid nutrient broth no:2 5 g

Distile su 200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilip 4 °C'de saklanmıştır.

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

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

500 ml

Potasyum klorür 61,5

Magnezyum klorür 40,7 g

Distile su 500 ml

Maddeler distile suda çözülmüş ve 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak sterilize edilip 4 °C'de saklanmıştır.

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

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	<u>500 ml</u>
0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	13,82 g
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	14,2 g
Distile su	500 ml

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

0,1 M β-NADP Çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	<u>5 ml</u>
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

	<u>10 ml</u>
Glukoz-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

50 ml

Rat karaciğeri S9 fraksiyonu 2 ml

MgCl₂-KCl tuz çözeltisi 1 ml

1 M Glukoz-6-fosfat 0,25 ml

0,1 M β-NADP 2 ml

0,2 M fosfat tamponu pH=7,4 25 ml

Steril distile su 19,75 ml

Karışım, her zaman taze olarak ve yeterince hazırlanmıştır. İçerikler daima buz içinde tutulmuştur.

2.3.4 Test Maddeleri

Alyssum virgatum bitkisinin distile su ekstresinin 312,5 µg/plak, 625 µg/plak, 1250 µg/plak, 2500 µg/plak ve 5000 µg/plak konsantrasyonları hazırlanmıştır. Tüm Ames testi çalışmalarında bu dozlar kullanılmıştır.

2.3.5 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, solvent kontrol ve spontan kontroller deneye paralel olarak denenmiştir. Pozitif kontrol olarak TA100 S9'suz deneylerde 10 µg/plak sodyum azid (SA), TA100 S9'lu deneylerde 5 µg/plak 2-aminoanthracene (2AA), TA98 S9'lu deneylerde 200 µg/plak 2-aminofluorene (2AF), TA98 S9'suz deneylerde 200 µg/plak 4-nitro-o-fenilendiamine (4NPD) kullanılmıştır.

***Salmonella* Suşlarına Ait Kültürlerin ve Master Plaklarının Hazırlanması**

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi'nden getirilen bakteri suşları HBA plaklarına paralel ekimleri yapıp 37 °C'de 48 saat inkübasyona alınmıştır. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml 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 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 ependorf 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 Gecelik Kùltürlerinin Hazırlanması**

TA98 ve TA100 suşları için, master plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml nutrient broth ve 63 µl ampisilin içerisinde süspansiyon edilmiş ve 140 rpm'de 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Taze kùltür hazırlamak için 16 saatin sonunda bu kùltürlerden 500 µl alınıp 20 ml nutrient broth ve 63 µl ampisilin içerisinde süspansiyon edilmiş ve 110 rpm'de kullanımına kadar inkübasyonu sağlanmıştır.

***Salmonella* Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması**

Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi

Test maddesinin mutant suşu, atasal suş tipine döndürme gücü ölçüldüğü için, 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 glukoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺ lardan ayırt edilir. Bu amaçla NB'de, 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 kullanacağımız bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıdığı anlaşılır (Resim 3.2 ve Resim 3.3).

***uvrB* Mutasyonu Kontrolü**

Bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB'de bir gece büyütülen bakteri kùltüründen 1 öze dolusu alınıp NA plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plağın 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. Bu da bize kullanılacak bakterilerin *uvrB* mutasyonu taşıdığını göstermiştir (Resim 3.5).

Rfa Mutasyonu Kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü NB'de 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 (Resim 3.4).

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 büyüdükleri gözlenmiştir. Yani bakteriler R-faktör plazmidini içermektedirler (Resim 3.6).

Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığının Kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar; TA98 için 20–50 revertant/plak, TA100 için 75-200 revertant/plaktır. Bu test için, 37 °C’de, NB’de büyütülen bir gecelik kültürden 0,1 ml alınıp, 45 °C’deki su banyosunda tutulan 0,25 ml 0,5 M HB solüsyonu içeren 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C’de 48-72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır (Resim 3.7).

Sıvı Kültürün ml’sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml’sinde bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml NB içerisinde süspanse edilmiştir. Süspansiyon işleminden sonra kültür çalkalamalı inkübatörde 37 °C’de 110 rpm’de 12-16 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda gecelik kültürden 100 µl alınmış ve 20 ml NB bulunan erlen içerisine eklenerek taze kültürleri hazırlanarak 140 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 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 bir dizi sulandırmaları 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 yavaşça çalkalanarak NA plaklarına yayılmış ve 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. *S. typhimurium* ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 ml’sinde 1-2 x 10⁹ ml/bakteri olması öngörülmektedir.

Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Sitotoksik etkinin saptanması deneyi Dean vd. (1985)’e göre yapılmıştır. Kullanılan test bileşiklerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla 2 ml top agara 0,1 ml bakteri kültürü ve 0,1 ml değişik konsantrasyonlarda uygulanan maddelerden ilave edilmiştir. Öncelikli olarak maddelerin 312,5 µg/plak, 625 µg/plak, 1250 µg/plak,

2500 µg/plak, 5000 µg/plak ve 10000 µg/plak konsantrasyonları test tüpüne eklenmiştir. Tüpteki karışım 3 ayrı NA plağına dökülerek 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. Mutajenite deneylerinde, toksik dozun altındaki dozlarla çalışılmıştır.

S9 Karışımının Hazırlanması

Ames 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 her mutajenite deneyi için taze hazırlanmakta ve deney süresince buz içerisinde saklanmaktadır.

Ames Antimutajenite Testinin Yapılışı

Deneyin amacı, daha önceden büyümesi için histidin aminoasidine gereksinim duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüşmesi temeline dayanır. Ames testi, Maron ve Ames (1983)’e göre yapılmıştır.

S9’suz (-) deney

Bu amaçla, içlerine 0,25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml’lik top agar içeren deney tüpleri 45 °C’lik su banyosunda ısıtılıp içlerine 0,1 ml test maddesi, 0,1 ml 5 saatlik taze bakteri kültürü ve 0,1 ml pozitif mutajen madde (TA98 için 4- nitro-o-fenilendiamine (4NPD) ve TA100 için sodyum azid (SA)) eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak 37 °C’ye ısıtılmış MGA plaklarına dökülmüş, plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C’lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deneyde her doz için 3 ayrı plak kullanılarak iki bağımsız deney yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol

(distile su) ve pozitif kontrol (diagnostik) olarak TA100 suşu için 0,1 µg/µl sodyum azid (SA), TA98 suşu için ise 2 µg/µl 4-nitro-o-fenilendiamine (4NPD) kullanılmıştır.

S9'lu (+) deney

Plak inkorporasyon testinde, test bileşiği, bakteriyel test suşu, S9 karışımı top agara karıştırılarak minimal glukoz agarlı plaklara dökülmüştür. Plaklar 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaklardaki his⁺ revertant bakteri kolonileri sayılmıştır.

Bu yöntemde, 0,25 ml histidin biyotin eklenmiş 45 °C'deki 2,5 ml'lik top agara, test suşu kültüründen 0,1 ml, test edilecek kimyasaldan 0,1 ml, pozitif mutajen maddeden 0,1 ml (TA98 için 2-aminofluorene (2AF) ve TA100 için 2-aminoanthracene (2AA)) ve S9 karışımından 0,5 ml eklenip düşük hızda 3 saniye vorteksenerek oda sıcaklığındaki minimal glukoz agarlı plaklara yayılmıştır. Top agarın plağın bütün yüzeyine donmadan yayılmasını sağlamak için karıştırma, dökme, yayma işleminin tümü, 20 saniyeden az bir sürede yapılmıştır. Her deneyde, her suşun geri dönme özgülüklerini ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için pozitif mutajen kullanarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Bakteriyi, S9 karışımını ve kullanılan çözücüyü içeren fakat test edilen kimyasalı içermeyen negatif kontrol plakları her suş için kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısının saptanmasında kullanılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve iki bağımsız deney yapılmıştır. Bu çalışmaların negatif kontrolleri test materyalinin yerine aynı miktarda bu materyalin çözücüsünün eklenmesiyle, pozitif kontrolleri ise test materyalinin yerine aynı miktarda kullanılan bakteri suşuna spesifik olan mutajen madde çözücüsünün eklenmesiyle hazırlanmıştır.

2.3.6 Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin istatistiki analizi, SPSS programı Oneway ANOVA Dunnett-t testine göre yapılmıştır. *Salmonella*/mikrozom test sisteminde elde ettiğimiz sonuçları değerlendirirken % inhibisyonu aşağıdaki formülü kullanarak hesapladık;

$$\% \text{ inhibisyon} = \left[1 - \frac{T-S}{M-S} \right] \times 100$$

T→ Mutajen ve bitki ekstresi varlığında geri dönen koloni sayısı

M→Sadece mutajen varlığında geri dönen koloni sayısı

S→ Spontan revertant koloni sayıları

Bitki ekstresinin mutajen üzerindeki inhibitör oranı %20-40 arasında olduğu durumlarda antimutajenik etki orta dereceli olarak tanımlanırken; %40'tan fazla olduğu durumlarda güçlü antimutajenik etkili olarak kabul edildi. İnhibisyon oranı %20'den daha az olduğunda ise antimutajenik etki negatif olarak kabul edildi (Negi *et al.* 2003).

3. BULGULAR

3.1 *Allium* Testine Ait Bulgular

Allium test, *Alyssum virgatum* türünün toprak üstü kısımlarının su ekstresi ile çalışılmıştır.

Allium test ile kullanılan bitkinin su ekstralarının, kök büyüme inhibisyonu ile mitotik safhalar üzerine etkisi ve oluşturdukları kromozom aberasyonları belirlenmeye çalışılmıştır.

3.1.1 Kök Büyümesi İnhibisyonu Testi

Bu çalışma ile bitki ekstralarının hem kök büyümesi üzerine etkisi araştırılmış hem de sonraki aşamalar olan mitotik indeksin (MI) saptanması ve kromozom aberasyonlarının belirlenmesi denemelerinde kullanılacak olan konsantrasyon değerleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Alyssum virgatum (Av) türünün toprak üstü su ekstresinin farklı dozlarında 96 saat süreyle bekletilen soğan köklerinin kontrol grubuna (distile su) göre kök uzunlukları karşılaştırılmış ve EC₅₀ değeri tespit edilmiştir. *Allium cepa* kök büyümesi inhibisyonu testinde EC₅₀ değerini belirlemek için Av bitki ekstresinin, 100g/L, 50 g/L, 25 g/L, 12,5 g/L, 6,25 g/L, 3,125 g/L, 1,56 g/L, 0,8 g/L, 0,4 g/L ve 0,2 g/L içeren 10 farklı konsantrasyonu soğan kök hücrelerine uygulanmıştır. Bu amaçla 96 saat sonunda kontrol grubunun ortalama kök uzunluğunu (3,46 cm) yarıya düşüren yaklaşık değer olan etkin konsantrasyon (EC₅₀) değeri hesaplanmıştır.

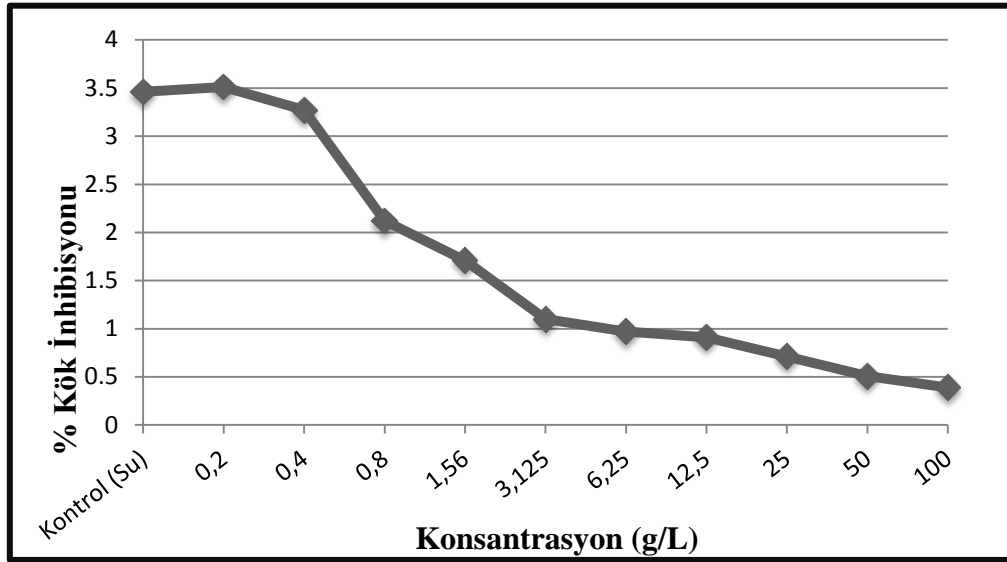
Test sonucunda Av toprak üstü kısımlarının distile su ekstralarından elde edilen EC₅₀ konsantrasyonu 1,56 g/L olarak tespit edilmiştir. Bu değer belirlendikten sonra yapılacak olan antisitotoksisite çalışmalarında kullanılacak olan konsantrasyonlar tespit edilmiştir. Yüzde mitotik indeks ve % kromozom aberasyonlarını belirlemek için, bitki ekstresinin EC₅₀ (1,56 g/L), EC₅₀/2 (0,8 g/L) ve EC₅₀×2 (3,125 g/L) konsantrasyonları

kullanılmıştır. Bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarından elde edilen kök uzunluğu ortalaması verileri Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 *Allium* testi kök büyümesi inhibisyonu testi sonuçları

Test maddesi	Konsantrasyon (g/L)	Ortalama kök uzunluğu (cm) ±SS
Kontrol (distile su)	-	3,46±0,38
<i>A. virgatum</i> Toprak üstü su ekstresi	100	0,39±0,06*
	50	0,51±0,07*
	25	0,71±0,11*
	12,5	0,91±0,13*
	6,25	0,97±0,08*
	3,125	1,1±0,14*
	1,56	1,71±0,07*
	0,8	2,12±0,1*
	0,4	3,27±0,24
	0,2	3,51±0,12

* Ortalamalar arasındaki fark 0,05 seviyesinde önemli. (Dunnett-t test 2-yönlü), SS: Standart Sapma.



Şekil 3.1 *Alyssum virgatum* ekstresinin farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği

Kök büyüme inhibisyonu testi verilerine göre 100g/L, 50 g/L, 25 g/L, 12,5 g/L, 6,25 g/L, 3,125 g/L, 1,56 g/L, 0,8 g/L ve 0,4 g/L konsantrasyonları kontrol grubuna göre

ortalama kök uzunluğunu azaltan konsantrasyonlar olarak tespit edilmiştir. Buna karşın 0,2 g/L konsantrasyonunun kök uzunluğunda artış oluşturduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize düşük konsantrasyon değerlerinde bitki ekstresinin kök büyümesine katkı sağladığını fakat ekstrenin yüksek konsantrasyonlarının büyümeyi inhibe ettiğini göstermektedir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu, 100g/L, 50 g/L, 25 g/L, 12,5 g/L, 6,25 g/L, 3,125 g/L, 1,56 g/L ve 0,8 g/L konsantrasyonlarının, kontrol grubuna göre ortalama kök uzunluğu değerleri önemli bulunmuştur.

3.1.2 Mitotik İndeks (MI) Üzerine Etkileri

Allium cepa kök ucu meristem hücrelerinin mitotik indeksi üzerine kontrol (distile su), MMS ve *Alyssum virgatum* ekstresinin 10 ppm MMS içeren farklı konsantrasyonları (0,8, 1,56 ve 3,125 g/L) ile bu konsantrasyonlara maruz kalma sürelerinin (24, 48 ve 72 saat) etkisi incelenmiştir.

Mitotik indeks çalışması için *Av* ekstresinin farklı konsantrasyonlarından elde edilen köklerden hazırlanan preparatlardan yaklaşık 5000 hücre sayılmıştır. Bu yöntemle, hücrelerin mitozu girme oranları ve mitozun hangi safhasında inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. *Av* ekstresinin *A. cepa* kök uçlarında mitotik indeks ve mitotik fazlarda meydana getirdiği değişimler Duncan çoklu dağılım testi ile belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Allium test mitotik indeksi belirleme yönteminden elde edilen verilere göre *Av* ekstresinin 24 saat uygulamasının MMS'e göre, 10 ppm MMS içeren 0,8, 1,56 ve 3,125 g/L'lik konsantrasyonlarının mitotik aktiviteyi artırdığı görülmüştür. Mitotik faz safhalarına bakıldığında ise, *Av* ekstresinin konsantrasyon artışına bağlı olarak uygulanan pozitif mutajen (MMS) varlığında profaz safha yüzdesini artırıp, metafaz safha yüzdesini azalttığı görülmüştür (Çizelge 3.2).

Av ekstresinin 48 saat uygulamasında MMS'e göre, 10 ppm MMS içeren her üç konsantrasyonda da mitotik aktivite artmıştır. Uygulanan tüm konsantrasyonlar MMS'e göre profaz safhasını artırırken, metafaz safhasını ise düşürdüğü tespit edilmiştir. 10

ppm MMS içeren 3,125 g/L'lik konsantrasyonun profaz safhasını önemli düzeyde artırıp, metafaz safhasını düşürdüğü görülmüştür (Çizelge 3.2).

Av ekstrelerinin 72 saat uygulamasında ise 10 ppm MMS içeren her üç konsantrasyonda mitotik aktiviteyi artırmıştır. Uygulanan tüm konsantrasyonların doz artışına bağlı olarak MMS'e göre, profaz safhasını artırdığı, metafaz safhasını ise düşürdüğü görülmüştür. 48 saat uygulamasında da olduğu gibi 10 ppm MMS içeren 3,125 g/L'lik konsantrasyon profaz safhasını önemli düzeyde arttırırken, metafaz safhasını düşürmüştür (Çizelge 3.2).

Av ekstresi, 10 ppm MMS içeren farklı konsantrasyonlarının mitotik indeksteki değişiklikleri artış şeklinde olup, bütün saat uygulamalarında konsantrasyon artışına bağlı olarak pozitif kontrole (MMS) göre artış göstermektedir. Bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Av ektresinin 10 ppm MMS içeren farklı konsantrasyonlarının mitotik faz yüzdelerine etkisi incelendiğinde konsantrasyon artışına bağlı olarak profaz yüzdelerinin arttığı, metafaz yüzdelerinin ise azaldığı görülmüştür. Fakat pozitif kontrole göre artış ve azalışlar, 48 ve 72 saat uygulamalarında gözlenmiştir.

Çizelge 3.2 *A. virgatum* su ekstralarının mitotik indeks ve mitotik safhalar üzerine etkileri

Konsantrasyon (g /L)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± SS	Mitotik Faz Safhaları (%) ± SS			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5366	85,13±4,13a	82,5±3,77a	0,79±0,28a	1,35±0,18a	0,51±0,18a
MMS (10µg/ml)	5091	33,53±3,01b	36,86±7,23b	0,86±0,55a	0,75±0,30b	1,14±0,40b
0,8+10ppm MMS	5136	34,00±2,93b	30,71±2,96c	1,48±0,19b	1,25±0,38ab	0,57±0,14a
1,6+10ppm MMS	5132	34,12±2,24b	31,62±2,43bc	0,78±0,39a	1,14±0,21ab	0,98±0,39b
3,2+10ppm MMS	5234	37,16±1,28b	35,40±1,47bc	0,23±0,12c	1,13±0,69ab	0,40±0,25a
Kontrol- 48 saat	5217	77,80±5,93a	74,26±5,03a	1,16±0,29a	1,34±0,87a	1,04±0,40ab
MMS (10µg/ml)	5143	32,95±4,07c	32,26±4,16c	1,23±0,26a	0,74±0,23ab	0,72±0,40ab
0,8+10ppm MMS	5350	35,43±4,22c	32,49±3,99c	1,22±0,62a	1,18±0,34ab	0,54±0,35a
1,6+10ppm MMS	5197	36,25±1,84c	34,11±5,79c	0,48±0,22b	1,02±0,13ab	0,97±0,28ab
3,2+10ppm MMS	5277	45,83±2,63b	43,44±2,73b	0,38±0,28b	0,93±0,39ab	1,08±0,31b
Kontrol-72 saat	5217	70,31±3,66a	68,18±4,62a	0,88±0,22a	1,00±0,69a	0,54±0,16a
MMS (10µg/ml)	5083	30,69±5,05b	28,80±2,67b	1,06±0,24a	1,49±0,33b	0,53±0,23a
0,8+10ppm MMS	5151	36,95±2,02c	34,24±1,85c	0,85±0,35a	1,16±0,24b	0,71±0,31a
1,6+10ppm MMS	5525	44,64±3,62d	42,81±3,64d	0,77±0,25a	1,07±0,21b	0,60±0,13a
3,2+10ppm MMS	5269	46,8±1,63d	45,12±1,99d	0,25±0,13b	1,13±0,41b	0,31±0,16a

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

3.1.3 Kromozom Aberasyon Çalışmaları

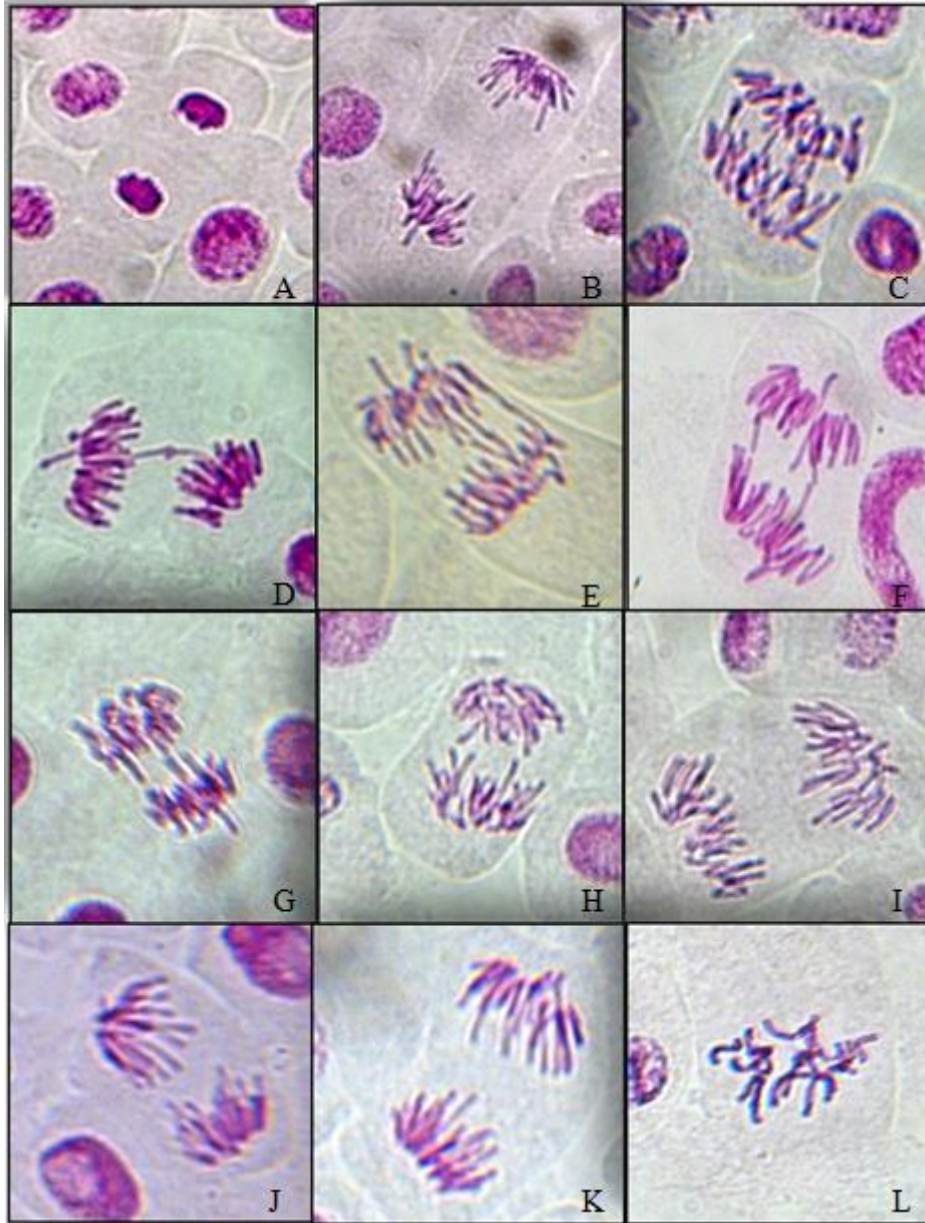
Alyssum virgatum'un toprak üstü kısımlarının distile su ekstrelerinden elde edilen konsantrasyonların ve saat (24, 48 ve 72) uygulamalarının *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde neden olduğu bazı anafaz-telofaz kromozom anomalileri belirlenmiştir. Bunun için ilk olarak 500 adet anafaz-telofaz hücresi sayılmış ve bu hücrelerdeki anomalilere bakılmıştır. Bu 500 hücrede yapışıklık, kalgın kromozom, anafaz köprüsü ve bozulmuş anafaz-telofaz anomalileri incelenmiştir. Fakat bazı konsantrasyonlar, mitozun anafaz ve telofaz safhalarının oluşumunu engellediği için ya 500 hücreden daha az hücre sayılmıştır ya da sayım işlemi gerçekleştirilememiştir. Aynı zamanda anafaz-telofaz harici oluşan anomalilere de bakılmıştır. Bunlar ise 5000 hücre sayımı sırasında incelenmiş olup c-metafaz, poliploidi ve binükleer hücre oluşumlarıdır. Kromozom aberasyonu çalışmasında görülen bazı anomaliler Resim 3.1'de verilmiştir. Oluşan her bir anomalinin çalışılan hücre sayısına göre yüzdesi hesaplanmıştır. Daha sonra oluşan toplam anomali yüzdeleri, Duncan çoklu dağılım testi ile değerlendirilmiştir. Teste ait veriler Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Alyssum virgatum'un toprak üstü kısımlarının distile su ekstrelerinden elde edilen konsantrasyonların her üç saat uygulamasında da anafaz-telofaz anomali yüzdesinde MMS'e göre azalmalar görülmüştür. Diğer anomali yüzdelerine bakıldığında ise, Av'un MMS içeren tüm konsantrasyon yüzdelerinin MMS'e göre azaldığı tespit edilmiştir (72 saat uygulamasının 10 ppm MMS içeren 1,6 g/L ve 3,125 g/L'lik konsantrasyonları hariç) (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 *A. virgatum* su ekstralarının kromozom aberasyonu sonuçları

Konsantrasyon (g/L)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)					Diğer Anormallikler (%)					
		Yapışıklık	Anafaz köprüsü	Kalgın kromozom	Bozulmuş anafaz- telofaz	Toplam Anormallikler (%± S.S)	Sayılan hücre sayısı	C-metafaz	Çekirdek bozukluğu	Poliploidi	Binükleer Hücre	Toplam (%± S.S)
Kontrol-24 saat	480	0,80	0,20	42,20	4,60	49,30±8,50a	5366	0,08	-	-	0,06	0,14±0,39a
MMS (10 µg/ml)	500	5,60	1,20	50,20	6,20	63,20±4,76b	5091	0,36	0,18	-	0,12	0,66±0,05bc
0,8+10ppm MMS	500	0,40	1,00	40,60	5,40	47,40±8,79a	5136	-	-	-	-	0,00±0,00c
1,6+10ppm MMS	500	1,00	0,80	47,60	2,60	52,00±9,72a	5132	0,08	0,06	0,02	0,04	0,40±0,21ab
3,2+10ppm MMS	500	1,20	0,60	52,80	1,40	56,00±5,29ab	5234	0,20	0,12	0,08	0,16	0,56±0,38a
Kontrol- 48 saat	500	4,00	2,40	32,00	7,60	46,00±3,74a	5217	0,04	0,18	-	0,18	0,04±0,09b
MMS (10 µg/ml)	474	1,98	4,73	44,93	4,43	56,07±9,09b	5143	-	0,02	-	-	0,40±0,23a
0,8+10ppm MMS	444	0,64	2,51	52,14	-	55,28±4,53b	5350	0,04	-	-	-	0,04±0,05b
1,6+10ppm MMS	434	-	-	53,94	0,83	54,77±6,73b	5197	0,08	-	-	-	0,08±0,02b
3,2+10ppm MMS	497	0,60	2,02	52,86	-	55,48±7,57b	5277	-	-	-	-	0,00±0,00b
Kontrol- 72 saat	497	8,83	2,22	38,22	6,45	55,72±3,18a	5218	0,02	-	-	0,04	0,06±0,09a
MMS (10 µg/ml)	480	5,55	8,80	56,65	5,25	76,25±2,49b	5083	0,22	0,08	-	0,1	0,10±0,08a
0,8+10ppm MMS	385	0,41	0,67	48,55	0,61	50,23±9,40a	5151	0,04	-	-	-	0,06±0,05a
1,6+10ppm MMS	463	0,25	2,20	50,22	1,49	54,17±3,76a	5525	0,20	0,12	0,08	-	0,60±0,33b
3,2+10ppm MMS	500	0,40	2,80	48,60	1,00	52,80±3,70a	5569	0,18	0,16	0,16	0,22	0,72±0,22b

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



Resim 3.1 Kromozom aberasyonu çalışmasında görüntülenen bazı anomaliler. A) Yapışıklık, B-G-I) Geri kalmış kromozomlar, C) Üçlü anafaz köprüsü, D-F) Tekli anafaz köprüsü, E) İkili anafaz köprüsü, H-J-K) Bozulmuş anafaz-telofaz, L) C-Mitoz.

3.2 Ames Testine Ait Bulgular

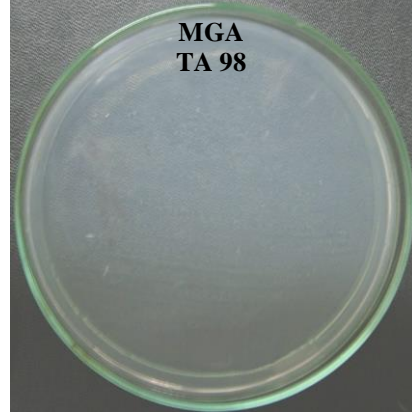
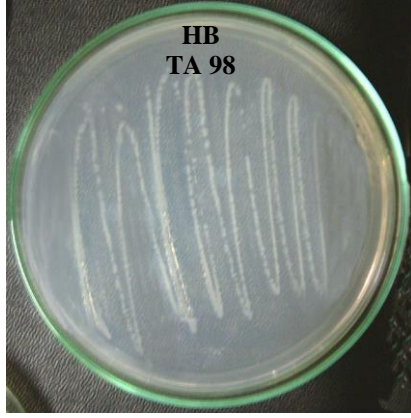
Ames testi, kullanılan bitki ekstralarına ait farklı dozların antimutajenik özelliğe sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla histidin üretemeyen *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 bakteri suşları kullanılmış olup, bu suşların histidin üretebilir hale gelip gelmediklerine bakılarak bitki ekstralarının antimutajeniteleri belirlenmiştir. Buna göre antimutajenite çalışmalarından elde edilen koloni sayım sonuçları aynı çalışmaların pozitif kontrolleri ile kıyaslanarak % inhibisyon oranları hesaplanmıştır.

3.2.1 Genetik İşaretlerin Kontrolü

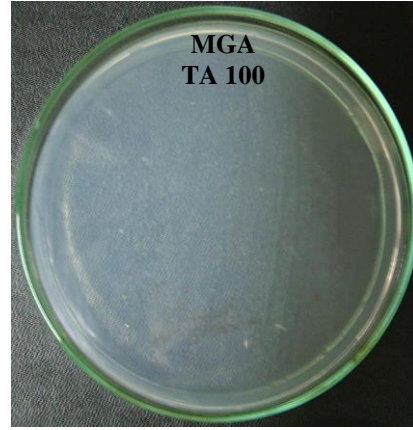
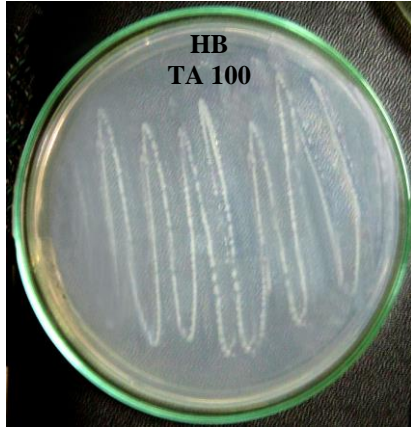
Deney öncesinde tüm suşlar için spontan geri dönüşüm sayısı bulunarak test bakterilerinin deneyler için uygunluğu doğrulanmıştır. Bununla beraber mutant olan bu bakteriler, genetik özelliklerini çok çabuk değiştirebildikleri için her deneyden önce mutlaka genetik kontrolleri yapılarak deney için uygun olup olmadıklarının sağlanması yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan standart test suşlarından TA98 suşunun histidin gereksinimi (Resim 3.2), TA100 suşunun histidin gereksinimi (Resim 3.3), rfa mutasyonu (Resim 3.4), *uvrB* mutasyonu (Resim 3.5), R-faktör varlığı (Resim 3.6) ve spontan olarak geriye dönen koloni sayısı (Resim 3.7) bakımından genetik işaretlerinin kontrolü yapılmıştır.

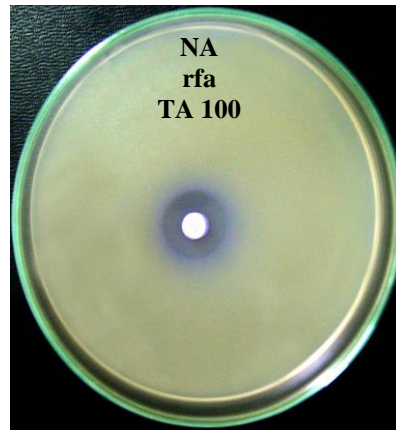
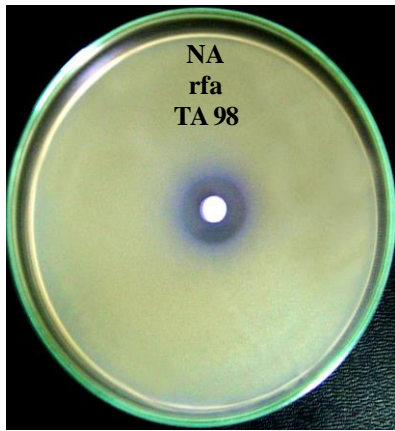
TA98 için ortalama revertant koloni sayısı S9 fraksiyonu varlığında $34 \pm 2,24$, yokluğunda ise $30 \pm 0,86$ bulunmuş, TA100 için ise ortalama revertant koloni sayıları S9 fraksiyonu varlığında $124 \pm 3,77$ iken S9 fraksiyonu yokluğunda $117 \pm 2,86$ olarak bulunmuştur.



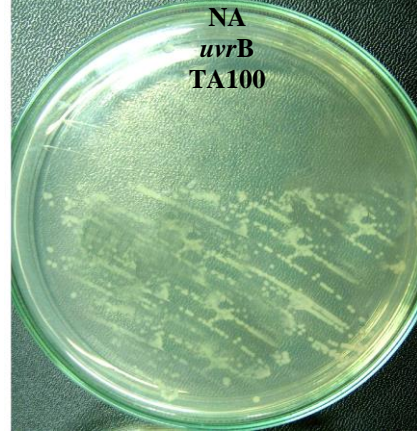
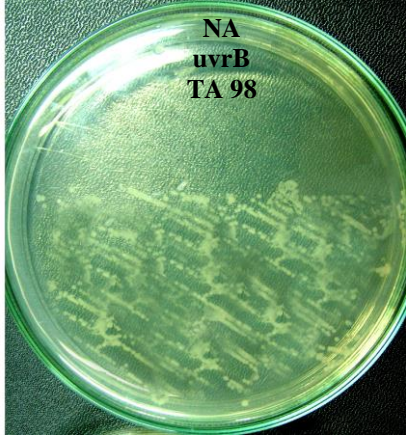
Resim 3.2 *S. typhimurium* TA98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



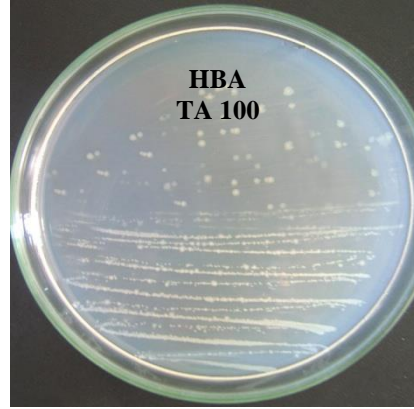
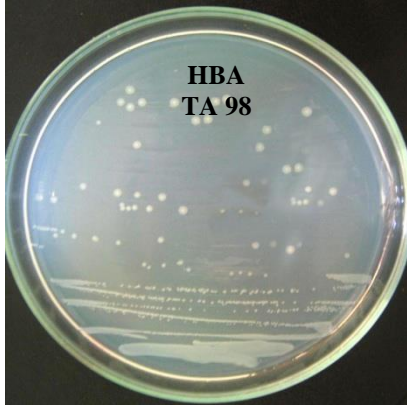
Resim 3.3 *S. typhimurium* TA100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



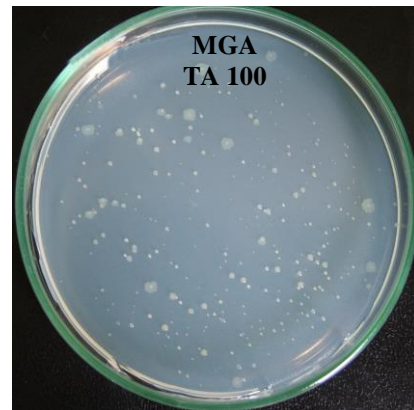
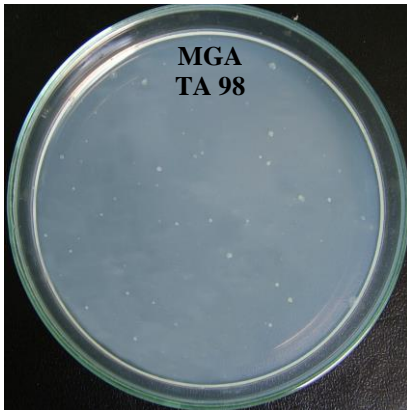
Resim 3.4 *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları



Resim 3.5 *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının uvrB mutasyon kontrolü sonuçları



Resim 3.6 *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları



Resim 3.7 *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları

3.2.2 Sitotoksik Dozların Belirlenmesi

Yapılan sitotoksikite testleri sonucunda kullandığımız 6 konsantrasyon (312,5 µg/plak, 625 µg/plak, 1250 µg/plak, 2500 µg/plak, 5000 µg/plak ve 10000 µg/plak) içerisinde *Alyssum virgatum*'un toprak üstü kısımlarının distile su ekstraktlarından 10000 µg/plak konsantrasyonu hariç, diğer konsantrasyonlarda sitotoksik etki görülmemiştir.

312,5 µg/plak, 625 µg/plak, 1250 µg/plak, 2500 µg/plak ve 5000 µg/plak konsantrasyonlardan elde edilen verilere göre belirlenen koloni sayıları, kontrol plağındaki koloni sayılarından fazla olduğundan, antimutajenite deneylerinde bu beş konsantrasyon kullanılmıştır.

3.2.3 Ames Deneyi Bulguları

Ames testinde, Av toprak üstü kısımlarının distile su ekstraktları kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılırken, pozitif kontrol grubu olarak da TA98 S9'suz çalışma için 4-nitro-o-fenilendiamine (4NPD), S9'lu çalışma için ise 2-aminofluorene (2AF), TA100 S9'suz deney için sodyum azid (SA) ve S9'lu için ise 2-aminoanthracene (2AA) kullanılmıştır. Ames testinin başlangıcında bitki ekstresinin sitotoksik dozları belirlenmiştir. Daha sonra deney belirlenen dozlarla S9 enzimi varlığında ve yokluğunda her iki suş ile üçer tekrarlı yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi, SPSS programı Oneway ANOVA Dunnett-t testine (2-yönlü) göre yapılmıştır.

Av türünün antimutajenik aktivitesinin araştırılması için yapılan deneyde 312,5 µg/plak, 625 µg/plak, 1250 µg/plak, 2500 µg/plak ve 5000 µg/plak konsantrasyonlarıyla uygulama yapılmıştır. Testler sonucunda elde edilen bulgulara göre, TA98 suşunun S9 karaciğer enzimi fraksiyonu varlığında 5000 µg/plak konsantrasyonunun %21,92 ve S9 karaciğer enzimi fraksiyonunu yokluğunda ise %20,02 oranlarıyla orta dereceli antimutajenik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. 312,5 µg/plak, 625 µg/plak, 1250 µg/plak ve 2500 µg/plak konsantrasyonlarının ise antimutajenik aktivitesinin olmadığı gözlenmiştir (Çizege 3.4). TA100 suşunun ise S9 karaciğer enzimi fraksiyonunun

varlığında ve yokluğunda uygulanan beş konsantrasyonun önemli bir antimutajenik aktivite gösterdiği görülmemiştir (Çizelge 3.4). Fakat Av'un toprak üstü kısımlarının distile su ekstresi 625 µg/plak, 1250 µg/plak, 2500 µg/plak ve 5000 µg/plak konsantrasyonlarının *S.typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşları için S9 enzimi varlığında ve yokluğunda revertant koloni sayısındaki değişiklikler pozitif kontrol grubuna göre azalışlar şeklinde olup bu değerler istatistiksel açıdan ($p<0,05$) anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 TA98 ve TA100 suşları ile yapılan Ames testi sonuçları

Materyal	Konsantrasyon	TA98 S9'suz		TA98 S9'lu		TA100 S9'suz		TA100 S9'lu	
		Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	% İnhibisyon	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	% İnhibisyon	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	% İnhibisyon	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	% İnhibisyon
Kontrol		32±0,78		35±2,20		118±3,21		125±3,52	
(-) Kontrol (distile su)		30±0,86*		34±2,24*		117±2,86*		124±3,77*	
2AA	5 µg/plak							1908±45,87	
SA	10 µg/plak					1641±41,46			
2AF	200 µg/plak			1058±21,91					
NPD	200 µg/plak	2372±62,86							
<i>A. virgatum</i> toprak üstü su ekstresi	5000µg/plak	1897±71,29*	20,02#	826±19,47*	21,92#	1443±17,54*	12,06	1723±16,78*	9,69
	2500µg/plak	2034±60,50*	14,24	877±19,76*	17,10	1466±15,95*	10,66	1750±20,43*	8,28
	1250µg/plak	2164±43,93*	8,76	919±15,97*	13,13	1521±15,87*	7,31	1784±11,89*	6,49
	625µg/plak	2237±31,14*	5,69	964±14,17*	8,88	1568±20,48*	4,44	1838±20,86*	3,66
	312,5µg/plak	2363±62,01	0,37	1040±42,91	1,70	1609±20,59	1,95	1871±13,18	1,93

* işaretleri Dunnett-t testine (2-yönlü) göre istatistiki açıdan önemli değerleri göstermektedir (Ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli). # işaretleri % İnhibisyon oranı sonucunda pozitif antimutajenik etki gösteren değerlerdir. Pozitif kontroller; 2AF: 2-aminofluorene, NPD: 4-nitro-o-fenilendiamine, SA: Sodyum azid, 2AA: 2- aminoanthracene.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde mutajen maddeler ile başta kanser olmak üzere birçok genetiksel hastalığın ortaya çıkışının ilişkilendirilmesi, mutajenlerin etkilerini ortadan kaldırarak bu hastalıkların meydana gelişinin önlenmesinde veya tedavilerinde etkili olabilecek antimutajenik kimyasalların araştırılmasına yönelik çalışmalara ivme kazandırmıştır (Feil and Metzger 2007). Bu noktada, doğal kökenli bileşenlerin en temel kaynağı konumundaki bitkiler, yapılarında buldukları zengin kimyasal madde içeriği ile antimutajenik madde araştırmalarının en gözde grubunu oluşturmaktadır (Özbek 2006).

In vivo ve *in vitro* çalışmalar, bitkilerin yaprak, meyve ve kök gibi kısımlarından elde edilen bazı doğal bileşiklerin ksenobiyotik etkiler üzerine düzenleyici rol oynadıklarını göstermiştir. Bu bileşiklerin karakterizasyonu, tanılanması, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin belirlenmesi, insanlarda kanser hastalığının gelişmesini azaltmak için önemli bir stratejiyi de beraberinde getirmiştir (Roncada *et al.* 2004). Özellikle makromolekülleri içine alan birçok doğal ürün, bireysel immun sisteminin modülasyonunu sağlamasından dolayı antitümör aktiviteye sahiptir. Bu makromoleküllerin, kimyasal antitümör droglarla karşılaştırıldığında daha az yan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Tsukagoshi and Ophashi 1974).

Kanseri de içine alan çeşitli hastalıkların gelişmesine karşı bitkisel metabolitlerin koruyucu olabileceğini gösteren *in vivo* ve *in vitro* deneysel araştırmalardan ve epidemiyolojiden elde edilen kanıtlar; bu metabolitler üzerine antimutajenik ve antigenotoksik çalışmaların büyük ölçüde artmasını sağlamıştır (Abdullaev *et al.* 2003). Antimutajenlerin veya antikarsinojenlerin kanser etiyojisiyle ilgili olan faktörlerle mücadelede aktif rol oynadıkları bilinmektedir (Karaker *et al.* 2000). Bununla birlikte antimutajenik ve antikarsinojenik özelliğe sahip kimyasal bileşikleri araştırmak ve keşfetmek; günümüzde insanlarda kanser riski ve mutasyon oranlarındaki artışın beraberinde getirdiği istenmeyen sonuçlar nedeniyle de zorunlu hale gelmiştir (Hartman and Shankel 1990).

In vivo mutajenite ve antimutajenite test sistemlerinde, bitkisel kaynaklardan saflaştırılan doğal etken maddeler de tıpkı diğer maddeler gibi dört farklı etki ortaya

çıkabilir. Bu etkileri; antimutajenik, komutajenik, promutajenik ve doğrudan mutajenik etkiler olarak sınıflandırmak mümkündür. Ayrıca bazı maddelerin uygulama konsantrasyonlarına bağlı olarak bu etkilerden birkaçını aynı anda gösterebildiği bilinmektedir (Snijman *et al.* 2007).

Yapılan çalışmalar, bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilen bazı doğal bileşiklerin çeşitli mutajen ajanlara karşı antimutajenik etkinliğe sahip olduklarını göstermiştir.

Örneğin; Karakaya (1997), çiğ ısırgan otu ve haşlama suyu, kurutulmuş ısırgan tohumu, karabaş otu, adaçayı, kuşburnu çayı, üzüm pekmezi ve tarhananın sodyum azid mutajenine karşı *Salmonella typhimurium* TA100 suşu üzerinde antimutajenik aktivite gösterdiklerini, mutajenik aktivitelerinin ise belirlenemediğini bildirmiştir.

Chrysanthemum morifolium bitkisiyle yapılan çalışmada, antimutajenik etki gösterdiği belirlenen metanol özütünden elde edilen etil asetat özütünün antimutajenik etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Miyazawa and Hisama 2003).

Kaur vd. (2002), *Terminalia arjuna* (Arjun ağacı)'nın benzen, kloroform, aseton ve metanol ekstraktlarının siyah asit boyası, 2-aminofluorene (2AF) ve 4-nitro-*o*-fenilendiamine (4NPD)'e karşı *Salmonella typhimurium* TA98 suşu üzerinde antimutajenik etkilerini incelemiş, aseton ve metanol ekstraktlarının antimutajenik etkilerinin diğer ekstraktlardan daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Evandri vd. (2005), *Melaleuca alternifolia* (çay ağacı yağı) ve *Lavandula angustifolia* (lavanta yağı)'ın gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi ile kimyasal bileşiklerini tanımladıktan sonra, mutajenik ve antimutajenik etkilerini *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ve *Escherichia coli* WP2-uvrA suşları üzerinde incelemiş, iki bakteriyel test sisteminde de mutajenik aktivite görmezken, konsantrasyona bağlı antimutajenik aktivite belirlemişlerdir.

Nogueira vd. (2005), *Melampodium divaricatum*'un çiçek ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik etkilerini *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile incelemişlerdir. Test

edilen ekstrelerin *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 ve TA102 suşlarının hiçbirinde mutajenik etki göstermediğini ve aflatoksin B1 (AFB1), benzo(a) pyrene ve daunomycin'in mutajenitesini azalttığını bulmuşlardır.

Hayder vd. (2007), *Myrtus communis* (mersin) bitkisinin yaprak kısmının hekzan, etil asetat, metanol ve kloroform ile elde edilen ekstrelerin mutajenik ve antimutajenik aktivitelerini *Salmonella*/mikrozom testi ile incelemişler ve sonuçta ekstrelerin antimutajenik aktiviteye sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Özbek vd. (2008), Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* (mercanköşk)'nin metanol ekstresinin *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1538 suşları üzerine antimutajenik potansiyelini araştırmış ve sonuç olarak *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* ekstresinin antimutajenik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ham vd. (2009), *Inonotus obliquus* (Chaga) ekstrelerinin antimutajenik ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmiş, ekstrelerin *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerine önemli ölçüde antimutajenik etki gösterdiğini bulmuşlardır.

Sotto vd. (2010), *Sisymbrium officinale* Scop. (dereotu) ekstresinin antimutajenik aktivitesini *Salmonella typhimurium* TA98, *Salmonella typhimurium* TA100 ve *Escherichia coli* WP2-uvrA suşları üzerinde güçlü bir antimutajenik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Eski ve yeni literatürler incelendiğinde kansere karşı kullanılan bitkilerin 1400'ün üzerinde olduğu görülür. Son senelerde *Cruciferae*, *Compositae*, *Euphorbiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae*, *Rutaceae*, *Apocynaceae*, *Rubiaceae* bitkilerinin karsinogenezisi etkilediğini bildiren raporların sayısı her geçen gün biraz daha artmaktadır. Bu bitkilerin tüketilmesi ile insanlarda çeşitli kanser türlerinin insidansının azalması arasında ilişki olduğu iddiaları ve bu konuda yapılan bilimsel çalışmalar bulunmaktadır (Graham *et al.* 1978, Graham 1983). Yine bu bitkilerden izole edilen

bazı maddelerin hayvanlarda karsinogenezi inhiye ettiği bildirilmiştir (Stoewsand *et al.* 1978, Wattenberg and Loub 1978, Bojal *et al.* 1982).

Biyolojik aktiviteye sahip doğal ürünlerin *in vitro* değerlendirilmesi için bilimsel stratejiler, son zamanlarda değişmektedir. Birçok sayıdaki geleneksel doğal ürünlere ilgi her geçen gün artmaktadır (Kurokawa *et al.* 1993, Cordell, 1995, Vlietinck *et al.* 1995, Taylor *et al.* 1996). Bu amaçla çalışmamızda endemik bir tür olan ve daha önce antimutajenik aktivitesi ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmayan *Brassicaceae* (*Cruciferae*) familyasına giren *Alyssum virgatum* türü kullanılarak, bu bitkinin antimutajenik ve antisitotoksik etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışma bakteriyel (Ames testi) ve bitkisel (*Allium* testi) hücreler kullanılarak yapılan iki test sistemiyle gerçekleştirilmiştir.

Kısa zamanlı bakteriyel testler içerisinde en yaygın kullanılanı, 1970'lerin başında Bruce Ames ve onun çalışma arkadaşları tarafından (Ames 1979, Ames and McCann 1981, Maron and Ames 1983) geliştirilen Ames testidir. Bu test sistemi kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini araştırmak amacıyla standardize edilmiş ve günümüzde en fazla kabul gören yöntemlerden biridir (Maron and Ames 1983, Friedberg *et al.* 1995, Mortelmans and Zeiger 2000). Bu sistem; sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda *in vitro* mutasyonlar ile elde edilen histidin sentezini yapamayan bir dizi *Salmonella* mutant suşları kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Jorgensen *et al.* 1987, Mortelmans and Zeiger 2000).

Ames-*Salmonelle*/mikrozom test sisteminin dünya genelinde genel kabul görmesinin nedenlerinden biri test sisteminin mutajen/karsinojenik madde tespitinin yanı sıra antimutajenik ve antikarsinojenik madde tespitini de yapabilmesidir (Fратиanni *et al.* 2007). Yapılan bazı çalışmalarda karsinojen ve non-karsinojen olan 300 madde Ames test sistemine tabi tutulmuş ve Ames test sisteminin karsinojen maddeleri mutajen olarak tespiti %90 bulunurken, non-karsinojenlerin non-mutajen olarak tespiti %87 olarak bulunmuştur (McCann and Ames 1976).

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 materyaline ek olarak kimyasalların kromozomlar üzerindeki etkisini araştırmak için *Vicia faba* (Amer and Ali 1983), *Tradescantia paludosa* (Dryanosvka 1987), *Hordeum vulgare* (Kluge and Podlesak 1985), *Pisum sativum* (Amer vd. 1999) ve *Crepis capillaris* (Dimitrov 1994) gibi pek çok bitki türü yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çeşitli kimyasalların, su örneklerinin ve bitki ekstraktlarının genotoksik etkileri hayvansal, bakteriyel ve bitkisel test sistemleri ile saptanabilmektedir. Bir bitkisel test sistemi olan *Allium* test ile soğan bitki köklerinin büyümesini engelleyen uygulamaların toksisiteyi ölçülebilmektedir. *Allium* test sonuçları, prokaryot veya diğer ökaryotlardan oluşan test dizeleri ile uygunluk göstermektedir (Fiskesjö 1981a, Fiskesjö 1993, Mısıık and Mıcıeta 2002).

Allium cepa çevresel kirleticilerin zararlı etkilerine karşı oldukça duyarlı bir bitkidir. *Allium* test, çevresel tehlikelere neden olan kimyasallar, kirleticiler için hızlı ve ucuz bir tarama yöntemidir ve diğer test sistemleri ile de karşılaştırılabilir sonuçlar sağlamaktadır. Makroskobik ve mikroskobik etkileri arasında iyi bir korelasyon olduğu ve makroskobik etkisinin (kök büyümesinin inhibisyonu) oldukça duyarlı bir parametre olduğu bildirilmiştir (Fiskesjö 1985). Hücre bölünmesinin inhibisyonu kök büyümesi inhibisyonuna neden olduğundan, mitotik indeks ile kök büyüme oranı arasında bir ilişki vardır (Liu *et al.* 1992).

Allium test toksisite ve mutajeniteyi hedefleyen bir testtir. Büyümenin inhibisyonu ölçülerek toksisite kolaylıkla gözlenebilirken mutajenite kromozom kırıklarının oranıyla ilişkilidir. *Allium cepa* kök ucu hücreleri, sitolojik testler için mükemmel bir sistem oluşturmaktadır (Fiskesjö 1985).

Allium testinde, kontrol grubu olarak su kullanılıyorsa sudaki toksik etki yaratan Cu ve Ca gibi iyonların uzaklaştırılması gerekliliği vurgulanmıştır (Fiskesjö 1985). Bu gereklilikten dolayı bu çalışmada da kontrol grubu olarak distile su kullanılmıştır.

Allium cepa'nın kromozomları ve hücre bölünmesi üzerinde çevresel etmenlerin toksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde etkili konsantrasyon değerinin belirlenmesinin önemli olduğu bildirilmiştir (Fiskesjo 1985). Kontrol grubuna göre mitotik indeksi yarıya indiren konsantrasyon değeri sitotoksik sınır değeri olarak kabul edilmektedir (Sharma 1983).

Benzer birçok araştırmada, genotoksik çalışmalarda kullanılmak üzere çevresel kirleticilerin konsantrasyonlarının belirlenmesi için EC₅₀ değeri saptanmıştır (Nielsen and Rank 1994, Rank and Nielsen 1998, Chauhan *et al.* 1999, Yüzbaşıoğlu 2001, Ateeq *et al.* 2002, Saxena *et al.* 2005, Yıldız vd. 2006). Çalışmamızda da *Alyssum virgatum* türünün distile su ekstratlarının *Allium* test ile kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi incelenmiş olup EC₅₀ konsantrasyonu 1,56 g/L olarak bulunmuştur. Kimyasalların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde EC₅₀ değerinin kullanılmasının yanı sıra, yarısı, dörtte biri, sekizde biri, iki katı, dört katı gibi değerler de kullanılmıştır (Chauhan *et al.* 1999, Saxena *et al.* 2005). Buna karşın, kimyasalın EC₅₀ değerine bağımlı kalmaksızın farklı konsantrasyonların uygulandığı çalışmalar da mevcuttur (Pavlica *et al.* 2000, El-Ghamery *et al.* 2003, Yi and Meng 2003, Chandra *et al.* 2005). Yaptığımız çalışmada, konsantrasyon artırıldıkça kök büyümesinde doza bağlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

Allium testinde kök büyüme inhibisyonu varsa, her zaman bölünen hücre sayısında azalma vardır (Fiskesjo 1997, Bakare and Wale-Adeyemo 2004, Babatunde and Bakare 2006). *Allium cepa*'da kök büyümesinin inhibisyonu ekstre içindeki bazı ağır metaller yüzünden olabilir. *Azadirachta indica*, *Mangifera indica*, *Cymbopogon citratus* and *Morinda lucida* ekstratlarının farklı konsantrasyonlarda çinko (Zn), bakır (Cu), mangan (Mn), demir (Fe), kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb) içerdikleri rapor edilmiş olup (Al-Moaruf *et al.* 2004, Haider *et al.* 2004) bitkilerin içeriklerinde bulunan bu metallerin *Allium cepa* kök büyümesinde inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Boroffice 1990, Fiskesjo 1997, Lerda 1992).

Brassicaceae familyası üyelerinden pek çoğu metal biriktirme özelliğine sahiptir. Özellikle *Alyssum* cinsine ait pek çok türün nikel metalini biriktirmesi ve bazı türlerde

bu oranın kuru yaprak ağırlığının %3'üne tırmanması bu alanda elde edilmiş önemli bulgulardandır (Kramer *et al.* 1996). Çalışmamızda *Alyssum virgatum* türünün *A. cepa* kök büyümesinde inhibisyon etkisi göstermesi nikel metalini biriktirmesinden kaynaklanabilir.

Reeves vd. (2004), Türkiye'de endemik olarak yetişen ve Ni hiperakümülatörü bitkilerden *Alyssum*'un bazı çeşitlerinde Ni derişimlerini belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre g/kg olarak *Alyssum cassium* 5,59-20,00, *Alyssum callichroum* 0,033-10,9, *Alyssum huber-morathi* 1,22-13,5, *Alyssum masmenaeum* 5,48-24,3, *Alyssum pinifolium* 6,67-12,6 *Alyssum pterocarpum* 1,19-6,74 g Ni/kg bitki olduğu belirtilmiştir. Prasad (2005), yaptığı çalışmaya göre, bu çalışmada kullanılan *Alyssum virgatum* türünün Ni biriktirme oranını 6,23 g/kg olarak bulunmuştur.

Alyssum corsicum, doku kültürü şartlarında farklı nikel derişimleri varlığında yetiştirilerek nikel biriktirme potansiyeli ve metal içeriğindeki değişim belirlenmiştir. Bitkiye nikelin değişen oranları uygulandıktan sonra; *Alyssum corsicum* bitkisinin nikel metalini köklerden çok gövdesinde biriktirdiği, kükürt ve çinko oranının gövdede nikel derişimi ile orantılı bir şekilde artış gösterdiği görülmüştür. Mangan derişimi de gövdede diğer metaller kadar belirgin olmamakla birlikte artan bir değer gösterirken, köklerde ise magnezyum derişiminin artış gösterdiği bildirilmiştir (Aydaş 2008).

Erdoğan (2005), nikel stresinin fidelerin kök boyları üzerine etkisini incelemiş ve yapılan çalışmada, nikel dozu arttırıldıkça bitki kök boyu uzunluklarında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Kontroldeki fidelerin kök boyları en yüksek değer (36,74 cm) olarak kaydedilmiştir. Diğer dozlarda ise bitki boyları gittikçe azalmış ve nikel dozu denemedeki en yüksek düzeye çıkartıldığında bitki kök boyu uzunluğu 4,45 cm'ye düşmüştür. Sonuç olarak, kontrol grubunun kök uzunluğuna göre yaklaşık %88 oranında bir azalma belirlenmiştir. *Allium* testi çalışmasında kullandığımız *Alyssum virgatum* dozları, kontrol grubuna göre kök uzunluğunda azalma göstermiştir. Kök uzunlukları konsantrasyon artışına bağlı olarak azalmıştır. Çalışmamızda kullandığımız en yüksek konsantrasyon olan 100 g/L'lik ekstreden elde edilen kök uzunluğu değeri 0,39 cm olarak belirlenmiş ve bu da kontrol grubuna (3,46 cm) göre yaklaşık %88'lik

bir azalma oluşturduğunu göstermektedir. Bu iki çalışma arasındaki paralellik kullandığımız bitki türünde de ağır metal (Ni) birikiminin olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışma sonucunda *Allium* test kök büyümesi inhibisyonu testi sonuçları Dunnett-t testine göre değerlendirilmiş olup 100 g/L konsantrasyonu dışında 0,8, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, ve 50 g/L'lik konsantrasyonlarda kök büyüme inhibisyonu istatistiksel açıdan 0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur.

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, Wierzbicka 1988, Hidalgo *et al.* 1989, Antonsiewicz 1990). Bu bilgiye dayanarak, *Alyssum virgatum* ekstresinin hazırlanan konsantrasyonlarından 1,56 g/L ve üzerindeki dozların, *A. cepa* kök uçlarına subletal etkisinin olduğu sonucuna ulaşılabilir. Kök büyümesinin inhibisyonu genellikle apikal meristematik aktivite (Webster and Macleod 1996) ve farklılaşma sırasında hücrenin uzamasıyla (Fuskoni *et al.* 2006) ilgilidir.

Ayaz vd. (1996)'ne atfen İnceer vd. (2000)'nin bildirdiğine göre, çinko, kadmiyum, bakır ve civa gibi ağır metaller, tohumların çimlenmesi esnasında amilaz ve peroksidaz izoenzimlerinin sayısını arttırmış, tohumların çimlenme yüzdesini ise azaltmıştır. Civalı bileşiklerin, DNA replikasyonunu engelleyebileceği (Kara *et al.* 1994), kromlu bileşiklerin ise, kromatid kırılmalarına yol açtığı belirtilmektedir (Klasterska *et al.* 1976). Ayrıca, civanın bir inhibitör gibi görev yaparak normal hücre bölünmesi için gerekli proteinlerin sentezini engellediği ve bu şekilde hücrelerde mitotik gecikmelere sebep olduğu da belirtilmiştir (Nandi 1985). Benzer şekilde, bakır klorürün de aynı etkilere sahip olması nedeniyle mitotik indekste azalmalara ve çeşitli kromozom anormalliklerine sebep olduğu gösterilmiştir (İnceer *et al.* 2000).

Bu araştırmada *Allium cepa*'nın kök ucu meristem hücrelerinin kontrol (distile su), pozitif kontrol (MMS) ve 10 ppm MMS içeren *Av* ekstresinin farklı konsantrasyonları (3,125, 1,56 ve 0,8 g/L) ile maruz kalma sürelerinin (24, 48 ve 72 saat) mitotik indeks üzerine etkisi incelenmiştir. *Allium cepa*'nın kök ucu meristem hücrelerinin hücre döngüsünün 24 saat (Kihlman 1971) veya yaklaşık 20 saat (Grant *et al.* 1981) olduğu

bildirildiği için araştırmamızda, hücre döngüsünün 24 saatte tamamlandığı göz önüne alınarak 24 saat distile suda köklenmiş soğanlar, 10 ppm MMS içeren Av türünün farklı konsantrasyonlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır.

Sitotoksisite, mitotik indekste bir azalma olarak tanımlanmaktadır (Smaka-Kincl *et al.* 1996). Mitotik indeks (MI), hücre bölünme frekansını tahmin etmeye izin veren bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Marcano *et al.* 2004). Bu bilgi dahilinde antisitotoksisiteyi, uygulanan mutajene karşı mitotik indeksteki artış olarak tanımlayabiliriz.

Allium test ile yapılan mitotik indeks ve mitotik safha yüzdesi belirleme çalışmalarına göre süre ve konsantrasyon artışına bağlı olarak mitotik indeksin MMS'e göre arttığı gözlenmiştir. Seçilen dozların *A. cepa* kök uçlarına 24, 48 ve 72 saat uygulanarak belirlenen mitotik indeks değerlerinden en düşük mitotik indeksin Av ekstresinin 10 ppm MMS içeren 0,8 g/L'lik konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasında (34.00 ± 2.93), en yüksek mitotik indeks ise 10 ppm MMS içeren 3,2 g/L'lik konsantrasyonun 72 saatlik uygulamasında (46.8 ± 1.63) elde edilmiştir. Mitotik indeksteki bu artışın sebebi, *Alyssum virgatum* ekstrelerinin MMS varlığında sitotoksik etki göstermemesi olarak değerlendirilebilir. Mitotik indeks değerinin kontrol grubundan düşük olması, test edilen bileşiğin büyüme ve gelişmesini negatif yönde etkiler. Buna karşılık mitotik indeks değerinin yüksek olması durumunda ise hücre bölünmesi uyarılır, kontrolsüz çoğalma ve hatta tümör oluşumuna sebep olabilir (Hosbina *et al.* 2002, Fernandes *et al.* 2007). Hücre çoğalmasının artması DNA tamiri için gerekli olan zamanın azalması sonucunda gerçekleşebilir (Evseeva *et al.* 2003).

Mitotik indeks artışıyla beraber profaz safhasında artış metafaz safhasında düşüş görülmektedir. Bal (1995), profaz yüzdesinin yüksek olmasını iğ teşekkülünün engellenmesi veya ertelenmesinden kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Av ekstresinin mitotik faz yüzdelere etkisi incelendiğinde profaz yüzdesinin 24 saat uygulamasında konsantrasyon artışına bağlı olarak, 48 ve 72 saat uygulamalarının ise MMS'e göre arttığı görülmüştür. Metafaz indeksinin, 24 saat 10 ppm MMS içeren 0,8 g/L'lik konsantrasyon uygulaması hariç pozitif kontrole (MMS) göre azaldığı görülmüştür.

Anafaz ve telofaz yüzdelerinin ise MMS'e göre artış ve azalış şeklinde değişiklikler gösterdiği görülmüştür. Bu artış ve azalışların birçoğu istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Scolnic and Halazonetis (2000) hücrelerin metafaza geçişini geciktiren ve chfr kontrol noktası olarak bilinen bir bölge tanımlamışlardır. Bu profaz ve metafaz arasındaki kontrol noktasında, kimyasallarla muamele sonucunda metafazdan anafaza geçişin engellenmesi, bu artış ve azalışların sebebi olarak düşünülebilir.

Allium cepa kök ucu meristem hücreleri üzerine Av ekstrelerinin 10 ppm MMS içeren farklı konsantrasyon ve sürelerinin antisitotoksik etkileri incelenmiştir. *Allium* test ile yapılan kromozom aberasyon belirleme çalışmalarına göre yapışıklık, anafaz köprüleri, kalgın kromozom ve bozulmuş anafaz-telofaz anomali yüzdelerinde düşüşler gözlenmiştir. Fakat kalgın kromozom yüzdesinin 24 saat uygulamasının 10 ppm MMS içeren 3,2 g/L'lik ve 48 saatin tüm konsantrasyon uygulamaları frekansının MMS'den yüksek olduğu görülmüştür.

En fazla anomali olayına Av ekstresinin 10 ppm MMS içeren 3,2 g/L'lik dozun 24 saat uygulamasında (56,00±5,29), en az anomali olayına ise 10 ppm MMS içeren 0,8 g/L'lik dozun 24 saatlik uygulamasında (47,40±8,79) rastlanılmıştır. Kalgın kromozom olayı tüm saat ve doz uygulamalarında en fazla görülen anomalidir. En fazla % 98,48 oranında 10 ppm MMS içeren 1,6 g/L'lik dozun 48 saatlik uygulamasında rastlanmıştır. Bu bozukluk Av ekstresinin mikrotübül oluşumunu etkilemesi sonucunda kaynaklanmış olabilir (Amer and Ali 1983, Kumari *et al.* 2009). Kalgın veya geri kalmış olarak adlandırılan kromozomların varlığı, kardeş hücrelere farklı sayıda kromozomların ayrılmasına ve bunu takiben interfazdaki eşit olmayan boyutta veya düzensiz şekildeki nükleuslu kardeş hücrelerin oluşmasına neden olmaktadır (El-Ghamery *et al.* 2003).

Bozulmuş anafaz-telofaz olayına en fazla % 11,39 oranında 10 ppm MMS içeren 0,8 g/L'lik dozun 24 saatlik uygulamasında, en az % 1,21 oranıyla 10 ppm MMS içeren 0,8 g/L'lik dozun 72 saatlik uygulamasında rastlanmıştır. Kromozom kırılmalarının, kopmalarının ve iğ iplikleri inhibisyonunun nedeni çeşitli kimyasalların iğ iplikleri için gerekli olan temel proteinleri etkilemesi sonucunda olabilir (Kaymak 2005). Soğan hücrelerindeki iğ ipliği bozukluklarının indüksiyonu, hücre bölünmesinin sonraki

safhalarında anöploidi ve mikronükleus oluşumlarına sebep olabilir. Bu genellikle, anafaz safhasında kromozomların düzensiz dağılımından ileri gelmektedir. Dolayısıyla bazı kromozomlar diğerlerine göre kutuplara daha önde gider (Grant 1978).

Anafaz köprü oluşumu en fazla 10 ppm MMS içeren 3,2 g/L'lik dozun 72 saatlik uygulamasında (% 5,30) görülürken en az 10 ppm MMS içeren 3,2 g/L'lik dozun 24 saatlik uygulamasında (%1,07) görülmüştür. Köprülerin, kromozomların kırılması ve yeniden bir araya gelmesi ile oluştuğu bildirilmiştir (Soliman 2001). Kromozomların yapışması kromatidlerin birbirlerinden ayrılmasını engellemekte ve köprülerle birbirlerine bağlı kalmalarına neden olmaktadır (Kabarity *et al.* 1974, Badr *et al.* 1992). Eğer nükleus bölünmeye hazır olduğunda heterokromatin blokları DNA replikasyonunu tamamlamadıysa köprü oluşumları meydana gelebilir (Kaltsikes *et al.* 1984). Anafaz-telofaz köprüleri translokasyon sırasında eşit olmayan kromatid değişimi ya da kromozom ve kromatidlerin kırılıp birleşmeleri sonucunda oluşur ve yapısal kromozom mutasyonlarına sebep olurlar (El-Ghamery *et al.* 2000, Luo *et al.* 2004).

Çalışmamızda karşılaştığımız diğer anomali yapışıklıktır. En fazla 10 ppm MMS içeren 3,2 g/L'lik dozun 24 saatlik uygulamasında (%2,14), en az ise 10 ppm MMS içeren 1,6g/L'lik dozun 72 saatlik uygulamasında (%0,46) görülmüştür. Darlington and Mc Leish (1951), yapışıklığın kromozomal DNA'nın parçalanması veya depolimerizasyonundan dolayı olabileceğini ileri sürmüştür. Yapışıklığın, inter-kromozomal kromatin fibrillerin birbirine girmesi sonucunda kromozomlar arası subkromatid bağlantıların oluşmasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Mc Gill *et al.* 1974). Yapışıklığın diğer bir sebebi uygulanan bitki ektresinin kromozomların kutuplara doğru hareketlerini sınırlaması olabilir. Bunun sonucunda kromozomlar kutuplara çekilemez ve yoğunlaşarak yapışık bir durum sergilerler. Ayrıca kromozomlardaki yapışıklık, uygulanan kimyasal maddenin yüksek toksisiteye sahip olduğunun bir göstergesidir ve genellikle de geri dönüşümsüz olup, hücrede hasarlara ya da hücrenin ölümüne sebep olabilir. (Fiskesjö 1985).

Diğer anomalilerin toplam yüzdesinde ise 72 saat uygulamasının 10 ppm MMS içeren 1,6 ve 3,2 g/L'lik dozları hariç diğer uygulamaların MMS'e göre azaldığı tespit

edilmiştir. Ayrıca çeşitli konsantrasyon ve saat uygulamalarında C-metafaz, çekirdek bozukluğu, poliploidi ve binükleer hücre anomalilerine rastlanmamıştır. Sitotoksikite c-mitoz, multipolar anafazlar, yapışıklık ve vagrant (geri kalmış veya ileri gitmiş kromozomlar) kromozomlu hücrelerin fraksiyonunda bir artış olarak tanımlanmaktadır (Fiskesjö 1995). Bizim çalışma sonucunda elde ettiğimiz anomali yüzdelerindeki düşüş *Alyssum virgatum* türünün MMS varlığında antigenotoksik bir etkiye sahip olduğuna bağlanabilir.

Karsinojen ve mutajen maddelerin araştırılmasında farklı test yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları DNA hasarına sebep olan kimyasal mutajen ve karsinojenlerin test edildiği sitogenetik metodlardır. Bu testler, kardeş kromatid değişimi (SCE = sister chromatid exchange) (Trosko 1997, 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.

Son yıllarda, geleneksel tıbbi bitkilerin mutajenik-antimutajenik özelliklerinin belirlenmesinde araştırmacılar, esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans and Zeiger 2000).

Çalışmamızda *Alyssum virgatum* türünün antimutajenite tayininde kullandığımız Ames testi ayrıca *Salmonella*/microsome test sistemi olarak da adlandırılmaktadır (Maron ve Ames 1983). *Salmonella* mutajenite test sistemi çeşitli mutajen ve karsinojenlerin aktiviteleri üzerinde antioksidanlar başta olmak üzere çeşitli ajanların inhibitör etkilerinin izlendiği, çok önemli bir kısa zamanlı test sistemidir (Rosin and Stich 1979, Alekperov *et al.* 1986). Bu test sistemi aynı zamanda, kimyasalların mutajen veya karsinojen etkilerini ortadan kaldıran, bu kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyen antimutajenlerin ve antikarsinojenlerin tayininde de kullanılmaktadır (Rosin and Stich 1978,1979, Shamberger *et al.* 1979, Alekperov *et al.* 1986, Victorin *et al.* 1987).

Kimyasal karsinojenler veya bunların metabolitleri DNA'ya kovalent olarak bağlanırlar (Miller and Miller 1976). Bu temel ilişki *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile antimutajenlerin araştırılmasını sağlamaktadır. Birçok doğal ve sentetik bileşiklerin bu test sistemiyle karsinojenlerin genotoksik aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Rosin and Stich 1979, Bahttachariya *et al.* 1987).

Deneyde *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT-2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar sonucu elde edilen TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Bu mutantlar his⁻ bakteriler olup, his operonunun değişik bölgelerinde farklı birer mutasyon içerirler. *Salmonella*/mikrozom testi ile kimyasal maddelerin bu test suşlarını his⁺ revertanlar haline dönüştürme özellikleri belirlenmektedir. TA98 suşu çerçeve kayması mutasyonlarına (frameshift), TA100 suşu ise baz-çifti değişim mutasyonlarına (base-pair) karşı duyarlıdır. Çalışmamızda bu mutant bakterileri kullanmamızın nedeni ise bu mutasyonların diğer mutasyonlara göre daha fazla sıklıkta görülmesidir.

Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında bu çalışmada da olduğu gibi genellikle *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları daha çok kullanılmaktadır. Bunun sebebi de bu iki suşun çeşitli mutajenlere karşı duyarlılığının diğer suşlara göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Asal 1985).

Salmonella/mikrozom test sisteminin, memelilerde gerçekleşen biyotransformasyon olayına model olması için, sisteme S9 fraksiyonu eklenmiştir. Böylece bu testte kullanılan bakteri suşlarının metabolizması, memelilerdeki detoksifikasyon mekanizmasına benzetilmiştir (Ames *et al.* 1973).

Çalışmamızda, kullanılan bitki ekstresinin farklı dozları revertant sayısını değişik şekillerde etkilemiştir. TA98 için ortalama revertant koloni sayısı S9 fraksiyonu varlığında $34 \pm 2,24$, yokluğunda ise $30 \pm 0,86$ bulunmuş, TA100 için ise ortalama revertant koloni sayıları S9 fraksiyonu varlığında $124 \pm 3,77$ iken S9 fraksiyonu yokluğunda $117 \pm 2,86$ olarak bulunmuştur. Ames vd. (1973)'e göre mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar, TA98 için 20-50 revertant/plak, ve TA100 için

75-200 revertant/plaktır (Ames *et al.* 1973). Yaptığımız çalışmada elde edilen bulgular da bahsedilen değerler arasındadır. Bu da bize kullandığımız suşların genotiplerinin doğruluğunu göstermektedir. Bu değerlerin bu kadar geniş aralıkta yer almaları çeşitli parametrelerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle her mutant suş için, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı tek bir sayı olarak değil de, belirli bir aralıkta verilir. Bu parametreler arasında minimal ortamın tipi, glukoz-6-fosfat, β -NADP, fosfat tamponu, glukoz ve tuz çözeltisinin derişimi, petrillerdeki minimal agarın hacmi, top agarın miktarı ve yayılma şekli, etüvdeki nem oranı, S9 fraksiyonunun miktarı, minimal agarın bileşimi ve hazırlanmasındaki farklılıklar gibi etkileri sayabiliriz (Boath *et al.* 1980, Belser *et al.* 1981).

Bu çalışmada, *Alyssum virgatum* türünün distile su ekstresinin TA100 S9'suz deneylerde 10 μ g/plak sodyum azid (SA), TA100 S9'lu deneylerde 5 μ g/plak 2-aminoanthracene (2AA), TA98 S9'lu deneylerde 200 μ g/plak 2-aminofluorene (2AF), TA98 S9'suz deneylerde 200 μ g/plak 4-nitro-o-fenilendiamine (4NPD) mutajenlerine karşı antimutajenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Negatif kontroldeki koloni sayısının %80'inden daha az koloni gelişmesine olanak sağlayan test maddesi konsantrasyonları sitotoksik olarak tanımlanmış ve çalışmalarda kullanılmamıştır (Edenharder and Grünhage 2003).

Alyssum virgatum'un toprak üstü kısımlarının distile su ekstresinin antimutajenite deneyinde kullanılmadan önce uygulama konsantrasyonlarını belirlemek için yapılan sitotoksik etki belirleme çalışmalarında 312,5 μ g/plak, 625 μ g/plak, 1250 μ g/plak, 2500 μ g/plak, 5000 μ g/plak ve 10000 μ g/plak konsantrasyonları kullanılmıştır. Kullanılan altı konsantrasyondan 10000 μ g/plak konsantrasyonunda *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerine sitotoksik etki görüldüğünden dolayı bu konsantrasyonun altındaki dozlarla çalışılmıştır.

Bir maddeye antimutajen denilebilmesi için inhibitör etkisinin bazı değerler arasında olması gerekmektedir. Bitki ekstresinin mutajen üzerindeki inhibitör etkisi %20-40 arasında olduğu durumlarda antimutajenik etki orta dereceli olarak tanımlanırken;

%40'dan fazla olduğu durumlarda bitki ekstresi güçlü antimutajenik olarak kabul edilmektedir. İnhibitör etkinin %20'den daha az olduğunda ise antimutajenik etki pozitif olarak kabul edilmemiştir (Negi *et al.* 2003).

Ames testi sonuçlarına göre, *Alyssum virgatum* türünün distile su ekstresinin 312,5 µg/plak, 625 µg/plak, 1250 µg/plak, 2500 µg/plak ve 5000 µg/plak uygulamalarında doza bağılı olarak koloni sayılarında azalış gözlenmiştir. 625 µg/plak, 1250 µg/plak, 2500 µg/plak ve 5000 µg/plak uygulamalarında sodyum azid, 2-aminoanthracene, 2-aminofluorene ve 4-nitro-o-fenilendiamine mutajenlerine karşı istatistiksel öneme sahip antimutajenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge).

Alyssum virgatum, *S.typhimurium* TA98 suşunda mutasyonu indükleyen 2AF üzerinde 5000 µg/plak dozunda %21,92 inhibisyon oranıyla, %20,02 inhibisyon oranıyla ise 5000 µg/plak dozunda 4NPP mutajenine karşı orta derecede antimutajenik etki göstermiştir. Çalışmamızda kullandığımız *Alyssum virgatum* ekstresinin S9 varlığında ve yokluğunda TA100 suşu üzerine gösterdikleri inhibisyon oranları, TA98 suşuna göre daha düşük bulundu (312,5 µg/plak dışında). Buradan Av ekstresinin çerçeve kayması mutasyonlarına karşı antimutajenik etkisi olduğu anlaşılmıştır. Bu bitkinin kimyasal kompozisyonu ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmadığı için ayrıca bitkiyle ilgili herhangi bir antioksidan, antitümör v.b. çalışmalar yapılmadığı için antimutajenik aktivitesinin hangi mekanizmaya bağılı olduğu bu aşamada açıklanamamaktadır.

Çalışmamıza konu olan *Alyssum virgatum* türü *Brassicaceae* (*Cruciferae*) familyası'na aittir. Bu familyaya ait bazı bitkiler geçmişte olduğu gibi günümüzde de besin olarak tüketilmektedir. Bu bitkilerin birçoğundan geleneksel tıpta da faydalanılmıştır (Baytop 1999, Çubukçu *et al.* 2002). *Cruciferae* bitkileri, çeşitli etken maddeleri içermelerinin yanında, özellikle indol-3-karbinol ve glukosinolat türevleri içerikleri bakımından, halen araştırmacıların dikkatini çekmeye devam etmektedirler. Indol-3-karbinol *Cruciferae* familyasına spesifik, temel tedavi değeri olan maddelerden biridir. Bu madde, bitkilerin sıkılması ya da pişirilmesi sırasında ortaya çıkmaktadır. Indol-3-karbinol, vücuttaki doğal detoksifikasyon enzimlerinin doğal antioksidanı ve güçlü bir uyarıcısıdır (Broadbent and Broadbent 1998). Indol-3-karbinol, *Cruciferae* familyası

bitkilerinde, temel antikarsinojen maddelerden birisidir (Stoewsand 1995). Epidemiyolojik çalışmalarda *Brassicaceae* bitkilerinin karsinogenezisi etkilediği ve bu tip bitkilerin çok tüketildiği yerlerde kanser insidansının azaldığı gösterilmiştir (Graham *et al.* 1978, Graham 1983). Ayrıca bu bitkilerden elde edilen maddelerin deney hayvanlarında denenmesi bu maddelerin hayvanlarda karsinogenezisi inhibe ettiğini göstermiştir (Stoewsand *et al.* 1978, Wattenberg and Loub 1978, Boyd *et al.* 1982). Bu maddenin meme ve prostat kanserinde ki tümör hücrelerinde etkili olduğu ve ayrıca serbest radikaller üzerinde tutma etkisi yaratarak antioksidan etki gösterdiği de yine bilimsel araştırmalarda saptanmıştır (Bradlow 1995, Arnao 1996, Staub *et al.* 2002, Sarkar and Li 2004). İnsanlar da diyetle alınan indol-3-karbinol'ün östradiol mekanizmasında etkili olduğu ve östrojen kaynaklı hastalıklara karşı yeni bir chemopreventive (kansere karşı koruyucu) özellik gösterebileceği kanıtlanmıştır (Michnovicz and Bradlow 1990). Indol-3-karbinol'ün akciğer kanserinin tedavisinde kullanılacak terapötik değeri olan bir ajan olabileceği de gösterilmiştir (Riby *et al.* 2000).

Genellikle, *Cruciferae* Familyası bitkilerine özgü başka bir temel madde grubu da glukosinolatlardır. Glukobrassisin, glukotropaeolin ve glikosinalbin birçok hayvan modelinde çalışılmıştır. Glukobrassisin farede akciğer ve midede kimyasal madde ile oluşturulmuş neoplaziye ve sıçanlarda oluşturulan meme neoplazisine inhibisyon yaptığı bildirilmiştir (Tamer 1992). Bu grup maddeler bitkinin hücre duvarlarında bulunurlar ve bitkinin zedelenmesi anında ortaya çıkarlar. Birçok önemli farmakolojik etkilerinin yanında, bu maddelerin de (Fahey *et al.* 1997) chemopreventive (kansere karşı koruyucu) etkileriyle ilgili çalışmalar bilimsel literatürde bulunmaktadır (Hect 1995). Ayrıca, glukosinolatların antioksidan etkileri yapılan çalışmalarla da kanıtlanmıştır (Klanakaran 2006). Bu maddelerin önemli etkilerinden bir diğeri de antimikrobiyal aktiviteleridir (Uda *et al.* 1993).

Oturgan (2007), yaptığı çalışmayı *Cruciferae* (*Brassicaceae*) Familyasına ait *Brassica oleracea* var. *Italica* (Brokoli), *B.oleracea* var. *acephala* (Karalahana), *B.oleracea* var. *capitata* (Beyaz lahana), *B.oleracea* var. *botrytis* (Karnabahar), *B.oleracea gemmifera*

(Brüksel lahanası), *B.rapa* var. *rapa* (Şalgam), *B.nigra* (Siyah hardal), *Sinapis alba* (Beyaz hardal), *Raphanus sativus* (Kırmızı yumrulu, Beyaz yumrulu ve Siyah yumrulu Turp), *Eruca sativa* (Roka) ve *Lepidium sativum subsp.sativum* (Tere) bitkilerinin antioksidan, antimikrobiyal ve potansiyel sitotoksik özelliklerini ortaya çıkarmak amacıyla gerçekleştirmiştir. Ekstrelerin antimikrobiyal aktivite kontrolleri, antibakteriyel ve antifungal olmak üzere iki kollu olarak araştırılmıştır. Bitkilerin hiçbirisi standart flukonazole göre herhangi bir antifungal etki göstermemiştir. *Brassica oleracea* var. *Italica*'nın *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus*'a karşı, *Brassica oleracea* var. *acephala*, *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* (Siyah yumrulu) ve *Brassica oleracea* var. *gemmifera*'nın *S.aureus* ve *B. Cereus*'a karşı, *Raphanus sativus* (Beyaz yumrulu), *Raphanus sativus* (Kırmızı yumrulu), *Lepidium sativum subsp.sativum*, *Brassica oleracea* var. *capitata* ve *Brassica oleracea* var. *botrytis* bitkilerinin ise sadece *B.cereus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Sonuç olarak, endemik olan *Alyssum virgatum* türünün distile su ekstresi çalışmada kullanılmış olup Ames testi ve *Allium* test ile antimutajenite ve antisitotoksiteleri araştırılmıştır. Yapılan *Allium* test sonucunda kök uzama oranını kontrole göre belirgin bir şekilde azalttığı görülmüştür. Kullanılan doza bağlı olarak MMS varlığında mitotik indekste artış meydana getirerek antisitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ames testinde ise *Alyssum virgatum* ekstresinin uygulanan en yüksek dozunda TA98 suşu üzerine antimutajenik etkiye rastlanmıştır. Bununla birlikte TA100 suşu üzerinde uygulanan tüm dozların antimutajenik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Bitki ekstresinin antimutajenik aktiviteye neden olan aktif içerik ve kimyasal bileşenlerinin aydınlatılarak, bu bileşenlerin aktivitelerinin hangi derecede etkili olduğu araştırmasının yapılabileceği ve ileriki çalışmalar ile desteklenebileceği düşüncesindeyiz. Yapılan mutajenite ve antimutajenite deneylerinde; kısa zamanlı test sistemlerinden hiçbirinin tek başına yeterli olmaması, bu testlerden elde edilen sonuçların uzun zamanlı test sistemleri ile doğrulanmasını gerektirmektedir. Bu sebeple, antimutajenik etkiye sahip bitkisel kökenli doğal bileşiklerin, *in vivo* çalışması yapılarak, insanlar üzerindeki etki mekanizması aydınlatılabilir. Bunlarla bağlantılı olarak, bitkisel kökenli bileşiklerin, gerçekleştirilecek daha ayrıntılı çalışmalar sonucunda, insanlar için, kullanılabilirliği ve daha yüksek ürünler haline dönüştürülmesi mümkün olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- Abdulaev, F.I., Riveron-Negrete, L., Caballero-Orgeta, H., Hernandez, J.M., Perez-Lopez, I., Pereda-Miranda, R. and Espinosa-Aguirre, J.J. (2003). Use of in vitro assay to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology In Vitro*, **17**: 731-736.
- Aboolenein, A.A. (1982). Back to medicinal plants therapy. In the history of medicinal and aromatic plants; Proceedings of the second international congress, Hamdard.
- Adıgüzel, N. and Reeves, R.D. (2002). A new nickel-accumulating species of *Alyssum* (Cruciferae) from western Turkey. *Edinburg Journal of Botany*, **59(2)**: 215-219.
- Adriano, DC (1986). Trace elements in the terrestrial environments springer, Berlin Heidelberg NewYork, 533.
- Akın, A. (1990). Bazı gıda katkı maddelerinin *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile mutajenik etkilerinin saptanması. Bilim Uzmanlığı Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Akinci, I.E and Ongel, O. (2011). Amelioration of nickel toxicity by humic acid on bean (*Phaseolus vulgaris*). *Seedling Growth Ekoloji*, **20(79)**: 29-37.
- Akinci, S. and Akinci, I.E. (2011). Effect of nickel on germination and some seedling growth parameters in Spinach (*Spinacia oleracea*). *Ekoloji*, **20(79)**: 69-76.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R, Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T, Norppa, H., Suhaker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D. and Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, **463**: 11-172.
- Alekperov, U.K., Ames, B.N., Kada, T. and Wattenberg, L.W., (1986). Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutation Research*, **168**: 47-65.
- Alink, G.M., Quika, J.T.K., Penders, E.J.M., Spengelink, A., Rotteveel, S.G.P., Maas, J.L. and Hoogenboezem, W., (2007). Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea* L.) after exposure to Rhine water, as assessed by use of the SCE and Comet assays: A comparison between 1978 and 2005. *Mutation Research*, **631**: 93-100.

- Al-Moaruf, O.A., Muibat, O.B., Asiata, O.I., Isiaka, A.O. and Nureni, O.O. (2004). Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants. *Journal of Food Chemistry*, **85**: 67-71.
- 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 sativum*. *Bulletin of the National Research Center*, **24(4)**: 481-494.
- Ames, B.N. (1979). Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer. *Science*, **204**: 587-599.
- Ames, B.N., Lee, F.D. and Durston, W.E. (1973). An improved bacterial test systems for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Science, USA*, **70**: 782-786.
- Ames, B.N. and McCann, J. (1981). Validation of *Salmonella* test: A reply to risk us and legator. *Cancer Research*, **41**: 4192.
- Angelis, K.J., McGuffie, M., Menke, M. and Schubert, I. (2000). Adaptation to alkylating damage in DNA measured by comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **36**: 146-150.
- Anonim (2012). *Alyssum cinsinin sistematik hiyerarşisi*.
http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=1&tax_id=825
- Antonsiewiez, D. (1990). Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Ledakrin. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, **28**: 79-96.
- Archivio, M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. and Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, **43(4)**: 348-361.
- Arnao, M.B., Sances-Bravo, J. and Acosta, M. (1996). Indole-3-carbinol as a scavenger of free radicals. *Biochemistry Molecular Biological Int.*, **39**: 1125-1134.
- Asal, S. (1985). Bazı pestisitlerin mutajenik etkileri üzerinde araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi*, **9(1)**: 72-78.
- Astrong, P., Gradelet, S., Berges, R. and Suschetet, M. (1997). Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutrition Cancer*, **29**: 60-68.

- Ateeq, B., Farah, M.A., Ali, M.N. and Ahmad, W. (2002). Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research*, **514**: 105-113.
- Avcı M. (2005). Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü, *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Dergisi*, **13**: 27-55.
- Aydaş, S.S.B. (2008). Doku Kültüründe Yetiştirilen *Alyssum corsicum* (Brassicaceae) Bitkisinde Nikel Birikiminin Belirlenmesi ve Moleküler Analizi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Baba, A., Gündüz, O., Save, D., Gürdal, G., Sülün, S., Bozcu, M. ve Özcan, H. (2009). Madencilik faaliyetlerinin tıbbi jeoloji açısından değerlendirilmesi. 62. *Türkiye Jeoloji Kurultayı*, Ankara, 514-515.
- Babaoğlu, S., Açık, L. Çelebi, A. ve Adıgüzel, N. (2004). Türkiye'nin bazı *Alyssum* L.(Brassicaceae) türlerinin RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemleri ile molekül analizleri. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **17(3)**: 25-33.
- Babatunde, B.B. and Bakare, A.A. (2006). Genotoxicity screening of wastewaters from Agbara Industrial Estate Nigeria evaluated with the *Allium* test. *Pollution Research*, **25(2)**: 227-234.
- Backhouse, N., Delporte, C., Apablaza, C., Farias, M., Goity, L., Arrau, S., Negrete, R., Castro, C. and Miranda, H. (2008a). Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**: 160-165.
- Backhouse, N., Rosales L., Apablaza C., Goity L., Erazo S., Negrete R., Theodoluz C., Rodriguez J. and Delporte C. (2008b). Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**: 263-269.
- Badr, A., Ghareeb, A. and El-Din, H.M. (1992). Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells of *V. faba* roots. *Egyptian Journal of Applied Science*, **7**: 457-468.
- Bakale, G. and Mc Creary, R.D. (1990). Response of k_e test to NCI/NTP-screaned chemicals. Non-genotoxic carcinogens and genotoxic non-carcinogenenes. *Carcinogenesis*, **11(10)**: 1811-1818.
- Bakare, A.A. and Wale-Adeyemo, A.R. (2004). The potential mutagenic and cytotoxic effects of leachates from domesticwastes and Aba-Eku landfill Nigeria on *Allium cepa*. *Journal of Nature Environment Pollution Technology*, **3**: 455-462.

- Baker, A.J.M., and Proctor, J. (1990). The influence of cadmium, copper, lead, and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the british isles. *Plant Syst. Evol*, **173**: 91-108.
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, *Ecology and Phytochemistry*. *Biorecovery*, **1**: 81–126.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D. and Smith, J.A.C. (2000) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N., Banuelos, G., (Eds), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 85-107.
- Bal, Ş. (1995). *Datura stramonium* L. ve *Ureginea maritima* L. özsularının *Allium cepa* L. kök ucu mitozu üzerinde sitolojik etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Banuelos, G. S., Ajwa H.A., Mackey B., Wu L., Cook C., Akohoue S., and Zambruski S. (1997). Selenium- induced growth reduction in brassica land races considered for phytoremediation. *Ecotoxicology Environmental Saf.*, **36**: 282-287.
- Barak, P. (1995). Metal-Scavenging Plants to Cleanse The Soil.
http://www.soils.wisc.edu/~barak/soilscience326_agres.htm
- Barcelos, G.R.M., Angeli, J.P.F., Serpeloni, J.M., Rocha, B.A., Mantovani, M.S. and Antunes, L.M.G. (2009). Effect of annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagenesis in HepG2 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **50**: 808-814.
- Barış, A. (2007). Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Barile, F.A. (2008). Principles of Toxicology Testing, CRC Press Taylor & Francis Group, St. John's University, Queens, New York.
- Barquinero, J.F., Barrprios, L., Caballin, M.R., Miro, R. and Ribas, A. (1993). Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutation Research*, **286**: 275-279.

- Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, 2. Basım, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd Şti, İstanbul.
- Baytop, T. (1984). Türkiyede bitkiler ile tedavi. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. No:40.
- Beckett, A. (1985). The Concise Encyclopedia Of Garden Plants, 20-21.
- Békaert, C., Rast, C., Ferrier, V., Bispo, A., Jourdain, M.J. and Vasseur, P., (1999). Use of *in vitro* (Ames and Mutatox tests) and *in vivo* (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachate from a contaminated soil. *Organic Geochemistry*, **30**: 953-962.
- 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.
- Beudot, C., De Me’o, M. P., Dauzonne, D., Eliasc, R., Laget, M., Guiraud, H., Balansard, G. and Dume’nil, G., (1998). Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames test. *Mutation Research*, **417**: 141-153.
- Bhattarhacya, R. K., Francis, A.R. and Shetty, T.K., (1987). Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1: In vitro effect of vitamins. *Mutation Research*, **188**: 121-128.
- Bhuvanewari, V. and Nagini, S. (2005). Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Current Medicine Chemical Anticancer Agents*, **5**: 627-635.
- Blaylock, M.J. and Huang, J.W. (2000). Phytoextraction of metals. In: Raskin, I., Ensley, B.D., (Eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals : Using Plants to Clean Up The Environment*, John Wiley and Sons, Inc, Toronto, Canada, 303.
- 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.
- Boroffice, R.A. (1990). Cytogenetic effects of zinc and chromium on the of onion (*Allium cepa*) root tip. *Nigerian Journal of Natural Science*, **1(2)**: 75-79.
- Boyd, J.N., Babish, J.G. and Stoewsond, G.S. (1982). Modification by beet and cabbage of aflatoxin B1 induced rat plasma α -fetoprotein elevation, hepatic tumorigenesis and mutagenicity of urine. *Food Chemistry Toxicology*, **20**: 47-50.

- Boyd, R.S. and Martens, S.N. (1992). The raison d'être of metal hyperaccumulation by plants. In: Baker, A.J.M., Proctor, J., Reeves, R.D., (Eds), *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils*. Intercept, Andover, 279-289.
- Bradlow, H.L., Sepkovic, D.W., Telang, N.T., and Osborne, M.P. (1995). Indole-3-carbinol. A novel approach to breast cancer prevention (review). *Ann NY Acad Science*, **768**: 180-200.
- Briskin, D.P. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, **124(2)**: 507-514.
- Broadbent, T.A. and Broadbent, H.S. (1998). The chemistry and pharmacology of indole-3-carbinol. *Current Medicine Chemistry*, **5**: 337-352, 469-491.
- Brooks, R.R. (1977). Copper and Cobalt uptake by *Hauminiastrum* species, plant and soil. **48**: 541-545.
- Brooks, R.R. (2000). Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals; Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining. Brooks, R.R., *CAB International*, Cambridge, 1-14, 15-53, 153-180.
- Brooks, R.R., Anderson, C.W.N., Chiarucci, A., LaCoste, C.J., Leblanc, M., Robinson, B.H., Simcock, R. and Stewart, R.B. (1997). Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration*, **67**:407-415.
- Brooks, R.R., Morrison, R.S., Reeves, R. D.,Dudley, T.R. and Akman, Y. (1979). Hyperaccumulation of Nickel by *Alyssum* Linnaeus (*Cruciferae*) Proc.R.Soc.Lond. Sect.B, **203**: 287-403.
- Brown, R. G. (1985). Effects of Wetlands on Runoff Entering Lakes in the Twin Cities Metropolitan Area, Minnesota. U.S. Geological Survey, Water Resource Investigations Report 85-4170. in *Freshwater Wetlands, Urban Stormwater, and Nonpoint Pollution Control: A Literature Review and Annotated Bibliography*, Ed. E.C. Stockdale. 2d Ed. (1991). Washington State Department of Ecology, Olympia, WA.
- Bulmer, A.C., Ried, K., Coombes, J.S., Blanchfield, J.T., Toth, I. and Wagner, K.H. (2007). The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames/*Salmonella* test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **629**: 122-132.

- Cameron, I.L., Munoz, J., Barnes, J.C. and Hardman, E.W. (2003). High dietary level of synthetic vitamin E on lipid peroxidation, membrane fatty acid composition and cytotoxicity in breast cancer xenograft and in mouse host tissue. *Cancer Cell International*, **3(3)**: 1-8.
- Cerna, M., Pastorkovea, A., Smid, J., Dobias, L. and Rossner, P. (1998). The use of YG bacterial tester strains for monitoring of drinking water mutagenicity. *Toxicology Letters*, **96**: 335-339.
- Ceylan, A. (1995). Tıbbi Bitkiler I. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:312. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi, Bornova, İzmir.
- Chai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, **74**: 2157-2184.
- Chandra, S., Chauhan, L.K.S., Murthy, R.C., Saxena, P.N., Pande, P.N. and Gupta, S.K. (2005). Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, **347**: 46-52.
- Chaney, R.L., Hunderman, P.T., Palmer, W.T., Small, R.J., White, M.C. and Decker, A.M. (1978). Plant Accumulation of Heavy Metals and Phytotoxicity Resulting from Utilization of Sewage Sludge and Sludge Compost on Cropland. P. 86-97. In: proc. Natl. Conf. Composting Municipal residues and Sludges, Silver Spring, MC. August 1977. Information Transfer, Rockville, MD.
- Chaney, R.L. (1995). Metal-Scavenging Plants to Cleanse The Soil.
<http://www.soils.wisc.edu/~barak/soilscience326/agres.htm>
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. and Baker, A.J. (1997). Phytoremediation of Metals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**: 279-284.
- Chauhan, L.K.S., Saxena, P.N. and Gupta, S.K. (1999). Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environmental and Experimental Botany*, **42**: 181-189.
- Chen, C., Huang, D. and Liu, J. (2009). Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean - Soil, Air, Water*, **37**: 304-313.
- Chen, Z.S., Lin H.T. and Hseu Z.Y. (2001). Transfer of cadmium into the food chain from aquatic and agricultural ecosystems. In: Syers, J.K., Gochfeld, M. (Eds.),

- Environmental Cadmium in Food Chain: Sources, Pathways and Risks. Belgian Academy of Science, Brussels, Belgium, 110-115.
- Chiang, T.A., Wu, P.F., Wang, L.F., Lee, H., Lee, C.H. and KO, Y.C. (1997). Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbon content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Mutation Research*, **381(2)**: 157-161.
- Chuang, S.E., Cheng, A.L, Lin, J.K. and Kuo, M.L. (2000). Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. . *Food and Chemical Toxicology*, **38(11)**: 991-995.
- Cimanga, R.K., Kambu, K., Tona, L., Hermans, N., Apers, S., Tott'e, J., Pieters, L. and Vlietinck, A.J. (2006). Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, **107(1)**: 83-90.
- Constantine, M.J. and Owens, E.T. (1982). Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays, A report of the US Environmental Protection Agency Genotox Program. *Mutation Research*, **99**: 1-12.
- Cordell, G.A. (1995). Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, **40**: 1585-1612.
- Cosentino, M., Bombelli, R., Carcano, E., Luini, A., Marino, F., Crema, F., Dajas, F. and Lecchini, S. (2008). Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: A study on human leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**: 501-507.
- Cotelle, S., Masfaraud, J.F. and Ferard, J.F. (1999). Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research*, **426**: 167-171.
- Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, **77(1)**: 7-24.
- Cullen, J. (1965). Hesperis, Notes R.B.G. Edinburgh, **26**: 192.
- Çelik, E. ve Çelik, G.Y. (2007). Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **5**: 1-6.

- Çubukçu, B., Meriçli, A.H., Mat, A., Sarıyar, G., Sütlüpnar, N. ve Meriçli, F. (2002). Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı. İstanbul Üniv. Yayın no 4311, Eczacılık Fak. Yayın no 79.
- Dahmani-Muller, H., Oort, F., Gelie, B. and Blabene, M. (2000). Strategies of heavy metal uptake by three plants species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*, **109**: 231-238.
- Darlington, C.D. and McLesih, L. (1951). Action of maleic hydrazide on the cell. *Nature*, **167**: 407-408.
- Davies, S. and Stewart, A. (1995). *Nutritional Medicine*, 84-86.
- Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K. (eds), (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands (supplement). Edinburgh, **10**: 50–54.
- Davis, P.H. (1965). Flora of Turkey and East Aegean Islands. Edinburg Univ., Edinburg, **1**: 362-409
- Davis, S.C. and Perez, R. (2009). Cosmeceuticals and natural products: wound healing. *Clinics in Dermatology*, **27**: 502-506.
- De Serres, F.J. and Ashby, J. (1981). Evaluation of short-term tests for carcinogens. Elsevier Science Publishers (Progress in *Mutation Research*, 1), Amsterdam, Oxford, New York.
- Desesso, J.M., Lavin, A.L., Hsia, S.M. and Mavis, R.D. (2000). Assesment of the corcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide. *Food and Chemical Toxicology*, **38**: 1021-1041.
- Dığrak, M., İlçim, A. ve Alma, M.H. (1999). Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. *Phytotherapy Research*, **13**: 584-587.
- Dimitrow, B. (1994). Types of chromosomal aberrations induced by seed aging in *Crepis capillaris* L.. *Enviromental and Moleculer Mutagenesis*, **37**: 199-209.
- Dryanosvka, O.A. (1987). Mutagenic of the herbicide alachor during meisos in *Tradescantia paludosa*. *Acad. Blug. Science*, **40**: 73-76.
- Dudley T.R. (1964). Studies in Alyssum: Eastern representatives and their allies. *Journal Arnold Arbor*, **45**(1).
- Duffus, J.H. and Worth, H.G.J. (1996). Fundamental toxicology for chemists. Cambridge, UK: *Royal Society of Chemistry Information Services*.

- Durusoy, M. and Kambur, S. (2003). The application of the UMU test system for screening mutagenicity of surface water. *Turkish Journal of Biochemistry*, **28(1)**: 3-7.
- Edenharder, R. and Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research*, **540**: 1-18.
- El-Ghamery, A.A., El-Kholy, M.A. and El-Yousser, A. (2003). Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L.. *Mutation Research*, **537**: 29-41.
- 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.
- El-Shabbaby, O.A., *et al.* (2003). Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan Journal Biology Science*, **6**: 23-28.
- EPA (Environmental Protection Agency), (2000). Introduction to Phytoremediation, EPA/600/R-99/107, National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio 45268, USA.
- Erdoğan, O. (2005). Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Fidelerinde Nikel Toksikitesinin Humik Asit İle Azaltılması Üzerine Bir Araştırma Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.
- Eren, Y. (2011). Bazı *Limonium* Türlerine Ait Bitki Ekstrelerinin Mutajenik Etkilerinin Farklı Test Sistemleri ile Belirlenmesi. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Evandri, M.G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P. and Mazzanti, G. (2005). The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. Department of Human Physiology and Pharmacology, University La Sapienza, P.le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy,

Department of Human Physiology and Pharmacology, Medical School, University of Bari, Policlinico, Bari, Italy.

- 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. *Journal of Environmental Radioactivity*, **68**: 235-248.
- Fahey, J.W., Zhang, Y. and Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Science*, **94**: 10366-10372.
- Farnsworth, N.R. (1990). The role of the ethnopharmacology in drug development. In *Bioactive Compounds from Plants*. CIBA Foundation Symposium. Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore.
- Fatima, R.A. and Ahmad, M. (2005). Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment*, **346**: 256-273.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, S.S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, **11(1)**: 52-67.
- Feil, R. and Metzger, D. (2007). Conditional mutagenesis: an approach to disease models. *Springer*, **178**: 500, Heidelberg, Germany.
- Fender, H. and Wolf, G. (1998). Cytogenetic investigations in employees from waste disposal sites. *Toxicology Letters*, **96**: 149-154.
- 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.
- Fiskeşjo, G. (1983). Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. *Physiologica plantarum*, **59**: 508-511.
- Fiskeşjo, G. (1997). *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytologic parameters. In: Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Eds.), *Plants for Environmental Studies*. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, New York, 308-333.
- Fiskeşjö, G. (1981). *Allium* test on copper in drinking water. *Vatten*, **17(3)**: 232-240.
- Fiskeşjö, G. (1985). The *Allium* as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, **102**: 99-102.

- Fiskesjö, G. (1993). A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality*, **8**: 461-470.
- Fiskesjö, G. (1995). *Allium* test. Methods in molecular biology. In vitro toxicity testing protocols, **43**: 119-127.
- Fратиани, F., Luccia, A.D., Coppola, R. and Nazzaro, F. (2007). Mutagenic and antimutagenic properties of aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated *Tuber aestivum* black truffle: A preliminary study. *Food Chemistry*, **102**: 471-474.
- Friedberg, E.E., Walker, G.C. and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, USA.
- Fuskoni, 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. *Environmental Experimental Botany*, **58**: 253-260.
- Gabrielli, R., Pandolfini, T. and Vergnano, G. (1990). Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant Soil*, **122**: 271-277.
- 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.
- Galati, G. and O'Brien, J.P. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, **37(3)**: 287-303.
- Gatehouse, D.G, Rowland, I.R., Wilcox, P., Callander, R.D. and Foster, R. (1990). Bacterial mutation assay, Basic Mutagenicity Ukems recommended procedures (Ed: Kirkland, D.J.), The Bath Press, Avon, Great Britain, UK.
- Gentile, M.J., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, J.G. and Ferguson, L.R. (1998). Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutation Research*, **402**: 289-298.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzman-Rincon, J. and Wurgler, F.E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, **402**: 203-209.

- Graham, S. (1983). Results of case-control studies of diet and cancer in buffalo. *Cancer Research New York. Supplement*, **43**: 2409.
- Graham, S., Dayal, H., Swanson, M., Mittelman, A. and Wilkinson, G. (1978). Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Journal of National Cancer Institute*, **61**: 709-12.
- Grant, V. (1981) Plant Speciation. Columbia University Press, New York.
- Grant, W.F. (1978). Chromosome Aberrations in plants as a monitoring system. *Environmental Health Perspectives*, **27**: 37-43.
- Grant, W.F. (1982). Chromosome aberration assays in *Allium*. *Mutat Res.*, **99**: 273-291.
- Grant, W.F. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research*, **310**: 175-185.
- Grimsrud, T. and Andersen, A. (2010). Evidence of carcinogenicity in humans of water-soluble nickel salts. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, **5**: 1-7.
- Grover, I.S. and Kaur, S. (1999). Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium cepa* root aberration and micronucleus assays. *Mutation Research*, **426**: 183-188.
- Guarrera, P.M. (2005). Traditional phytotherapy in central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia*, **76**: 1-25.
- Gulluce, M., Agar, G., Baris, O., Karadayi, M., Orhan, F. ve Şahin, F. (2010). Mutagenic and antimutagenic effects of hexane extract of some *Astragalus* species grown in the eastern anatolia region of Turkey. *Phytotherapy Research*, **24**: 1014-1018.
- Haack, T., Erdinger, L. and Boche, G. (2001). Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 of nitro and respective hydroxylamine compounds. *Mutation Research*, **491**: 183-193.
- Haghiri, F. (1973). Cadmium uptake by plants. *Journal of Environmental Quality*, **1**: 93-96
- Haider, S., Naithani, V., Barthwal, J. and Kakkar, P. (2004), Heavy metal content in some therapeutically important medicinal plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **72**: 119-127.

- Ham, S., Kim, S.H., Moon, S.Y., Chung, M.J., Cui, C.B., Han, E.K., Chung, C.K. and Choe, M. (2009). Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) Extract. Department of Food Science and Biotechnology, School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea.
- Hamasaki, T., Sato, T., Nagase, H. and Kito, H. (1992). The genotoxicity of organotin compounds in SOS Chromotest and rech-assay. *Mutation Research*, **280**: 195-203.
- Hanna, W.J. and Grant, C.L. (1962). Spectrochemical Analysis of the Foliage of Certain Trees and Ornamentals for 23 Elements. *Bull Torrey Bot Club*, **89**: 293-302.
- Harrison, S. (1999). Local and regional diversity in a patchy lanscape: Native, alien, and endemic herbs on serpentine. *Ecology*, **80**: 70-80.
- Hartman, P.E. and Shankel, D.M. (1990). Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environmental Molecular Mutagenesis*, **15**: 145-182.
- Hasani-Ranjbar, S., Nayebi, N., Larijani, B. and Abdollahi, M. (2009). A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World Journal of Gastroenterology*, **15(25)**: 3073-3085.
- Hass, B.S., Heflich, R.H., Shaddock, J.G. and Casciana, D.A. (1986). Comparison of mutagenicities in a *Salmonella* reversion assay meidated by uninduced hepatocytes and hepaticytes from rats pretreated for 1 or 5 days With Aroclor 1254, *Environmental Mutagenesis*, **7**: 391-403.
- Hayashi, M., Tice, R.R., Mac Gregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Volders, M.K., Oleson, F.B., Pachierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutov, S. and Vannier, B. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, **312**: 293-304.
- Hayder, N., Skandrani, I., Kilani, S., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Ben Ammar, R., Mahmoud, A., Ghedira, K. and Ghedira, L. (2007). Unité de Pharmacognosie/Biologie Moléculaire 99/UR/07-03. Faculté de Pharmacie de Monastir, Rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisia Laboratoire de Biologie

Moléculaire et Cellulaire, Faculté de Médecine Dentaire de Monastir, Rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisia.

- Hect S.S. (1995). Chemoprevention by isothiocyanates. *Journal Cell. Biochemistry*, **22(1)**: 195-209.
- Hidalgo, A., Gonzales, J.A., Navas, P. and Garcia-Herdugo, G. (1989). Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by probham and chlorprobham. *Cytobios*, **57**: 7-17.
- Hoareau, L. and DaSilva, E.J. (1999). Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology*, **2(2)**: 56-70.
- Hoffman, G. R. (1991). Casaret and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons, Pergamon Pres, New York, 201-217.
- Hosbina, M.M. (2002). Evaluation of a possible contamination of the waters of the Claro River-Municipality of Rio Claro, part of the Corumbatai River Basin, with the munagenecity tests using *Allium cepa*. State University Of Sao Paulo, Rio Claro, Sp. (In Portuguese).
- Huang, L. E., Zhang, H., Bae, S. W. and Liu, A. Y. C. (1994). Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response: Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transduction pathway. *Journal Biological Chemistry*, **269**: 30718-30725.
- Iarc, L. (1980). Monographs on the carcinogenic risks of chemicals to humans. supp. 2. Long Term Screening Assays For Carcinogens. A Critical Appraisal, IARC.
- Ingle, R.A., Mugford, S.T., Rees, J.D., Campbell, M.M. and Smith, J.A. (2005). Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *The Plant Cell*, **17**: 2089-2106.
- İnceer, H. ve Beyazoğlu, O., (2000). Bakır klorürün *Vicia hirsuta* (L.) S.F. gray kök ucu hücreleri üzerine sitogenetik etkileri. *Turkish Journal Biological*, **24**: 553-559.
- Jang, S., Kelley, K.W. and Johnson, R.W., (2008). Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **105(21)**: 7534-7539.

- Jorgensen, K.V., Clayton, J.W. and Price, R.L. (1987). Evaluation of aflotoxin B mutagenesis: Glutathione-S-transferase to the *Salmonella* mutagenicity assay. *Environmental Mutagen*, **9**: 411-419.
- Josephy, P.D., Gruz, P. and Nohmi, T. (1997). Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutation Research*, **386**: 1-23.
- Kabarity, A., El-Bayoumi, A.S. and Habib, A.A. (1974). Effect of morphine sulphate on mitosis of *Allium cepa* root tips. *Biologia Plantarum*, **16**: 275-282.
- Kaçar, B. ve Katkat, V. (2006). Bitki Besleme. Nobel Yayınları, Ankara.
- Kalaycıoğlu, A. ve Öner, C. (1994). Bazı bitki ekstraktlarının antimutajenik etkilerinin Ames/*Salmonella* test sistemi ile araştırılması. *Turkish Botany*, **18**: 117-122.
- Kaltsikes, P.J. (1984). Breeding vegetable varieties resistant to diseases. Proc. 3rd Meeting on Protected Vegetables and Flowers, May 9-11, Heraklion, Crete, p.60. (Abstract).
- Karaker, V., Joshi, S. and Shinde, S.L. (2000). Antimutagenic profile of three antioksidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, **468**: 183-194.
- Karthikeyan, K. and Singh, K. (2002). Bioremediation of polluted soils an overview. 17th WCSS. 14-21 August. Thailand.
- Kaur, S., Arora, S., Kaur, K. and Kumar, S. (2002). The in vitro antimutagenic activity of Triphala an Indian herbal drug. *Food and Chemical Toxicology*, **40**: 527-534.
- Kaya, B. (2003). Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turkish Journal of Biology*, **27**: 241-246.
- Kaymak, F. (2005). Cytogenetic effects of Maleic Hydrazide on *Helianthus annuus* L.. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **8(1)**: 104-108.
- Kihlman, B.A. (1971). Root tips for studying the effects of chemicals on chromosomes. In: Hollaender, A., (Eds.), *Chemical Mutagens*, Plenum Press, New York, 489-514.
- Kim, N. M., Kim J., Chung H.Y. and Choi J. S. (2000). Isolation of Luteolin 7-*O*-rutoside and Esculetin with Potential Antioxidant Activity from the Aerial Parts of *Artemisia montana*. *Archives of Pharmacal Research*, **23(3)**: 237-239.

- Kirpnick, Z., Homiski, M., Rubitski, E., Repnevskaya, M., Howlett, N., Aubrecht, J. and Schiestl, R.H. (2005). Yeast DEL assay detects clastogens. *Mutation Research*, **582**: 116-134.
- Klanakaran S. (2006). Bioactive glucosinolates and antioxidant properties of broccoli seeds cultivated in Thailand. *Journal Science Technology*, **28(1)**: 55-61.
- 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.
- Koca, S. (2008). The cytogenetic effects of sheffer a, a liquid fertilizer and growth regulator in root tip cells of *Vicia faba* L., C.B.U. *Journal of Science*, **41**: 121-126.
- Kocaer, O.F. ve Başkaya, S.H. (2003). Metallerle kirlenmiş toprakların temizlenmesinde uygulanan teknolojiler. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, **8(1)**: 121-131.
- Koçyiğit, M. (2005). Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kong, M.S. and Ma, T.H. (1999). Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mutation Research*. **426**: 221-228.
- Konopacka, M., Widel, M. and Rzeszowska-Wolnył, J. (1998). Modifying effects of vitamin C, E and beta-carotene against gamma-ray induced DNA damage in mouse cells. *Mutation Research*, **417**: 85-94.
- Korentajar, L. (1991). A review of the agricultural use of sewage sludge. Benefits and potential hazards. *Water Sciences A.*, **17(3)**: 189-196.
- Korkmaz, B. (2005). Bazı 2-Süstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi İle Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Telyuk, P., Hohn, B. and Kovalchuk, L. (1998). The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutation Research*, **415**: 47-57.
- Kramer, U., Charnack, J. M. and Baker, A. J. M. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, **379**: 635-638.

- Kramer, U., Smith, R.D., Wenzel, W.W., Raskin, I. and Salt, D.E. (1997). The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. *Plant Physiology*, **115**: 1641-1650
- Kuete, V., Ngameni, B., Simo, C.C.F., Tankeu, R.K., Ngadjui, B.T., Meyer, J.J.M., Lall, N. and Kuate, J.R. (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **120**: 17-24.
- Kumari, M., Mukherje, A. and Chandrasekaran, N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, **407**: 5243-5246.
- Kuras, M., Nowakowska, J., Sliwinska, E., Pilarski, R., Ilasz, R., Tykarska, T., Zobel, A. and Gulewicz, K. (2006). Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, **107**: 211-221.
- Kurokawa, M., Ochiai, H., Nagasaka, K., Neki, M., Xu, H., Kadota, S., Sutardjo, S., Matsumoto, T., Namba, T. and Shiraki, K. (1993). Antiviral traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus, and measles virus in vitro and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice. *Antiviral Research*, **22**.
- Kürşat, Z. (1999). Bazı *Crambe* L: Türleri Üzerinde Morfolojik, Anatomik Ve Palinolojil Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Langille, W.M. and Maclean, K. S. (1976). Some essential nutrient elements in forest plants as related to species, plant part, season and location. *Plant Soil*. **45**: 17-26.
- Lasat, M.M. (2000). Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, **2(5)**: 1-25.
- Lerda, D. (1992). The effect of lead on *Allium cepa* L.. *Mutation Research*, **281**: 89-92.
- Lien, E.J. and Li, W.Y. (1985). Structure activity relationship analysis of anti-cancer chinese drugs and related plants. Long Beach, CA: Oriental Healing Arts Institute.
- Liu, D., Jiang, W. and Li, M. (1992). Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas*, **117**: 23-29.

- Loh, D.S.Y., Er, H.M. and Chen, Y.S. (2009). Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. *Journal of Ethnopharmacology*, **126**: 406-414.
- 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.
- Lüleyap, H.Ü. (2008). Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, 112.
- Ma, T.H., Xu, Z.D., Xu, C., Mc Connell, H., Rabago, E.V., Arreola, G.A. and Zhang, H. (1995). The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, **334**: 185-195.
- Mainardi, T., Kapoor, S. and Bielory, L. (2009). Complementary and alternative medicine: Herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, **123(2)**: 283-294.
- 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*. *Mutation Research*, **244**: 147-151.
- Marcano, L., Carruyo, I., Del Campo, A. and Montiel, X. (2004). Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L.. *Environmental Research*, **94**: 221-226.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **113(3-4)**: 173-215.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Maywald, F. and Wergel, H.J. (1997). Biochemistry and molecular biology of heavy metal accumulation in higher plants. *Landbautorsch*, volk. 47, 103, 126.
- McCann, J. and Ames, B.N. (1976). Discussion Paper: The detection of mutagenic metabolites of carcinogens in urine with the Salmonella/Microsome test. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **269**: 21-25.
- McGill, M., Pathak, S. and Hsu, T.C. (1974). Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible materyal basis chromosomes stickiness. *Chromosoma*, **47**: 157-167.

- McMahon, R.E., Cline, J.C. and Thompson, C.Z. (1979). Assay of 855 test chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. *Cancer Research*, **39**: 682-693.
- Memon, A. R., Aktopraklıgil, D., Özdemir, A. and Vertii, A. (2001). Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turk Journal Bot*, **25**: 111-121.
- Mengoni, A., Gonelli, C., Galardi, F., Gabrielli, R. and Bazzicalupo, M. (2000). Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (*Caryophyllaceae*): a random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology*, **9**: 1319-1324
- Menke, M., Chen, I., Angelis, K.J. and Schubert, I. (2001). DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutation Research*, **493**: 87-93.
- Miller, E.C. and Miller, J.A. (1976). The metabolism of chemical carcinogens to reactive electrophiles and their possible mechanism of action in carcinogenesis, in Seale, C. S., Ed:Am. Chem. Soc., Washington, 773-762.
- Mísk, M. and Micieta, K. (2002). Tradescantia Micronukleus and chromosome anelophase assays in monitoring of genotoxicity of urban soil. Department of Botany, Faculty of Natural Sciences, Comenius Universty, Bratislava, Slovakia.
- Michnovicz, J.J. and Bradlow, H.L. (1990). Induction of estradiol metabolism by dietary indole-3-carbinol in humans. *Journal Natl. Cancer Inst.*, **82**: 947-9, Abst.: 11.
- Minguzzi, C. and Vergnano, O. (1948). Il contenuto di nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii*. *Atti della Società Toscana di Scienze Naturale*, **55**: 49-74.
- Miyazawa, M. and Hisama, M. (2003). Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **67** (10): 2091-2099.
- Moraes, D.S.L. and Jordão, B.Q. (2001). Evaluation of the genotoxic potential of municipal wastewater discharged into the Paraguay river during periods of flood and drought. *Environmental Toxicology*, **16**: 113-116.
- Mortelmans, K. and Riccio, E.S. (2000). The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research*, **455**: 61-69.

- Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/ mikrosome mutagenicity assay. *Mutation Research*, **455**: 29-60.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N. and Gibbs, B.F. (2001). Remediation technologies for metalcontaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, **60**: 193-207.
- Nakamura, K., Veno, H. and Sayato, Y. (1992). Evaluation of mutagenicity of municipal river water concentrated using XAD resin column method. *Water Sciences Technology*, **25(11)**: 293-299.
- Nakasugi, T., Nakashima, M. and Komait, K. (2000). Antimutagens in gaiyou (*Artemisia argyi* Levl. Et Vant.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 3256-3266.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K. and Jena, B.S. (2003). Antioxidant ve antimutagenic activities of pomogrenate peel extracts. *Food Chemistry*, **80**: 393-397.
- Nichols, J.A. and Katiyar, S.K. (2010) Skin photoprotection by natural polyphenols: antiinflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, **302(2)**: 71-83, ISSN 0340-3696.
- Nicoloff, H. and Kappas, A. (1987). Binomial induced mitotic disturbances in *Hordeum vulgare*. *Mutation Research*, **38**: 53-70.
- Nielsen, M.H. and Rank, J. (1994). Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas*, **121**: 249-254.
- Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Van Norren, K. and Van Leeuwen, P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, **74**: 418-425.
- Nikolić, B., Stanojević, J., Mitić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević and Simić, D. (2004). Comparative study of the antimutagenic potential of Vitamin E in different *E. coli* strains. *Mutation Research*, **564**: 31-38.
- Nilan, R.A. and Vig, B.K. (1976). Plant test systems for detection of chemicals mutagens. In: Hollaender, A., (Eds.), *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection*, Plenum New York, **4**: 143-170.
- Nogueira, M.E.I., Passoni, M.H., Bisio, F.I., Longo, M.C., Cardoso, C.R.P., Santos, L.C. and Varanda, E.A. (2005). Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities

of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, Estadual Paulista University, UNESPA Rodovia Araraquara-Jau' km 1, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil.

- Ntandou, G.F.N., Banzouzi, J.T., Mbatchi, B., Elion-Itou, R.D.G., Etou-Ossibi, A.W., Ramos, S., Benoit-Vical, F., Abena, A.A. and Oumba, J.M. (2010). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. stem bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **127**: 108-111.
- Ooi, L.S.M., Wang, H., He, Z. and Ooi, V.E.C. (2006). Antiviral activities of purified compounds from *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, **106**: 187-191.
- Oturgan, M. H. (2007). Cruciferae familyasına ait bazı türlerde biyolojik aktivite çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul.
- Ow, D. W. (1996). Heavy metal tolerance genes: prospective tools for bioremediation. *Resources, Conservation Recycling*, **18**: 135-149.
- Öksüzöğlü, E., Diril, N. and Durusoy, M. (2000). Mutagenic effects of plants growth hormones with the *Salmonella*/microsome test and the SOS chromotest. *Bull. Environmental Contamination Toxicology*, **65**: 691-698.
- Özbek, T. , Güllüce, M., Şahin, F. , Sevsay, S. ve Barış, Ö. (2008). Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of *Origanum vulgare* L. *Subsp. vulgare* in the eastern anotolia region of Turkey. *Turk Journal of Biological*.
- Özbek, T. (2006). Doğu Anadolu tıbbi bitkilerine ait bazı türlerin Ames/*Salmonella* Mikrozom testi kullanılarak antimutajenik özelliklerinin saptanması. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özdemir, Z. (2003). Biogeochemical studies at the Musalı and Silifke-Anamur area in Mersin, Turkey. *Geochemistry International*, **41**: 9, 1-6
- Özdemir, Z., Zorlu, S. ve Eryılmaz. F.Y. (2003). Toprakta metal kirliliğinin saptanmasında indikatör bitkilerin kullanılması, Mersin Üniversitesi Jeoloji 10. yıl sempozyumu Mersin, Bildiri özleri kitabı, 89

- Özdemir, Z. (2005). *Pinus brutia* as a biogeochemical medium to detect iron and zinc in soil analysis, cromite deposits of the area Mersin, Turkey. *Geochemistry*, **65**: 79-88.
- 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 fensulfotion. *Cytobios*, **42**: 147-155.
- Panda, B.B. and Sahu, U.K. (2002). Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfothion. *Cytobios*, **42**: 147-155.
- Panda, B.B., Subhadra, A.V. and Panda, K.K. (1995). Prophylaxis of antioxidant against the genotoxicity of methyl mercuric chloride and maleic hydrazide in *Allium micronucleus* assay. *Mutation Research.*, **343**: 75-84.
- Pastori, M., Pfander, H., Boscoboinik, D. and Azzi, A. (1998). Lycopene in association with alpha-tocopherol inhibits at physiological concentrations proliferation of prostate carcinoma cells. *Biochemistry Biophysics Research Community*, **250**: 582-585.
- Patra, J., Sahoo, M.K. and Panda, B.B. (2003). Persistence and prevention of aluminium-and paraquat-induced adaptive response to methyl mercuric chloride in plant cells in vivo. *Mutation Research*, **538**: 56-61.
- Patra, J., Sahoo, M.K. and Panda, B.B. (2005). Salicylic acid triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in root meristem cells of *Allium cepa*. *Mutation Research*, **581**: 173-180.
- Patra, M. and Sharma, A. (2002). Relative efficacy of *Allium cepa* and *Allium sativum* in anaphase-telophase test screening metal genotoxicity. *Biologia.*, **57**: 409-414.
- Pavlica, P., Besendorfer, V., Rosa, J. and Papes, D. (2000). The cytotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak (*Quercus robur* L.) and shallot (*Allium cepa* var. ascalonicum). *Chemosphere*, **41**: 1519-1527.
- Pereira, A.D., Andrade, S.F., Swerts, M.S.O. and Maistro, E.L. (2008). First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chemistry Toxicology*, **46(7)**: 2580-4.

- Petek, M. (1999). İstanbul Boğazındaki Toplam Kirliliğin Canlılardaki Mutajenik Etkilerinin, *Salmonella*/Mikrozom Test Sistemi İle Araştırılması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, İstanbul.
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D. and Sporn, M.B. (1981). Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, **290**: 201-208.
- Pirker, K.F., Stolze, K., Reichenauer, T.G., Nohl, H. and Goodman, B.A. (2006). Are the biological properties of kaempferol determined by its oxidation products? *Free Radical Research*, **40(5)**: 513-521.
- Prasad, M.N.V. (2005). Toxic metals in plants; Nickelophilous plants and their significance in phytotechnologies. *Brazilia Journal Plant Physiology*, **17**: 1
- Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A. and Westwood, F.R. (1978). An evaluation of six short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *British Journal of Cancer*, **37**: 873-959.
- Qu, Y.H., Xu, G.X., Zhou, J.Z., Chen, T.D., Zhu, L.F., Shields, P.G., Wang, H.W. and GAO, Y.T. (1992). Genotoxicity of Heated Cooking Oil Vapors. *Mutation Research*, **298(2)**: 105-111.
- Rahimuddin, S. A., Khoja, S.M., Zuhair, M.M., Howell, N.K. and Brownb, J.E. (2007). Inhibition of lipid peroxidation in UVA-treated skin fibroblasts by luteolin and its glucosides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**: 647-655.
- Ramanathan, K., Anusuyadevi, M., Shimila, S. and Pannerseelvam, C. (2005). Ascorbic acid and α -tokoferol as potent modulators apoptozis on arsenic inducedtoxicity in rats. *Toxicology Letters*, **156**: 297-306.
- Rank, J. (2003). The method of *Allium* anaphase-telophase chromosomme aberration assay, *Ekologija(Vilnius)*, 1, ISSN 0235-7224.
- Rank, J., Lopez, L.C., Nielsen, M.H. and Moretton, J. (2002). Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEPH in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas*, **136**: 13-18.
- Rank, J. and Nielsen, M.H. (1998). Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research*, **418**: 113-119.

- Raskin, I., Smith, R.D. and Salt, D.E. (1997). Phytoremediation of Metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opin. Biotechnology*, **8**: 221-226.
- Raucher, R., Edenharder, R. and Platt, K.L. (1998). In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutation Research*, **413**: 129-142.
- Reeves, R.D., Kruckeberg, A.R., Adıgüzel, N. and Kramer, U. (1997). Studies on the flora of serpentine and other metaliferous areas of western Turkey. *South African Journal of Science*, 513-517.
- Reeves, R.D. and Adıgüzel, N. (2004). Rare plants and nickel accumulators from Turkish serpentine soils, with special reference to centaurea species. *Turkish Journal of Botany*, **28(1/2)**: 147-153.
- Reeves, R.D. and Adıgüzel, N. (2008). The nickel hyperaccumulating plants of the serpentines of Turkey and adjacent areas: a review with new data. *Turk Journal Biology*, **32**: 143-153.
- Reeves, R.D. and Baker, A.J.M. (2000). Metal Accumulating Plants. In: Raskin, I., Ensley, B.D., (Eds), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*, John Wiley and Sons, New York, 193-230.
- Reeves, R.D., Kruckeberg, A.R., Adıgüzel, N. and Kramer, U. (2001). Studies on the flora serpentine and other metalliferous areas of western Turkey. *South African Journal of Science*, **97(11/12)**: 513-517.
- Riby, J.E., Feng, C., Chang, Y.C., Schaldach, C.M., Firestone, G.L. and Bjeldanes, L.F. (2000). The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. *Biochemistry*, **39**: 910-8, Abst.:5.
- Rieger, R., Michaelis, A. and Takehisa, S. (1990). On adaptive responses in plant meristems cells in vivo: Protection against induction of chromatid aberration. In: Obe, G., Natarajan, A.T., (Eds.), *Chromosomal Aberrations: Basic and Applied Aspects*, Springer-Verlag, Berlin, 163-179.
- Robinson, B.H. (1997). The phytoextraction of heavy metals from metalliferous soils. 145.

- Rosin, M.P. and Stich, H.F. (1979). Assesment of the use of the *Salmonella* mutagenesis assay to determine the influence of antioksidants on carcinogen-induced mutagenesis. *International Journal Cancer*, **23**: 722-727.
- Rosin, M.P. and Stich, H.F. (1978). The inhibitory effect of cysteine on the mutagenic activities of several carcinogens. *Mutation Research*, **54**: 73-81.
- Rovado, T., Vicentini, V.E.P. and Mantovani, M.S. (2004). Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, **18(5)**: 617-22.
- Russell, P.J. (1998). Genetics, the benjamin, cummings, publishing company, Inc., Canada, USA.
- Saad, B., Dakwar, S., Said, O., Abu-Hijleh, G., Al Battah, F., Kmeel, A. and Aziازه, H. (2006). Evaluation of medicinal plant hepatotoxicity in co-cultures of hepatocytes and monocytes. *eCAM.*, **3**: 93-98.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I. and Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, **13**: 468-475.
- Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H. and Danno, G. (1995). Luteolin: a strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-P-2, in peppermint, sage, and thyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 410-414.
- Sarkar, F.H. and Li, Y. (2004). Indole-3-carbinol and prostate cancer. *Journal Nutrition*, **134**: 3493-3498.
- Saxena, P.N., Chauhan, L.K.S. and Gupta, S.K. (2005). Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology*, **216**: 244-252.
- Schmidt, J.P. (1997). Understanding phytotoxicity thresold for trace elements in land applied sewage sludge. *Journal Environmental Qual*, **26**: 4-10.
- Scolastici, C., Lima, R.O.A., Barbisan, L.F., Ferreira, A.L.A., Ribeiro, D.A. and Salvadori, D.M.F. (2008). Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicology in Vitro*, **22**: 510-514.
- Scolnic, D. and Halazonetis, T. (2000). Chfr defines a nitotic stress checkpoint that delays entry inti metaphase. *Nature*. **406**: 430-435.

- Sequeira, E.M.D. and Pinto da Silva, A.R. (1991). The ecology of serpentinised areas of Northeast Portugal. In: Roberts, B.A., Proctor, J., (Eds), *The Ecology Of Areas With Serpentinised Rocks A World Review*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., 169-197.
- Shamberger, J.R., Cynthia, L., Beaman, K.D. and Kasten, B.L. (1979). Antioksidants reduce the mutagenic effect of Malonaldehyde and β -propiolactone. *Mutation Research*, **66**: 349-355.
- Sharma, C.B.S.R. (1983). Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. *Current Science*, **52**: 1000-1002.
- Shaw, B.P., Sahu, S.K. and Mishra, R.K. (2004). Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Prasad, M.N.V., (Eds.), *Heavy Metal Stres in Plants-from Biomolecules to Ecosystem*, Springer, India, 84-126.
- Silva, D.I., Gaspar, J., Gomes da Costa, G., Rodrigues, A.S., Laires, A. and Rueff, J. (2000). Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. *Chemigo-Biological Interaction*, **124**: 29-51.
- Silva, F.A.M., Borges, F., Guimaraes, C., Lima Jose.L.F.C., Matos, C. and Reis, S. (2000). Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radikal scavenginig activity, and physiocemical parameters. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **48**: 2122-2126.
- Simaan, J.A. (2009). Herbal medicine, what physicians need to know. *Lebanese Medical Journal*, **57**: 215-217.
- Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M. and Toman, M.J. (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*, **368**: 171-179.
- Snijman, P.W., Swanevelder, S., Joubert, E., Green, I.R. and Gelderblom, W.C.A. (2007). The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutation Research*, **631**: 111-123.
- Soliman, M.I. (2001). Genotoxicity testing of neem plant (*Azadirachta indica* A. Juss.) using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Journal of Biological Sciences*, **1**: 1021-1027.

- Sotto, A.D., Vitalonea, A., Nicoletti, M., Piccinb, A. and Mazzanti, G. (2010). Pharmacological and phytochemical study on a *Sisymbrium officinale* Scop. extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **127**: 731-736.
- Sram, R.J., Rossner, P., Peltonen, K., Podrazilova, K., Mrackova, G., Demopoulos, N.A., Stephanou, G., Vlachodi Mitropoulos, D., Darroudi., F. and Tates, A.D. (1998). Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameter in 1, 3- butadiene-exposed workers. *Mutation Research*, **419**: 145-154.
- Srivastava, J.K. and Gupta, S. (2007). Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 9470-9478.
- Staub, R.E., Feng, C., Onisko, C., Bailey, G.S., Firestone, G.L. and Bjeldanes, L.F. (2002). Fate of indole-3-carbinol incultured human breast tumor cell. *Chemistry Research Toxicology*, **15**: 101-109.
- Stoewsand, G.S. (1995). Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables. *Food Chemistry Toxicology*, **33**: 537-543.
- Stoewsand, G.S., Babish, J.B. and Wimbrelly, H.C. (1978). Inhibition of hepatic toxicities from polybrominated biphenyls and aflatoxin B1 rats feed cauliflower. *Jm. Enviromental Pathology and Toxicology*, **2**: 395-404.
- Surralles, J., Falck, G. and Norppa, H. (1998). In vivo cytogenetic damage revealed by fish analysis of cadmium in go and S phase of their cell cycles. *Mutation Research*, **412**: 109-114.
- Susan, J.D., Ross, M. and Collins, A.R. (1995). The influence of smoking and diet on the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt) mutant frequency in circulating T lymphocytes from a normal human population. *Mutation Research*, **331**: 55-64.
- Tamer, L. (1992). *Brassica oleracea* var. *capitata* Ekstresinin Antitümöral Etkisinin Araştırılması ve Adenozin 5'Trifosfaz Enzim Sistemi Üzerine Olan Etkisi. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Adana.
- Tang, S.Y. and Halliwell, B. (2010). Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **394**: 1-5.

- Taylor, R.S.L., Manandhar, N.P., Hudson, J.B. and Towers, G.H.N. (1996). Antiviral activities of nepalese medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology*, **52**: 157-163.
- Teixeira, R.O., Camparoto, M.L., Mantovani, M.S. and Vicentini V.E.P. (2003). Assessment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. *Gen. Molecular Biology*, **26**: 551-555.
- The Merck Index, (1983). 10th ed. Rahway, New Jersey, Merck Co., Inc., 932.
- Topaktaş, M. and Speid, G. (1990). Sister chromatid exchange (SCE) testinin mutajenite ve kan serojenitenin belirlenmesinde kullanılması, *Çukurova Üniversitesi Sağlık Bil. Der.*, **5**: 73-84.
- Trosko, J.E. (1997). Challenge to the simple paradigm that carcinogens are mutagens and to the *in vitro* and *in vivo* assay used to test the paradigm. *Mutation Research*, **373**: 245-249.
- Tshikalange, T.E., Meyer, J.M.M. and Hussein, A.A. (2005). Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, **96**: 515-519.
- Tsukagoshi, S. and Ophashi, F. (1974). Protein- bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against Mouse sarcoma- 180 and rat ascites hepatoma Ah-13 by oral use. *Gann*, **65(6)**: 557-558, 563.
- Uda, Y., Matsuoka, H., Shima, H., Kumagami, H. and Maed, Y. (1993). Antimicrobial activity of water-soluble products derived from radish mustard oil and identification of an active component Therein. *Nip. Shok. Kogyo. Gak.*, **40**: 801-806.
- Uysal, Y. (2004). Sulu Ortamda Pb (II) ve Cd (II) İyonlarının *Lemna minor* L. İle Alımının Araştırılması. Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 145, Mersin (Yayınlanmamış).
- Victorin, K., Busk, L. and Ahlborg, U.G. (1987). Retinol (Vitamin A) inhibits the mutagenicity of o-aminoazotoluene activated by liver microsomes from several species in the Ames test. *Mutation Research*, **179**: 41-48.
- Vonderbank, H. (1949). Ergebnisse der chemotherapie der tuberculose. *Pharmazie*, **4**: 198-207.
- Vrijnsen, R., Michotte, Y. and Boeye, A. (1990). Metabolic activation of quercetin mutagenicity. *Mutation Research*, **232**: 243-248.

- Vural, N. (1984). *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Ecz. Fak. Yayınları, 56, Ankara, 32-81.
- Wallace, R.J. (2004). Symposium on Plants as animal foods: a case of catch 22?. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, **63**: 621-629.
- Watanabe, T., Kasai, T., Arima, M., Okumura, K., Kawabe, N. and Hirayama, T. (1996). Genotoxicity in vivo of phenazine and aminophenazines assayed in the wing spot test and the DNA-repair test with *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **369**: 75-80.
- Wattenberg, L.W. and Loub, W.D. (1978). Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Research* **38**: 1410-1414.
- Webster, P.L. and Macleod, R.D. (1996). The root apical meristem and its margin, In: Waishel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U., (Eds), Plant roots. The hidden half (Second Ed.), Marcel Dekker, New York, 51-76.
- Wenzel, U., Nickel, A., Kuntz, S. and Daniel, H. (2004). Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis*, **25**: 703-712.
- 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).
- Yıldırım, Ş. (2001). The chorology of the Turkish species of *Brassicaceae*, *Buddlejaceae* and *Buxaceae* families. *The Herb Journal of Systematic Botany*, **8**(1): 141-171.
- Yi, H. and Meng, Z. (2003). Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutation Research*, **537**: 109-1124.
- Yıldız, M., Arıkan, E.S. ve Terzi, H. (2006). Farklı Kimyasal Maddelerin Etkili Konsantrasyonlarının *Allium Kök İnhibisyon Testi* ile Belirlenmesi. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran, Kuşadası/Aydın.

- Yüzbaşıoğlu, D. (2001). Illoxan ve Racer herbisitlerinin *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitoz bölünmeye ve kromozomlara etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Zengin, K.F. ve Munzuroğlu, Ö. (2005). Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.Strike) Klorofil ve Karotenoid Miktarı Üzerine Bazı Ağır Metallerin (Ni^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Zn^{+2}) Etkileri. *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **17(1)**: 164-172.
- Zhang, T. and Chen, D. (2008). Anticomplementary principles of a Chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS. *Journal of Ethnopharmacology*, **117**: 351-361.
- Zhang, L.X., Cooney, R.V. and Bertran, J.S. (1991). Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid pperoxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*, **12**: 2109-2114.
- Zhuleva, L.Y. and Dubinin, N.P. (1994). Use of the micronucleus test for ecological monitoring in astrachan oblast. *Genetica*, **30(7)**: 999-1004.

İNTERNET KAYNAKLARI

1. http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/curciferea_familyasi.pdf 28.09.2012
2. Vanlı, Ö. ve Yazgan, M., “Ağır Metallerle Kirlenmiş Toprakların Temizlenmesinde Fitoremediasyon Tekniği”, Erişim: www.tarimsal.com/fitoremediasyon/fitoremediasyon.htm 07.09.2012

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İmren ÇALIK
Doğum Yeri ve Tarihi : ESKİŞEHİR 11.07.1986
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 05427860984 / imren3225@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Eskişehir Atatürk Lisesi / 2001-2004
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi / 2007-2011
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi / 2011-2013