

116524

**KARVAKROL'ÜN
MUTAJENİK VE ANTİMUTAJENİK
AKTİVİTESİNİN
AMES VE SCE YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

**Evrin iPEK
Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Kasım- 2003**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Evrım İPEK' in Karvakrol' ün Mutajenik ve Antimutajenik Aktivitesinin Ames ve SCE Yöntemleri İle Araştırılması başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 12.11.2003 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Yard.Doç.Dr.Hülya SIVAS	
Üye	:Yard.Doç.Dr.Berrin TÜYLÜ	
Üye	:Yard.Doç.Dr.Mediha CANBEK	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
19.11.2003.....tarih ve ...38/1.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof./Dr. Örfan ÖZER
Fen Bilimleri Enstitüsü
M ü d ü r ü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**KARVAKROLÜN MUTAJENİK VE
ANTİMUTAJENİK AKTİVİTESİNİN AMES VE
SCE YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

EVİRİM İPEK

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Hülya SİVAS

2003, 63 sayfa

Bu çalışmada, bir kekik türü olan *Origanum onites* L. den izole edilmiş, antimikrobiyal ve antitümör aktiviteleri bulunan karvakrolün mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri Ames/Salmonella/Mikrozom ve SCE (Kardeş Kromatid Değişimi) yöntemleriyle araştırılmıştır.

İlk olarak, mutajenik aktivite için Ames testinde, *Salmonella typhimurium*' un TA98 ve TA100 suşları, plak inkorporasyon yöntemi ile metabolik aktivitenin S9 mikrozomal fraksiyon varlığında ve yokluğunda karvakrol ile muamele edilmiştir. Antimutajenik etkinin araştırılması, aynı işlemlerin pozitif mutajen olarak 4-Nitro-o-Fenilendiamin (-S9) ve 2-Aminofloren (+S9) varlığında tekrar edilmesi ile yapılmıştır. Her iki deneyin sonuçları, karvakrolün *S. typhimurium* için mutajenik bir etkiye sahip olmadığı, ama önemli derecede pozitif mutajenlerin etkisini engelleyerek antimutajenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, karvakrol ile muamele edilmiş, insan periferel kanından izole edilen lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi incelenmiştir. Kromozomları 5-bromo-2-deoksüridin ile işaretlenmiş lenfositler, karvakrolle inkübe edildikten sonra FGP (Fluorescence Plus Giemsa) yöntemi ile boyanmış ve kromozomlar SCE frekansını hesaplamak için ışık mikroskopunda incelenmiştir. Karvakrolün olası antimutajenik etkisi aynı yöntemde, mitomisin C' nin oluşturduğu etkiye karşı araştırılmıştır. SCE deneylerinin sonuçları karvakrolün mutajenik etki göstermediğini ama önemli derecede doza bağlı antimutajenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Elde edilen bütün sonuçlar kekik bitkisinin ana bileşenlerinden biri olan karvakrolün in vitro koşullarda önemli derecede antimutajenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu açıdan karvakrolün kanser gibi genetik hastalıkları önlemede farmakolojik bir öneme sahip olabileceğini ileri sürebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Ames test, Mutajenite, Antimutajenite, Karvakrol, SCE, Lenfosit Kültür

ABSTRACT**Master of Science Thesis****SEARCHING CARVACROL'S MUTAGENIC AND ANMUTAGENIC
ACTIVITY WITH AMES AND SCE****EVRİM İPEK****Anadolu University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Biology Program****Supervisor: Yard.Doç.Dr.Hülya SİVAS****2003, 63 pages**

In this study, mutagenic and antimutagenic activities of carvacrol which were isolated from *Origanum Onites L.*, possessing antimicrobial and antitumor activities were investigated through Ames/Salmonella/Microsome and SCE (Sister Chromatid Exchange) methods.

Firstly, TA98 and TA100 strains of *Salmonella typhimurium* were investigated for the mutagenic activity of carvacrol by the plaque incorporation method in the presence or absence of metabolic activity (S9 microsomal fraction) in Ames test. Investigation of the antimutagenic activity was carried out repeating the same assay in presence of 4-Nitro-o-Phenylendiamine (-S9) and 2-Aminofloren (+S9) as positive mutagens. The results of both investigations revealed that carvacrol does not have any mutagenic effect on *S. Typhimurium* but it has an antimutagenic activity by significantly preventing the effect of positive mutagens.

In the second step of study, SCE assay was performed in lymphocytes isolated human peripheral blood after incubating with carvacrol. The lymphocytes, of which chromosomes were marked with 5-bromo-2-deoxyuridine, were stained under FGP (Fluorescence Plus Giemsa) method after incubation with carvacrol and the chromosomes were analyzed under a light microscope in order to calculate SCE frequency. The possible antimutagenic effect of carvacrol was also investigated under the same method against the effect of mitomycin C. The results of SCE tests reveal that carvacrol does not have any mutagenic effect but has a significantly antimutagenic effect as a dose dependent manner.

All of the attained results show that carvacrol which is one of the main constituents of *origanum* has a significantly antimutagenic effect under *in vitro* conditions. Therefore we claim that carvacrol might have a pharmacological importance in preventing genetic diseases such as cancer.

Keywords: Ames test, Mutagenicity, Antimutagenicity, Carvacrol, SCE,
Lymphocytes culture

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren, kaynak temininde yardımlarını esirgemeyen, deneyler esnasında tüm ihtiyaçlarımı karşılayan değerli danışman hocam, Yard.Doç.Dr.Hülya SİVAS'a, hazırlık ve yürütme aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Yard.Doç.Dr.Berrin Ayaz TÜYLÜ'ye, çalışmam boyunca bana kanlarını vermeyi kabul eden okul arkadaşlarım Cevat AKTAŞ ve Özgür AVCI'ya, yardımlarını esirgemeyen Emel ERGENE'ye ve bana her konuda destek olan aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Ames Testi	8
1.1.1. Deneyde Kullanılan Bakteri Suşlarının Tanıtımı	9
Histidin Mutasyonu	10
rfa Mutasyonu	10
uvrB Mutasyonu	11
R Faktörü	11
Kendiliğinden Geriye Dönen Koloni Sayısı	11
1.2. SCE Testi	12
1.2.1. Hücre Döngüsü	13
1.2.2. SCE Oluşum Mekanizması	16
1.2.3. SCE Oluşumunu Etkileyebilen Faktörler	18
1. Kültür Faktörleri	18
2. Biyolojik Faktörler	18
1.3. Karvakrol	19
1.4. Amaç	21
2. MATERYAL VE METOD	22

2.1. Materyal	22
2.2. Metod	22
2.2.1 Test Maddelerinin Hazırlanışı Ve Dozları	22
Karvakrol Doz Tespiti	22
2.2.2 Ames Deneyinin Yapılışı	23
2.2.2.1. Dondurulmuş Kültürden Kalıp Plak Hazırlanması	24
2.2.2.2. Memeli Karaciğer Mikrozomlarının İzole Edilmesi ve S9 Karışımının Hazırlanması	24
2.2.2.3. Ames Testinde Kullanılan Bakterilerin Genetik Yapılarının Kontrolü	25
Histidin Aminoasidi Gereksinimi Kontrolü	25
rfa Mutasyonu Kontrolü	26
uvrB Mutasyonu Kontrolü	26
R Faktörü Kontrolü	27
Spontan Olarak Geriye Dönüşüm Sıklığının Kontrolü	27
2.2.2.4. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması	27
2.2.2.5. Ames Mutajenite Testinin Yapılması	28
2.2.2.5.1. Plak İnkorporasyon Metodu İle Mutajenite Deneyinin Yapılması	28
S9'suz Deney	28
S9'lu Deney	29
2.2.2.5.2. Plak İnkorporasyon Metodu İle Antimutajenite Deneyinin Yapılması	30
Ön İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	30
S9'suz Deney	31
S9'lu Deney	31
2.2.3. SCE Deneyinin Yapılışı	32
1. Gün	32
2. Gün	32
3. Gün	32
4. Gün	32

5. Gün	33
2.2.3.1. İnceleme Ve Analizler	34
3. BULGULAR	35
3.1. Ames	35
3.2. SCE	40
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
5. KAYNAKLAR.....	48
6. EKLER.....	56
6.1. Ames Deneyinde Kullanılan Materyallerin Hazırlanması.....	56
6.2. SCE Deneyinde Kullanılan Materyallerin Hazırlanması.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.	Hücre döngüsü	14
2.	SCE'nin gözlemlenmesine bağlı olarak hücre döngüsü esnasında lenfosit DNA kompozisyonu	17
3.	Karvakrol'ün kimyasal formülü	21
4.	S9' lu plak inkorporasyonunun basamaklarını içeren diagram	30
5.	Spontan hücrelerden bir metafaz örneği (x100)	42
6.	5µl/ml dozluk karvakrol eklenmiş hücrelerden bir metafaz örneği(X100)	43
7.	1µl/ml dozluk karvakrol eklenmiş hücrelerden bir metafaz örneği (X100)	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.	<i>Salmonella typhimurium</i> 'un TA98, TA100 suşlarının genetik yapıları	9
2.	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 suşunun S9'suz Ames mutajenite deneyinden elde edilen değerleri	36
3.	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100 suşunun S9'suz Ames mutajenite deneyinden elde edilen değerleri	36
4.	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 suşunun S9'lu Ames mutajenite deneyinden elde edilen değerleri	37
5.	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100 suşunun S9'lu Ames mutajenite deneyinden elde edilen değerleri	37
6.	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 suşunun S9'suz Ames antimutajenite deneyinden elde edilen değerleri	38
7.	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100 suşunun S9'suz Ames antimutajenite deneyinden elde edilen değerleri	38
8.	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 suşunun S9'lu Ames antimutajenite deneyinden elde edilen değerleri	39
9.	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100 suşunun S9'lu Ames antimutajenite deneyinden elde edilen değerleri	39
10.	Karvakrol eklenmiş insan lenfosit hücre kültürünün SCE mutajenite deneyinden elde edilen değerleri	40
11.	Karvakrol eklenmiş insan lenfosit hücre kültürünün SCE antimutajenite deneyinden elde edilen değerleri	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2AF	: 2-Aminofloren
BrdU	: 5-bromo-2-dioksiüridin
DMSO	: Dimetilsülfoksit
HB Agar	: Histidin/Biotin plakları
HBA Agar	: Histidin/Biotin/Ampisilin plakları
%KM	: Kalan mutajen
MGA Agar	: Minimal Glukoz Agar plakları
MMC	: mitomisin C
NB	: Nutrient broth
4-NPD	: 4-Nitro-o-Fenilendiamin
PBS	: Fosfat buffer salin
SCE	: Kardeş kromatid değişimi
SE	: Standart hata

1. GİRİŞ

İnsanların maruz kaldığı birçok çevresel kirletici, kullanıma sunulmuş kimyasal maddeler ve hatta aflatoksin, safrol, estragol ve cycasin gibi yiyecek ve içeceklerimizde doğal olarak bulunan bileşikler ya belirli metabolik aktivasyonlardan sonra ya da doğrudan doğruya DNA ile etkileşime girerek mutasyona ve kansere neden olmaktadır (Vikse 1993; Arroya-Gomez ve ark. 2000; Wang ve ark. 1999; Lee ve ark., 1994; Kassie ve ark. 2001).

İnsanlar beslenirken de çeşitli kanserojen maddelerle karşı karşıya kalmaktadır. Diğer yandan doğal besinlerimizle alınan nitrit ve nitratların metabolizması sonucu oluşan nitrozo bileşikleri ve nitrozaminler, insanda mide ve özefagus kanserlerine neden olurlar (Ames ve ark. 1975). Besinlerin kızartılması sonucu ortaya çıkan ürünler yüksek oranda mutajenik özellik gösterirler. İnsan diyeti ise bu tür yanmış ve kızarmış besin ürünlerini günde birkaç gram düzeyinde içermektedir. 500 mg yanmış bir besin ürününün kanserojenik etkisi günde iki paket sigara içilmesi ile alınabilecek 400 mg katranın etkisine eşittir (Ames ve ark. 1975). Söz konusu faktörlerin mutajenik etkileri çeşitli bakteriyolojik, hayvansal ya da hücre kültürü yöntemleri kullanılarak test edilmiş ve belirlenmiştir (Maron ve Ames 1983; Giri ve ark. 1999; Bukvic ve ark. 2001; Monarca ve ark. 2001).

Kimyasal maddelerin karsinogenik risklerini ortaya çıkarmak için en doğru yaklaşım deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Fakat bu testlerin sonuçlanması uzun sürmekte ve maliyeti yüksek olmaktadır. Kanser hastalığının hala yaygın olması ve günümüzde teknolojinin ilerlemesine karşın bu hastalığın ortadan kaldırılamaması, kanserin temelini oluşturan mutasyon olayının ve mutasyon oluşturan maddelerin belirlenmesi gereği kısa zamanlı testlerin önemini ortaya koymaktadır. Süreci ve harcamaları açısından daha ekonomik olan mikrobiyolojik ve hücre kültürü testleri daha çok tercih edilmektedir (Vahl ve ark. 1996; Bacchi ve ark. 1998; Wang ve ark. 1999; Freshney ve ark. 1994). Bu testlerin en yaygın olanı Ames / Salmonella/ Mikrozoom Testi, etkinliği, ucuz ve hızlı yapılabilirliği nedeniyle en çok kullanılan ve en iyi karakterize edilmiş bir testtir. Bruce Ames ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan bu testin

kanserojenik maddeleri tanımlama şansı yüksektir (Ames ve ark. 1975). Bu gibi test yöntemlerinin geliştirilerek seri halde uygulanması sonucunda doğal ya da doğal olmayan kimyasalların insan kullanımına sunulmadan önce olası mutajenik etkilerinin saptanması çok önemlidir ve ayrıca çeşitli kuruluşlarca zorunlu kılınmaktadır. Ames/ Salmonella/ Mikrozom Testi ile yapılan çalışmalar, hala en güvenilir test olması nedeniyle 1975 yılından bu yana devam etmektedir (Forman 1991).

Salmonella testi yayınlandığından beri orijinal metodlarla geliştirilmiştir. 5000'den fazla kimyasal bu şekilde çalışılıp yayınlanmıştır. Bu test kompleks çevresel ve biyolojik karışımların mutajenitesinin tanımlanmasında kullanılmıştır. Bu karışımların mutajenik içerikli olanlarının çoğu, kimyasal olarak karakterize edilmiştir. Salmonella/mikrozom testi ile mutajen olduğu belirlenen bazı kimyasalların hepsinin de hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde kansere sebep olmadığı belirlenmiştir (Maron 1983).

Pahalı ve uzun sürede sonuç veren *in vivo* test sisteminde çok miktarda örnek kullanıldığından, ancak ekstrelerde fazla miktarda bulunan ve aktivitesi yüksek olan bileşikler belirlenmektedir. Bu nedenle ön tarama işlemlerinde daha ucuz, duyarlılığı *in vivo* test sistemine göre 10-1000 defa daha artırılmış, kısa sürede sonuç veren ve 2-10 mg gibi az miktar numunenin yeterli olduğu *in vitro* test sistemleri kullanılmaktadır (Wall ve ark. 1987).

Bileşikler arasında polarite yönünden farklılıkların bulunması nedeniyle, yalnızca çözücü ile elde edilen ekstraksiyon yerine, petrol eteri, metanol, veya etanol, kloroform ve su gibi değişik çözücülerle yapılır. Geniş bir taramaya imkan sağlayan bu işlemlerin avantajları yanında, birçok fraksiyonun biyolojik testlere tabi tutulmasından ötürü tek çözücü ekstraksiyonuna oranla pahalı olma gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Tanker ve ark. 1988).

Yüksek protein içeren ve yüksek ısıda pişirilmiş yiyeceklerden elde edilmiş heterosiklik aminlerin ekstrahepatik dokular üzerindeki etkilerinin araştırılması sırasında Ames/Salmonella/Mikrozom testi de kullanılmıştır. Kobay ve farelerden elde edilen karaciğer mikrozomu izole edilerek, 2-amino-3-metil-imidazo [4, 5, f] quinolin, 2-amino-3, 8-dimetil-imidazo [4, 5, f] quinoksalin, 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4, 5, f] quinoxalin ve 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4, 5, -b] püridin'in mutajenitesi araştırılmıştır. 200 °C

sıcaklıkta pişirilen etten elde edilen ekstraktlar, ekstrahepatik dokularda bulunan sit.P450 (CYP) üzerinde olumsuz etkiler göstererek, kuvvetli mutajeniteye sahip olduğu bulunmuştur (Overnik ve ark. 1995). Polisiklik aromatik hidrokarbonlar içeren mineral yağların genotoksitesinin ölçümünde bakteriyel mutajenite testlerinden Ames/Salmonella/Mikrozom testi kullanılmıştır. Bu mineral yağlardan polisiklik aromatik hidrokarbonların mutajenitesi ile karsinojenitesi arasında gittikçe artan deneysel bir korelasyon var olduğunu sonuçlar göstermiştir (Brooks ve ark. 1995). Besin ve karsinojeni olan 2-amino-3-methylimidazol [4, 5-f] quinoline (IQ) bileşiğinin sentetik izomerleri Ames yöntemiyle test edilmiş ve yüksek mutajenik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Vikse 1993).

Çeşitli sediment örnekleri mutajenik etkileri birçok çalışmada Ames/Salmonella/Mikrozom yöntemiyle test edilmiştir (Grifoll ve ark. 1990; Kurelac ve ark. 1989). Brezilya'da Cai nehrinde petrokimya endüstrisinin nehir suyuna katılan atıklarının mutajenik aktivitesinin Ames testi ile araştırılması sonucunda sitotoksik aktivite görülmüştür (Vargas ve ark. 1993).

2-aminoanthracen' in metabolik aktivasyonunun mutajenliği Ames testiyle araştırılmıştır. Testte, aroclor 1254 ile muamele edilmiş rat karaciğer solusyonu (S9) kullanılmıştır. 2-aminoanthracen'in maksimum mutajenitesi için NADP ve Glikoz-6 fosfat gerektiği gözlenmiştir (Ayrton ve ark. 1992).

Mutajenik potansiyel ölçümü ile ilgili olarak yine tıbbi bitkilerden, daha çok Brezilya' da yaygın olan *Sambucus australis*, *Bauhinia forficata*, *Mimosa bimucronata* bitkilerinden elde edilen ekstraktların, çerçeve kayması mutasyonu yönünden aktivite gösterdiği görülmüştür (Bresolin ve ark. 1993). 44 bitki türünden elde edilmiş 55 yaygın fitofarmasötik, mutajenitesi Ames/Salmonella/Mikrozom testi ile araştırılmıştır. *Alchemilla*, *Centaurea*, *Hippocastanum* ve *Myrtillus*'den elde edilen ekstraktlarda Quercetin bulunmuştur. *Echinacea angustifolia* ve *Centaurea* ekstresi hariç diğer tüm bitkilerde mutajenik aktivite görülmüştür (Schimmer ve ark. 1994). Bilinen çaylardan *Camellia sinensis*'in 5 tipinden hidrodistilasyonla elde edilen ekstraktların, 8 çeşit heterosiklik aromatik amin üzerine antimutajenik etkisi Ames/Salmonella/Mikrozom testi ile araştırıldığında, bu ekstraktların mutajenleri

inhibe edici özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu mutajenler özellikle; Trp-P-2 ve 4, 7, 8-TriMeP2'tir (Stavric ve ark. 1996).

Tıp, endüstri, ziraat, sanayi alanlarında kullanılan kimyasal maddeler ile ışın (x-ray, UV), ısı gibi fiziksel etkenler ayrı ayrı yada kombine olarak canlı organizmalar üzerinde genetik hasarlara neden olabilmektedir. Bunun yanında işleyişleri sinerjistik veya antagonistik etki gösterebilir. Ancak kesin olan, bu etkenlerin geleceğimizi hızlı bir şekilde değiştireceğidir. Genetik hasarın belirlenmesinde, uygun ve hızlı sonuçlar alınabilmesi gerekmektedir. Bunun için de, konuyla ilgili bilim dallarının kombine çalışmaları gerekli olan en iyi şartları sağlamaktadır. SCE (Sister Chromatid Exchange : Kardeş kromatid değişimi) yöntemi, bu çalışmalarda önemli bir basamaktır (Hosselet ve ark. 1996).

SCE genetik hasarlar konusunda bilgi verebilen, sitogenetikte kullanılan hassas bir testtir. DNA replikasyonu sırasında BrdU (5-Bromo-2' deoksirüdin) ile işaretlenen kromozomlar, özel bir boya ile boyanarak gözlenir. Kromozomlarda meydana gelen kırılmalar ile bu kırıkların bir kromozomun kardeş kromatidleri arasındaki değişimi ortaya koyan SCE yönteminde ise, kromatidler birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanmakta ve dolayısıyla bir kromatidden diğerine geçiş, renk farkı nedeniyle kolaylıkla ayırtedilebilmektedir (Lüleci 1990). Bu yöntem kırık sendromlarının tanısında ve klastojenik/mutajenik ajanların etkilerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Arroyo-Gomez ve ark. 2000; Yang Wu ve ark. 2000). SCE yöntemi *in vitro* yada *in vivo* olarak yapılabilmektedir. 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).

SCE, genotoksik olduğu bilinen veya tahmin edilen kimyasal ajanların çalışmasında etkili bir yöntemdir. Bu yöntem hem laboratuvar hayvanlarında hem de insan popülasyonlarında çalışabilir (Kligerman ve ark. 1985). SCE analizi, kültürde replikasyon yapabilen, filogenetik spektrumu drozofiladan insana kadar uzanan her hücre hattında yapılabilir (Tucker ve ark. 1993).

Çin hamster fibroblast hatları, Hela gibi insan hücre hatları, deri veya akciğerden alınmış insan hücreleri, fare , sıçan , tavşan gibi laboratuvar hayvanlarının ve insanların lenfosit kültürleri yaygın olarak çalışılmaktadır

(Tucker ve ark. 1993). Bitki , böcek , balık ve memelilere kadar *in vivo* SCE indüklemesi hem fiziksel hem de kimyasal ajanların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bunun yanında insan ve fare amniyotik sıvısında da çalışmaktadır (Tucker ve ark. 1993; Mertens ve ark. 1993).

Kimyasal ajanların insan lenfositlerine etkileri yoğun olarak çalışmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları şunlardır: 2-Asctiaminoflorin , benzo [a] piren , diklorvos , etilmetansülfonat ve nitrozomorfolinin fare periferik kan lenfositlerinde doza bağlı olarak SCE frekansını arttırdıkları , *in vitro* ve *in vivo* şartlarda insan ve fare lenfositlerinde parasetamol ve aspirinin yine doza bağlı olarak SCE frekansının artırabildiği gösterilmiştir (Kligerman ve ark. 1985; Giri 1993).

İnsan lenfosit kültüründe vinil kloridin mutajenitesi, SCE, mikronükleus ve kromozom aberasyon testleriyle çalışılmış, çalışma sonunda vinil kloride maruz kalmış sigara içen kişilerin sigara içmeyenlere göre SCE frekanslarında artış riski taşıyabilecekleri gösterilmiştir, 1,3 bütadin farelerde *in vivo* , insan lenfositlerinde *in vitro* çalışmış ve 1,3 bütadinin *in vivo* genotoksik olduğu halde, *in vitro* zayıf bir genotoksik olduğu işaret edilmiştir (Fucic ve ark. 1990; Arce ve ark. 1990). Vanadyum pentoksidin Çin hamster V79 hücrelerinde kullanılan dozlarda SCE frekansında önemli bir artışa neden olmadığı gösterilmiştir (Zhong ve ark. 1994). P-diklerobenzenin insan lenfosit kültüründe , hücrelerde sitotoksik etki gösterebileceği belirtilmiştir (Carbonell ve ark. 1991). İnsan bronşial apitelial hücrelerinde Akrenonitril 'in belirli dozlarda negatif kontrole göre SCE frekansının arttırdığı belirtilmiş, fare embriyosunda X-ışınına bağlı kromozomal aberasyonlar gözlenmiş , farelerde *in vivo* şartlarda, kullanılan dozlarda C vitaminin , asitomisin C nin mutajenik aktivitesini azaltılabileceği gözlenmiştir (Chang ve ark. 1990; Streffer, 1993; Rivas-Olmedo ve ark. 1992). İnsan lenfosit kültürlerinde kromozomların SCE frekansının kırılabilme frekansı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Hirsch 1991). Alkilenaminlerin genotoksik gücü araştırılmıştır (Leung 1994). Hamile kadınlarda indüklenmiş kotinin düzeyleri ölçülerek sigara içmeyenlere göre SCE frekansı değerlendirilmiştir (Lahdetie ve ark. 1993). Parasetamol'un terapötik dozlarda insan lenfositlerinde SCE frekansını artırabileceği gösterilmiştir (Hongslo ve ark. 1991).

Krizotil asbestin *in vitro* genotoksitesini incelenmiş, elemental kromyum, kobalt ve nikel içeren partiküllere maruz kalan kişilerde *in vitro* şartlarda yapılan bir çalışmada, kobaltın zayıf mutajenik etki gösterebileceği, kromyum ve nikelin güçlü olarak SCE oluşumunu indüklediği, Stiren'e maruz kalmış kişilerde SCE sonucunun, negatif kontrole göre büyük farklılık göstermediği sigara içenlerde SCE oluşumunun önemli miktarda artabileceği gösterilmiştir (Hoo ve Parslow 1979; Gennart ve ark. 1993; Jansson ve ark. 1993).

Fare periferik lenfositlerinde *in vitro* ve *in vivo*, 3-kloro -4-(diklorometil)-5 hidroksi-2(5H) – furanon (mx) in sitogenetik etkileri ve etilen dibromid'e maruz kalmış kişilerde *in vitro* yapılan incelemelerde de SCE testi ile çalışılmıştır (Jansson ve ark. 1993; Lukusa ve ark. 1990). *In vitro* insan periferik lenfosit kültüründen elde edilen metafaz kromozomlarında xq27,3 fragil bölgelerde, spontan ve etilmetan sülfonat ile indüklenen SCE frekansında önemli artışlar gözlenmiştir, spontan FRA 16 B nin SCE için hassas bölgeler olabileceği belirtilmiştir (Lukusa ve ark. 1990; Lukusa ve ark. 1991). 1,3-Bütadin'in *in vitro* insan lenfositlerinde SCE oluşumunu indükleyebileceği gösterilmiş, *in vitro* insan lenfositlerinde kalsiyum silikatların sitotoksik ve genotoksik etkileri SCE ve CA (kromozom aberasyonları) yöntemleriyle çalışılarak kullanılan dozlarda kontrole göre CA ve SCE frekanslarında artışlar gözlenmiştir (Sasiadek ve ark. 1991; Aslam ve Rahman 1993).

Pestisidlere maruz kalan bir İtalyan populasyonunda yine CA ve SCE testleri çalışılmıştır (Ferrari ve ark. 1991). Sülfür dioksit maruz kalmış kişilerde yine aynı testler kullanılmıştır (Miller 1991). Bleomisin, siklofosfamid ve etil metan sülfonat'a maruz kalmış insan B ve T. Lenfositlerinde SCE araştırılmış, sonuçta etilmetan sülfonatın her iki hücre populasyonunda SCE frekansında artışlara, siklofosfamidin ise, B-lenfositlerine göre T- lenfositlerinde daha fazla SCE frekansı artışına neden olduğu, Bleomisin'in B- ve T-lenfositleri arasındaki SCE artışı açık olarak gözlenememiştir (Miller 1991). *In vivo*, somatik düzeyde 6-merkaptopürinin hem kromozomal aberasyonları (CA) hem de SCE artışlarını indükleyebildiği, vinil esterleri ve karboksilik asidin de, insan lenfosit kültüründe SCE oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (Mosesso ve Palitti 1993; Sipi ve ark. 1992). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, alfa azaronun

SCE frekansında kontrole göre artışlara neden olabileceği bildirilmiştir (Morales-Ramirez ve ark. 1992). Fare kemik iliği hücrelerin gama ışınları ile indüklenmesinde klorofilinin *in vivo* etkisi yine SCE yöntemi ile çalışılmış ve kullanılan belirli dozlarda klorofilinin gamma ışınları nedeniyle oluşabilecek SCE indüksiyonunu azaltabileceği sonucu alınmıştır (Ramirez ve Rodriguez 1994). Doğal hümik asitlerin, *in vivo* Çin hamster hücrelerinde, mitomisin C ve maleik hidrazidin mutajenik aktivitelerini, antimutajenik aktivitesiyle inhibe ettiği gösterilmiştir (Cozzi ve ark. 1993). İnsan lenfosit kültürlerinde, bleomisin, mitomisin C, streptonigrin ve 4-nitroquinolin -1 oksit' in SCE oluşumu üzerindeki etkilerini tekrarlı ölçümleri çıkartılmış, yine insan lenfosit kültürlerinde nikel sülfat, kurşun sülfat ve sodyum arsenitin yalnız yada UV ile birlikte SCE oluşumuna yol açabileceği gözlenmiştir (Miller 1991; Sahu ve ark. 1989). Aynı şekilde insan lenfosit kültürlerinde kloramfenikolün SCE ve kromozom aberasyonları indüklediği işaret edilmiştir (Sbrana 1991). *In vitro* insan hücreleri üzerine antikagasik benznidazolün sitogenetik etkileri SCE ve CA düzeyinde çalışılmış ve benznidazolün kontrol'e göre SCE frekansında önemli artışları kaydedilmiştir (Morris 1991). Epoksitlerin yapı- aktivite ilişkileri yine SCE yöntemi ile çalışılmıştır (Hude ve ark. 1992).

Sonuç olarak, SCE yöntemi uzun yıllardan günümüze dek, sitogenetik çalışmalarda kullanılan duyarlı bir yöntemdir (Musilova ve ark. 1983). SCE, kromozomlarda yapısal değişimle sonuçlanmayan, replike olan kromozomlarda, kromatidler arsında homolog bölgelerin karşılıklı değişimidir (Carrona ve Natarajan 1988; Sinues ve ark. 1992; Tucker ve ark. 1993). Oluşum mekanizmasıyla ilgili birkaç model bulunmaktadır. Modeller genellikle, DNA ipliklerinin yer değiştirme olgusunu açıklamaktadır (Tucker ve ark. 1993). Deneysel olarak gözlenebilmekle birlikte, oluşumun moleküler mekanizması tam bilinmemektedir (Beek ve Obe 1979; Sinues ve ark. 1992; Tucker ve ark. 1993). Günümüze dek yapılan çalışmaların sonuçları, SCE nin DNA sentezi sırasında, birbirine yakın olarak replike olan replikasyon çatallarındaki iplik kırılmalarıyla oluştuğu fikrini desteklemektedir (Tucker ve ark., 1993).

Mutajenik etkilerin saptanması kadar önemli bir diğer konu ise bilinen mutajen yada kanserojenlerin etkisini engelleyecek aktiviteye sahip olan maddeleri ortaya çıkarmaktır. Antimutajenik etki olarak bilinen bu aktivite

benzer testler ile bugüne kadar bazı bileşikler için tesbit edilmiştir (Uenobe ve ark. 1997; Kaur ve Saini 2000; Santana-Rios ve ark. 2001; Gasirowski ve ark. 2001). Yüzyıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde ve ilaç sanayinde bir takım etken maddelerinden yararlanılan bitkilerin mutajen bileşikler içcrip içermediğinin araştırılması, onların daha güvenilir ve bilinçli bir şekilde bilimsel anlamda da desteklenerek kullanılmasını sağlayacaktır. Bir yandan da gelişerek yürütölen çalışmalarla antimutajenik özelliğce sahip etken maddelerinin araştırılması gerekmektedir. Ames testi aracılığıyla bu yönde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu test yardımıyla antimutajenik etki de araştırılmıştır. Bunlardan birisi Betel adı verilen bitkinin yaprak ekstratlarının, tütün bitkisindeki iki farklı N-nitrosamin'e karşı gösterdiği antimutajenik etkinin ortaya konması çalışmasıdır (Padma ve ark. 1992). Su bitkilerinin antimutajenliği yine buna benzer bir çalışma ile belirlenmiştir (Motoyasu ve ark. 1992).

1.1. Ames testi

Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri henüz bilinmeyen, sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal maddenin kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmesi sağlığımız açısından gerekmele birlikte, laboratuvar hayvanları ile yapılan kanserojenesis deneylerinin hem çok zaman almaları, hem de çok pahalı olmaları nedeniyle başarılması zor bir durum gösterir. Canlı hayvan deneyleri yerine kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için son yıllarda birçok *in vitro* test sistemi geliştirilmiştir. Kısa zamanlı testler diye bilinen bu testlerle kimyasal maddelerin veya doğal bitkisel vb. ürünlerin, belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçölmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Bağcı 1985).

Dr. B. Ames tarafından geliştirilmiş olan ve Ames testi olarak da adlandırılan Salmonella/mikrozom test sistemi kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden birisidir.

1.1.1 Deneide kullanılan bakteri suşlarının tanıtımı

Bu çalışmada, Prof.Dr. Ames ve arkadaşları tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Ames testi için gerekli olan orijinal mutasyonlara ek olarak meydana getirilen bazı özellikler ile çerçeve kayması mutajenlerine karşı daha hassas hale getirilmiştir. Bu suşlar Dr. Bruce N. Ames' den (University of California, Berkeley, C.A., USA) temin edilmiştir. Kontrolleri Maron ve Ames'e (1983) göre yapılmış olan bakteri suşlarının genetik yapıları Tablo 1'de verilmektedir. Bakteriler Master plate şeklinde saklandı ve kullanılacağı zaman Oxoid Broth No 2'de üretildi. Ayrıca genotip kontrol deneylerinde mutant suşlar ile kıyaslanmak üzere yaban tip *Salmonella typhimurium* kullanıldı.

Çizelge 1.1. *Salmonella typhimurium*' un TA98, TA100 suşlarının genetik yapıları

Mutant suş	Histidin mutasyonu	Lipopolisakkarit (LPS)	Onarım	R faktörü
TA98	HisD 3052	rfa	Δ uvrB	+
TA100	HisG 46	rfa	Δ uvrB	+

Salmonella typhimurium' un kullandığımız standart suşları atasal formlarından birçok yönden ayrılmaktadır. Aşağıda belirtilen bazı mutasyonlara maruz kalmışlardır. Bağımsız olarak izole edildikleri uvrB-bio-gal delesyonlu ve rfa mutasyonlarını içerirler. İki Ames-test suşunun mutajenlere cevapları

bakımından oldukça farklı olduğu gösterilmekte, bu yönden orijinal his mutasyonlarının mutajenik spesifiteleri açısından da benzer değildirler. Genel olarak; TA100' ün genetik özellikleri kimyasalların öldürücü etkilerine karşı TA98 den daha duyarlı olduğu görülür. En büyük farklılık, nifurtimox ve bunun analogu olan IK bileşiği ile bulunmuştur. Genelde kullanılan *Salmonella typhimurium* ırklarının tümünün izogenik olarak Popkin ve arkadaşları tarafından yapıldığı ve standart TA98 gibi hisD3052 ırkıdan türetildiği düşünülebilir.

Bu test sisteminde, *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla elde edilmiş bir seri *S. typhimurium* mutant suşu kullanılmaktadır. Bu suşların genetik özellikleri şöyledir:

Histidin mutasyonu: Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar, ya DNA daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri ya da bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Test edilen bileşiğin neden olduğu mutasyonun esas mekanizması, moleküler düzeyde bu suşlarla gösterilebilir. Başlangıçta geliştirilen his⁻ mutantlarının çeşitli kimyasallara karşı duyarlılığını arttırmak üzere, bu suşlara bazı mutasyonlar eklenmiştir.

hisG46: Bu mutasyon histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende lösin kodonu GAC yerine prolin kodonunun GGG gelmesine
CTG CCC
neden olur.

hisD3052: hisD⁺ geni histidinol dehidrogenaz enzimini kodlamaktadır. hisD3052 mutasyonu (-1) çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup nükleotid eksikliği hisD⁻ geni içinde 8 kere tekrarlanan GCGCGCGC bölgesindedir.
CGCGCGCG

Bu nedenle bu suş daha ziyade çerçeve kayması tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik/kanserojenik kimyasallarla his⁺ hale dönüştürülmektedir.

rfa mutasyonu: Bu mutasyon, bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerle meydana gelir. Hücre duvarının lipopolisakkarit

bariyerinin kısmen yok olmasını sağlayan rfa mutasyonu sonucu normalde hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllerin hücre içine girişi kolaylaştırılmıştır.

uvrB mutasyonu: Bu mutasyon, DNA onarım sisteminde kesip çıkarma (excision repair) görevini üstlenen enzimi kodlayan uvrB genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. Bu mutasyon DNA kesme onarma sistemi için kodlanan uvrB⁺ geninin delesyonuna sebep olur, sonuçta birçok mutajenin teşhisinde duyarlılık son derece artmış olur. uvrB⁺ içinde normalde chl ve bio genleri de bulunur fakat uvrB geninin delesyonu sırasında istenmeden chl ve bio çıkarılmış olur. Bu yüzden bakteri çalışması için biyotine ihtiyaç duyar. chl nitrat redüktaz enzimini kodlayan genidir. Bio geni biyotin sentezinden sorumlu bir enzim kodlar. Dolayısıyla bu enzimin yokluğu mutant suşu değişik mutajenlere karşı daha hassas yapmaktadır.

R faktörü: Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. typhimurium* TA1538 ve TA1535 suşlarına, ampisiline dirençlilik geni taşıyan pKM 101 R faktörü plazmidinin eklenmesiyle *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları elde edilmiştir. Plazmid içeren suşların, mutajenik olduğu gösterilmiş ajanlara karşı cevapları, plazmid içermeyen suşlara göre oldukça yükselmiştir. Orijinal suşlarla zayıf mutajen ya da mutajen olmayan ajanlar, plazmid içeren yeni suşlar ile net bir pozitif cevap vermişlerdir. pKM 101 plazmidi, bu suşların daha duyarlı olmasından sorumlu olan, hata oranı yüksek (error-prone repair) onarım sistemi ile bağlantılı gen ürünlerini içermektedir.

Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı: Her test suşu, kendine özgü bir frekansla his⁻ özelliğini kaybederek his⁺ durumuna kendiliğinden döner (spontan reversiyon).

Salmonella/mikrozom test sistemine daha sonra rat karaciğeri 9000xg supernatanını ve kofaktörleri içeren metabolik aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır (Hacettepe Üniversitesi Yaz Okulu notları 1997). Memeli dokularından elde edilen mikrozomal enzim sisteminin kullanılması ile metabolik aktivasyon reaksiyonlarının mutajenik aktivite üzerindeki etkisi de belirlenebilmektedir (Park ve ark. 2000).

1.2. SCE testi

SCE, DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatidlerin karşılıklı yer değiştirmesidir. Memelilerde hücre bölünmesinin normal bir özelliği olarak meydana gelebilir (Carrona ve Natarajan 1988; Dean and Donfort 1990; Musilova ve ark. 1983; Wilson ve ark. 1980; Morris 1991).

Mc Clintock 1938-1957 yılları arasında mısır bitkisinin monosentrik halka kromozomlarının kaybolurken, disentrik halka kromozomlarının oluşumunun arttığını gözlemiştir (Dean ve Donfort 1990; Musilova ve ark. 1983; Kelsey ve ark. 1988; Morris 1991). 1957 yılında Taylor ve arkadaşları replike olan hücrelerin DNA iplikçiklerini farklı olarak göstermek için, DNA yı H^3 Timidin ile işaretleyip, gümüş tanecikler şeklinde gözlenebilen işaretleri alan ve işaret almayan kromatidleri ayırt etmek için de otoradyografi kullanmışlardır (Carrona ve Natarajan 1988; Kelsey ve ark. 1988; Morris 1991). Ancak tritium'un dağılım mesafesinin izlenmesi güç olduğundan, değişimlerin miktar ve pozisyonlarının saptanmasında detaylı veriler elde edilememiştir (Kelsey ve ark. 1988). 1973 yılında Latt DNA çift sarmalına Bromodeoksiüridin (BrdU) bağlandığında, Bisbenzamid (Hoechst 33258) boyasının fluoresansını azalttığını, Perry ve Wolf, 1974 yılında BrdU nin kromatin yapısına Giemsa boyasının girişini kısıtladığını göstermişlerdir. Bu bulgular ile yeni bir teknik geliştirilerek (Floresans boya +Giemsa tekniği), SCE otoradyografiye gerek kalmaksızın gösterilebilmiştir (Carrona ve Natarajan 1988; Dean ve Donfort 1990; Musilova ve ark. 1983; Kelsey ve ark. 1988; Perry ve Wolf 1974).

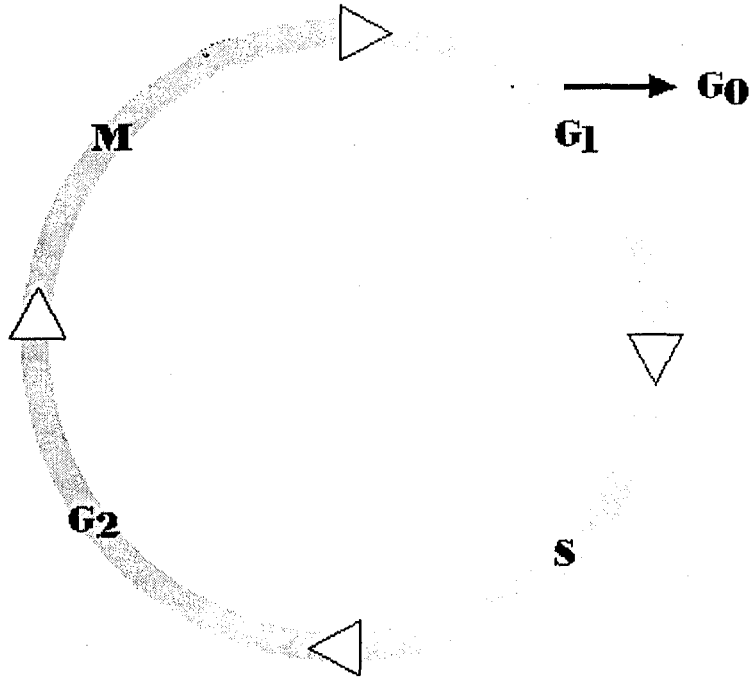
Sonraki yıllarda ökaryotik kromozom yapısının açıklama çalışmalarında yine SCE den yararlanılmıştır. SCE tekniği, DNA nın bazı bölgelerde oluşabilen yerdeğişimini kromozom düzeyinde gösteren bir analiz yöntemidir (Carrona ve Natarajan 1988; Sinues ve ark. 1992). Latt'ın 1974 te mitomisin-C'nin SCE frekansında artışlara neden olduğunu göstermesinden sonra günümüze dek, SCE genotoksisitenin senitif bir indikatörü olarak kabul edilmekte ve çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Tucker ve ark. 1993). Bu yöntem genetik olarak aktif kimyasal ajanlara maruz kalan insan populasyonlarında hasarın gözlenmesi

için uygun bir metod olup, DNA hasarları ve tamir mekanizması bozukluklarının tayini için sensitif bir parametredir (Kligerman ve ark. 1985; Beek ve Obe 1979; Motykiewicz ve ark. 1992; Hoo ve Parslow 1979; Kelsey ve ark. 1988; Tucker ve ark. 1993; Xing ve Zhang 1990; Zhang ve Yang 1992; Zhang ve ark. 1991).

Üstelik, genotoksik kimyasal ajanların kullanılan düşük konsantrasyonlarında bile hassas sonuçlar elde edilmektedir (Tucker ve ark. 1993; Kelsey ve ark. 1988; Xing ve Zhang 1990). Bir çok mutajen ve karsinojenlerin çalışmasında SCE, güçlü bir indikatör tekniği olarak hizmet etmektedir. Bazı kimyasallarda aynı çalışmada SCE ve CA (kromozom aberasyon testi) yöntemleri birlikte yapıldığında, SCE yönteminin kromozom aberasyon testinden (CA) çok daha fazla hassas olduğu gösterilmiştir (Fucic ve ark. 1990; Tucker ve ark. 1993; Rivas-Olmedo ve ark. 1992). Üstelik SCE testi, bakterial mutajenite testlerinden de daha hassastır (Tucker ve ark. 1993). SCE ve kromozom aberasyonlarının oluşum mekanizmalarının farklı olduğu, aralarında bir korelasyon bulunmadığı, aynı şekilde SCE ve mikronükleus testlerinden elde edilen sonuçlarında birbiri ile ilişkili olmadığı ifade edilmektedir (Fucic ve ark. 1990; Murphy ve ark. 1993).

1.2.1. Hücre döngüsü

Aktif olarak bölünen hücreler, döngü şeklinde bir değişim geçirirler (Şekil 1). Hücrelerin çoğalması gen ekspresyonunun çalışılması için basit, örnek sistem olarak düşünülebilir. Mitoz ve DNA sentezi hücre siklusunu karakterize eden belirleyicilerdir. G1 ve G2 fazlarını gösterir (Adams 1993).



Şekil 1.1. Hücre döngüsü

In vitro yapılan çalışmalarda amaç, mitoz bölünme sırasında kromozomların gözlenebilmesidir. Bunun içinde hücrelerin mitotik bölünmeleri metafaz döneminde durdurulur. Metafaz safhasında kromozomlar hücrenin merkezinde toplanırlar. Anafaz safhasında mitotik iplikçikler oluşarak, kromozomların sentromerlerine bağlanır ve onların karşı kutba göç etmesine neden olur.

Mitotik iplikçikler bir protein tipi olan tübilinden oluşmuştur. Kolşisin, kolsemid, nakadozol, vinkristin ve vinblastinile oluşumları bloklanabilir. Bu durumda mitoz bölünme metafaz safhasında durdurulmuştur.

S fazı makromolekül sentezlerinin yapıldığı evredir. DNA sentezi bu evrede görülür. DNA iplik otoradyografisi ni kullanarak 1966-1977 yılları arasında Cairns hayvan hücrelerinde DNA sentezinin ayrı ayrı replikonlarda olduğunu göstermiştir. DNA sentezi bir replikonun ortasından başlayarak,

replikonun iki ucuna doğru, iki yönde ilerler. Daha sonra yakın replikonlar birbiriyle kaynaşarak replike olan iki kromatid ayrılır (Adams 1993).

G1 zamanındaki varyasyonlar, gerçekte farklı hücre tiplerinin hücre döngüsü zamanındaki majör varyasyonları açıklar. G1 fazında uzun zaman harcayan hücreler, bölünen hücre tiplerinde tipik olarak bulunan enzimlerinden bazılarını yitirmişlerdir. Bu enzimler kısmen DNA sentezi ile ilgili enzimlerdir. Bu hücrelere " hücre döngüsü dışında " veya " Go fazında " denilir (Darnell ve ark. 1990). Hücrelerin Go fazını bırakması ve döngüye tekrar dönebilmeleri için bir uyarı gerekmektedir. Hücreler suboptimal şartlarda bırakıldığında Go fazına girmektedirler. Go fazında bulunan hücre popülasyonlarında, hücrelerin az bir kısmının DNA sentezi yaptığı, bu kısmın proliferasyona indüklenebileceği öne sürülmüştür.

Hücre popülasyonlarının çoğunda hücrelerin hepsi birden proliferere olmaz. Bu şartlarda proliferasyon indeksi, (P.I):

$$P.I = \frac{\text{Sağ olan hücre miktarı}}{\text{Toplam hücre miktarı}} \quad \text{olarak verilir.}$$

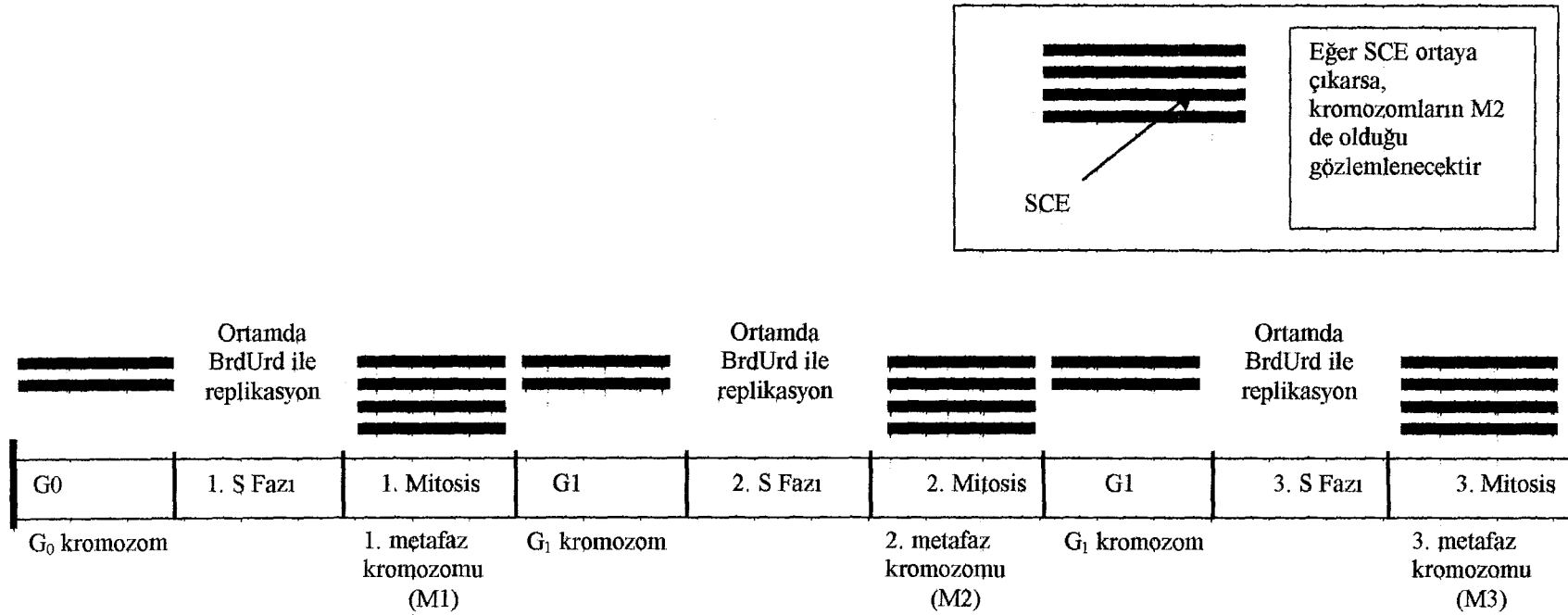
Yukarıdaki eşitlikten anlaşılacağı gibi, kültürdeki hücre sayısının iki kat artması için gereken zaman, senkrome kültürlerde toplam hücre siklus süresine eşit değildir (Adams 1993).

Bölünen hücre tiplerinde kimyasal ajanların çalışılmasında hücre döngüsünün büyük önemi vardır. Çalışılacak kimyasal kültüre hücrelerin bölünmeye başlamasından sonra, yada kültürün başlangıcında eklenebilir. Kimyasal etkenin hücrelerin bölünmeye başlamasından sonra eklenmesi, mitoz bölünme gerektiren yöntemler için önemlidir. Toksik bir ajan, bir mutajen varlığında bile, Go dönemindeki hücrelerin G1 evresine girmelerini engelleyebilir (Carrona ve Natarajan 1988; Dean ve Donfort 1990).

1.2.2. SCE oluşum mekanizması

Bölünen hücrelerin bulunduğu ortama BrdU eklendiğinde, replikasyon sırasında DNA çift sarmalına Timin yerine BrdU girer. BrdU, hücre döngüsünün birinci sentez evresinde DNA yapısına katılmaktadır (Şekil 2). Bu aşamadan sonra hücreler ikinci döngüye girerler. İkinci sentez döneminde kardeş kromatidlerden biri DNA çift sarmalının her iki iplikçisinde de BrdU'ü bulundurmakta, diğer kardeş kromatidin DNA çift sarmalının sadece bir iplikçisi BrdU içermektedir. Hücreler üçüncü döngüye girdiklerinde ise, DNA iplikçiklerinin hemen hemen tamamı BrdU'ü yapısına almıştır. Bu aşamalardan geçen kromozomlar, FGP tekniği ile boyandığında her iki DNA iplikçisinde BrdU bulunan kromatidler arası parça değişimleri açık-koyu boyanmış kromatidler şeklinde görülür. Kromatidlerdeki kırılma noktalarının sayılması ile SCE frekansı hesaplanır (Dean ve Donfort 1990; Crossen ve Morgan 1977; Jansson ve ark. 1986).

Son yıllarda farklı hücre hatları ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, DNA lezyonları ve sitotoksosite arasında bir korelasyon bulunduğunu aynı şekilde DNA hasarı ve tamiri arasında da kompleks bir ilişki olduğunu göstermektedir (Zhang ve ark. 1991). Güçlü genotoksik kimyasallar, güçlü karsinojenlerdir. DNA' da hasarın oluşumu ve tamir edilememesi kimyasal karsinogenezisin başlangıç ilkesidir (Zhang ve ark. 1991).



Şekil 1. 2. SCE' nin gözlemlenmesine bağlı olarak hücre döngüsü esnasında Lenfosit DNA kompozisyonu. M2 metafazı örnek olarak; Harlequin kromozomları değişken olarak flourosan ve Giemsa boyalarıyla boyanır ve SCE gözlemi sağlanır (Perry ve Thomson, 1984 ; Wulf, 1990)

1.2.3. SCE oluşumunu etkileyebilen faktörler

In vitro ve *in vivo* şartlarda SCE oluşumunu etkileyebilen birçok faktör vardır. Bunlar iki grupta toplanabilir.

1.) Kültür faktörleri: İnsan lenfosit kültüründe bulunan hücre sayısının kültüre eklenen BrdU miktarına oranı önemli bir faktördür. BrdU, toksik sınırlar dışında yüksek dozda hücre kültürüne eklenirse, mitotik indekste azalmalara ve SCE frekansında beklenenden daha fazla artışlara neden olmaktadır (Carrona ve Natarajan 1988; Beck ve Obe 1979; Musilova ve ark. 1983; Zhang ve ark. 1991).

Kültür ortamında çoğaltılan lenfositlerden kromozom elde edilme zamanı (fiksasyon zamanı) önemli bir faktör olup, SCE oluşumunu büyük ölçüde etkiler (Carrona ve Natarajan 1988).

İnsan lenfosit kültürü için alınan kan örnekleri, yaklaşık 7 gün oda sıcaklığında veya +4°C de saklanabilir. Ancak saklama süresi uzatıldığında, mitotik indekste azalmalara neden olabilir (Musilova ve ark. 1983). Örnek olarak alınan kan, ortama ekleneceği sırada 37°C de olması gerekmektedir. Optimum inkübasyon sıcaklığı $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ olarak saptanmıştır (Carrona ve Natarajan 1988).

İnsan lenfosit kültürüne başlanırken, yeni alınmış kan, steril tüplerde, hem asit/sitrat/dekstroz ile hem de heparin ile karıştırılabilir. EDTA uygun değildir. EDTA' nın SCE frekansını arttırdığı gözlenmiştir (Musilova ve ark. 1983).

2.) Biyolojik faktörler: Akut viral enfeksiyonlar lenfositlerde kromozomal aberasyonları ve SCE frekansını arttırmaktadır. Bunun yanında yiyeceklerde bulunan doğal mutajenlerde benzer etkiler gösterebilir (Carrona ve Natarajan, 1988). Ayrıca sigara, alkol bağımlılığı, ilaç kullanımı, fiziksel veya kimyasal ajanlara maruz kalma, beslenme şekli, yaş, cinsiyet SCE frekansını etkileyebilir (Kelsey ve ark. 1990).

Bloom sendromu, Fankoni anemisi ve Xeroderma pigmentosum gibi kalıtsal hastalıklarda SCE frekansının artabileceği gözlenmiştir (Howel 1991)

1.3. Karvakrol

Karvakrol kekik bitkisinde içinde bulunduğu Labiatae familyasının uçucu yağında bulunan bir fenolik madde olup birçok çalışma ile antibakteriyal, antifungal, analjezik ve antitümör gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri rapor edilmiştir (Krimmer ve ark. 1995; Didry ve ark., 1994; Rice ve Coat 1994; Aydın ve ark. 1996; Zeytinoglu ve ark. 1998). Bu gibi önemli etkileri bilinen karvakrolün mutajenik etkilerine dair bir çalışma varken (Stammataia 1999), antimutajenik etkileri ve SCE ile ilgili bir bulguya rastlanılmamıştır.

Timol'ün izomeri olan uçucu özellikte bir sıvıdır. Karvakrol yeni distillendiğinde renksiz fakat ışık ve hava ile rengi koyulaşan ve yapışkan bir hal alan suda az, alkol ve eterde çok çözünen bir sıvıdır. Antiseptik ve germisit olarak dezenfektanlarda, oda spreylerinde ve gargaralarda kullanılır (Guenther 1975; Lenga 1988). Karvakrol buharının gözler, mukozal membranlar ve üst solunum yollarında irrite edici özelliği vardır (Lenga 1988). Sıçanlarda oral LD₅₀ değeri 810 mg/kg., tavşanlarda oral LD₅₀ değeri 100 mg/kg dır (Lenga 1988; Budavari S. ve ark,1988). Tavşan derisinde 500 mg/24 h. dozda şiddetli irriasyona sebep olur (Lenga 1988).

Karvakrolün dekonjestan olarak hazırlanan nazal spreylerinin terkbine girdiği bildirilmiştir (Tibori 1979). Türkiye'de monoklorkarvakrol, antiseptik özelliğinden dolayı antihemorodial bir merhem olan Hedensa® (Santa Farma) isimli preparatın terkbine girer (Abacıoğlu ve ark. 1998).

Karvakrol ve timolle yapılan bir çalışmada, karvakrol ve timolün standart antifungal olarak kullanılan nistatin ve talusitinden daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Agarwal ve Mathela 1979). Karvakrol ile yapılmış başka bir çalışmada karvakrolün 125 ppm. konsantrasyonda denenen tüm patojen mantarların üremesini durdurduğu ve antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir (Caccioni 1992). Timol, karvakrol sinnamaldehit ve öjenolun tek tek veya birbirleri ile kombine edilerek ağız bakterileri üzerinde antibakteriyel etkili olduğu ve ağız bakterilerinin oluşturduğu enfeksiyonlarda kullanılabilecekleri ortaya konmuştur (Didry ve ark. 1994). Ana bileşeni karvakrol, timol, γ -terpinen ve p-simen olan *Origanum vulgare ssp. hirtum* ve *Origanum dictamnus*' tan elde edilen uçucu yağların

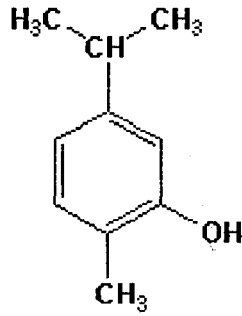
gram pozitif ve gram negatif sekiz bakteri türüne karşı yüksek antibakteriyel etki gösterdiği, karvakrol ve timolün bu etkiden sorumlu olduğu p-simen ve γ -terpinenin ise antibakteriyel etkisi olmadığı bildirilmiştir (Sivropoulou ve ark. 1996). *Origanum vulgare ssp.hirtum* uçucu yağının 1/4000 oranında bakterisit etkili olduğu 1/50000 oranında önemli ölçüde bakteri büyüme oranını azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca 1/10000 oranında dilüe edilmiş aynı uçucu yağın, HeLa (insan serviks, epidermoid karsinom), hep-2 (insan larinx, epidermoid karsinom), Vero (yeşil Afrika maymunu, böbrek) ve RSC (tavşan derisi) hücre kültürlerine karşı sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir (Sivropoulou ve ark., 1996). *Vibrio cholerae* ve *Vibrio parahacmolyticus* üzerinde yapılan çalışmalarda karvakrolün bu bakterilerin gelişimi sırasında, DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Ghosh ve ark. 1986).

Karvakrolün güçlü insektisit etkisi vardır (Inoe ve Kosugi 1989; Rice ve Coats 1994). Özellikle yün giyeceklerin bozulmasına sebep olan *Attegenus piceus*' a karşı oldukça etkili olduğu ortaya konulmuştur (Inoe ve Kosugi 1989). Karvakrolün güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (Aeschbach ve ark. 1994; Schwarz ve ark. 1996). Yapılan bir çalışmada karvakrolün α -tokoferolden ve butil hidroksi anisolden daha güçlü bir antioksidan özelliği olduğu gösterilmiştir (Schwarz ve ark. 1996). Karvakrol, timol ve 6-gingerolün doğal antioksidan maddeler olarak, yiyeceklerin korunmasında sentetik katkı maddelerinin yerini alabilecekleri rapor edilmiştir (Aeschbach ve ark. 1994). Karvakrol, timol ve β -iononun serum kolestrol seviyesini düşürücü etkiye sahip olduğu yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (Case ve ark. 1995).

Origanum onites L. Uçucu yağından fraksiyonlu distilasyonla elde edilen saf karvakrolün (%99,3) 0,1 mg/kg i.p. olarak sekiz gün içerisinde dört defa uygulanması sıçanlarda DMBA ile oluşturulmuş pulmoner tumorigenez üzerinde güçlü inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır (Zeytinoğlu ve ark. 1998).

Karvakrolün ayrıca 120-150 mikromol/lit konsantrasyonunda F10 (B16 melanoma) hücre kültüründe hücre çoğalmasını inhibe ettiği, diyetle 116 mikromol/kg oranında katılan karvakrolün dişi farelere implante edilmiş yüksek metastatik özelliğe sahip B16 melanomunun gelişimini geciktirdiği gözlenmiştir (He ve ark. 1997). Ayrıca timol, karvakrol ve sineolon, gastrik ve duodenal ülserlere, dispepsi ve gastrite karşı tedavi edici özellikte olduğu bildirilmiştir

(Gueldetina 1993). Karvakrolün prostaglandin sentezini inhibe ettiği deneysel olarak kanıtlanmıştır (Wagner ve ark. 1986). Farelere uygulanan tail-flick testi sonucunda saf karvakrolün belirgin analjezik etki gösterdiği bildirilmiştir (Aydın ve ark. 1997). Saf karvakrolün, çok güçlü bir antispazmodik etki gösterdiği, KCL ile oluşturulan kasımları inhibe ettiği, izole sıçan ileumu üzerinde saptanmıştır (Aydın ve ark. 1997).



Şekil 1, 3. Karvakrolün kimyasal formülü

1.4. Amaç

Bu tez kapsamında, çeşitli biyolojik aktiviteleri bilinen karvakrolün olası mutajenik yada antimutajenik aktivitesinin araştırılması oldukça önemlidir. Özellikle bir antimutajen aktivitenin saptanması normal olarak besinlerimizde baharat olarak da kullandığımız bu maddenin bir ilaç olarak kullanımını sağlayacaktır. Bunun için standart bakteriyal bir yöntem olan Ames testi ile memeli hücre kültürlerinde yaygın olarak kullanılan SCE (kardeş kromatid değişimi) testi birlikte uygulanıp karşılaştırmalı olarak değerlendirilecektir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

NaH₂NH₄(PO₄H₂O), 2-Aminoflurenol (2-AF), K₂HPO₄, KCl, NaCl, Na₂HPO₄12H₂O, C₆H₅Na₃O₇2H₂O, Methanol, Asetik asit glacial, Dimetilsülfoksit (DMSO), Entellan Merck'den alınmıştır. Ampisilin trihidrat, L-Histidin, Metilkolantren, Şitrikasitmonohidrat, D-Biotin, 5-bromo-2-dioksiüridin (BrdU), Colchicine, Mitomisin C, Heparin Sigma'dan alınmıştır. MgSO₄.7H₂O, Giemsa Fluka'dan alınmıştır. Sodyum hidroksit Codex Carloelba'dan; Nutrient Broth No:2 Oxoid'den; 4-Nitro-o-fenilendiamin (4-NPD) Aldrich Chemical Co.'dan; Bacto Agar Difco'dan, S9 tabletleri Boehringer Mannheim'den; Kromozom Medyum B Seromed Biochrom'dan alınmıştır. Serum fizyolojik için marka önemli değildir.

2.2. Metod

2.2.1. Test maddelerinin hazırlanışı ve dozları

Bu çalışmada *Origanum onites L.*' den elde edilen carvacrol kullanılmıştır. Test maddesi Yrd.Doç.Dr. Süleyman Aydın' dan (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmosötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi) temin edilmiştir. Bu madde dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Carvacrol doz tespiti

1.Doğ 80µl/ml

400 µl/ml Carvacrol+4600 µl/ml DMSO → 5 ml

2.Doğ 70 µl/ml

70 µl/ml Carvacrol+930 µl/ml DMSO → 1ml

3.Doğ 60 µl/ml

60 µl/ml Carvacrol+940 µl/ml DMSO → 1 ml

4. Doz 50 µl/ml

50 µl/ml Carvacrol +950 µl/ml DMSO → 1 ml

5. Doz 40 µl/ml

1 ml 1. Doz +1ml DMSO → 2 ml

6. Doz 20 µl/ml

1 ml 5. Doz + 1 ml DMSO → 2 ml

7. Doz 10 µl/ml (Sitotoksik sınır)

1 ml 6. Doz +1 ml DMSO → 2 ml

8. Doz 1 µl/ml

0,5 ml 7. Doz +4,5 ml DMSO → 5 ml

9. Doz 5 µl/ml

2 ml 7. Doz + 2 ml DMSO → 4 ml

10. Doz 0,5 µl/ml

2 ml 8. Doz + 2 ml DMSO → 4 ml

11. Doz 0,1 µl/ml

1 ml 11. Doz + 4 ml DMSO → 5 ml

Hazırlanan dozlardan ilk dört tanesinin toksik olduğu tespit edilmiştir. Deneyde 7., 8., 9., 10. ve 11. dozlar kullanılmıştır.

2.2.2. Ames Deneyinin Yapılışı

Bu çalışma, dondurulmuş kültürden kalıp plak hazırlanması, mikrozomal fraksiyonun hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi Ames/ Salmonella/ Mikrozom testine uygun olarak yapılmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olarak iki şekilde yapılmıştır. Her doz paralel üç tabaka halinde denenerek farklı zamanlarda iki bağımsız deney olarak çalışılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, spontan kontrol, solvent kontrol de denenmiştir.

2.2.2.1. Dondurulmuş kültürden kalıp plak hazırlanması

Dondurulmuş kültür derin dondurucudan çıkarılarak 2 ml nutrient broth içinde 14-16 saat 37°C lik çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda, steril kürdan ile 1 damla alınarak histidin-biotin plaklarına çizgi ekim yapılır. Plaklar 37°C de 48 saat inkübe edilir. Bu şekilde tek koloni düşmesi amaçlanmaktadır. İnkübasyon sonunda iyice izole olmuş bir koloni seçilerek steril kürdan yardımı ile 0,3 ml 1Xfosfat buffer salin (PBS) içeren bir tüpe aktarılıp süspansiyon haline getirilir. Bu bakteri süspansiyonundan steril kürdan yardımı ile histidin-biotin –ampisilin plaklarına çizgi ekim yapılır. Plaklar 37°C de 48 saat süreyle tutulup, inkübatörden 4 °C lik buzdolabına aktararak orada saklanır. Bu şekilde hazırlanan TA98 ve TA100 suşları 2 ay süreyle saklanabilir. Bu süre içinde plaklar buzdolabından çıkarılarak yeni kültürler başlatılabilir ve bu şekilde birçok kez kullanılabilirler.

2.2.2.2. Memeli karaciğer mikrozoamlarının izole edilmesi ve S9 karışımının hazırlanması

Kullanılan test maddesinin mutajen olup olmadığını araştırmak amacıyla mikrozoam ekstresi wistar cinsi ratlardan hazırlanmıştır. Karaciğer mikrozoamlarını izole etmek üzere 200 gr erkek ratlar kullanılmıştır. Ratın mikrozoam enzimlerinin stimüle edilmesi amacıyla öldürülmeden 5 gün önce 80 mg/kg (Maron ve Ames, 1983) olarak mısır özü yağında çözülen 3-Metilkolontre'nin, (0,2-0,5 ml) intraperitoneal enjeksiyonu yapıp mikrozoam enzim artışının uyarılması sağlanmıştır.

Deneye geçmeden önce kullanılan malzemeler steril edilip 0-4°C de 1 saat soğutulmuştur. Karaciğerin ağırlığını saptayabilmek için beherler önceden tartılıp soğutulmuştur. Deneyde kullanılacak olan genç erkek ratlar 5 günlük süre sonunda boynu kırılarak (servical dislocation) öldürülmüştür. Diseksiyon tahtasında karaciğer zedelenmedi ve çabuk bir şekilde çıkarılıp önceden tartılmış, buz içindeki behere konulup net ağırlığı bulunmuştur. Bundan sonra 1 gr karaciğere 3 ml olarak soğuk 0,15 M KCl ile karaciğer yıkandıktan sonra, 1 gr karaciğere 3 ml olacak şekilde soğuk 0,15 M KCl eklenmiştir. Karaciğer steril

pens ve makas ile parçalanıp daha küçük parçalara ayrılmıştır. Bu karışım "Junge Kunkel ultra turrax" marka homojenizatör tüpüne alınıp aynı marka homojenizatör ile 24000 rpm'de homojenize edilerek koyu pembe renk görülene kadar işleme devam edilmiştir. Homojenat daha sonra "Varifüğe 20RF" marka santrifüj ile 9000 devirde 0-2⁰C de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernetant kısım soğuk steril ependorf tüplerine aktarılmıştır. Kontaminasyonu önlemek amacı ile homojenat 0,25 µm çaplı selüloz filtreler ile filtre işlemi yapılmıştır. Sterilite kontrolü için mikrozomal fraksiyondan 0,1 ml alınıp nutrient agar plaklarına ve HBA plaklarına ekim yapılmıştır. Plaklar ters çevrilerek 37⁰C de 24 saat inkübe edilmiştir (Maron ve Ames 1983). Kullanılmak üzere -20⁰C de saklanmıştır. Deney sırasında mikrozom karışımından S9 karışımı halinde yararlanılmıştır. Bu karışımda çözeltiler bölümünde verilen şekliyle hazırlanmıştır.

2.2.2.3. Ames testinde kullanılan bakterilerin genetik yapılarının kontrolü

Ames/ Salmonella/ Mikrozom testinde kullandığımız bakteri suşlarının (TA98 ve TA100) genetik yapılarının kontrolü, deneysel çalışmalar öncesinde aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

Histidin aminoasidi gereksinimi kontrolü:

S. typhimurium TA98 hisD3052 (his⁻) mutasyonu ve TA100 hisG46 (his⁻) mutasyonunun varlığını kontrol için test suşları 14-16 saat 37⁰C de, çalkalamalı ctüvde, Oxoid Nutrient Broth No: 2 içinde büyütüldüler. Ardından bakteriler histidin/biotin plakları ile biotin içeren minimal glukoz agar üzerine ayrı ayrı çizgi ekim yapılarak ekildi. Petriler 37⁰C de ters bir şekilde 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda histidin/biotin plaklarında büyüme gözlenirken, minimal glikoz agar da büyüme olmadı. Böylece bu bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıdığı anlaşıldı.

rfa mutasyonu kontrolü:

Bu mutasyon, bakteri hücre duvarının incelenmesine neden olan mutasyondur. Mutasyon, bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulup hücre zarının geçirgenliği artırılmıştır. Varlığı kristal viyole ile tespit edildi. Bunun için Oxoid Nutrient Broth No:2 de 14-16 saat de üretilen bakterilerden 0,1 ml alınarak 2 ml'lik erimiş top agara ilave edildi. Daha sonra çalkalanarak nutrient agar plaklarının üzerine döküldü. 10 dakika agarın donması beklendikten sonra plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirildi. Diskin ortasına %0,05'lik kristal viyole karışımından 10 µl damlatıldı. Kağıdın boyayı emmesinden sonra petriyer 37°C de ters bir şekilde etüve koyularak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda disk çevresinde 9 cm'lik üreme olmayı zon gözlemlendi. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine girerek üremelerini engellediği için bakterilerin rfa mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır.

uvrB mutasyonu kontrolü:

Bu mutasyon ile bakterilerin, ultraviyole (UV) ışınlarının neden olduğu hataların düzeltilmesi için gerekli olan "DNA onarım mekanizması" engellenmiştir. Bu mutasyonun varlığı ultraviyole ışınlanması ile kontrol edildi. Bu amaçla Oxoid Nutrient Broth No:2 de büyütülen 14-16 saatlik bakteri suşlarından nutrient agar plaklarına çizgi ekim yapıldı. Plakların kapakları açılarak, plağın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir kapakla kapatılarak 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8 sn süre ile ışınlandı. Işınlamadan sonra petri kapakları kapatılarak plaklar ters çevrildi ve etüvde 37 °C de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra UV'ye maruz kalan kısımda üreme gözlenmezken plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir. Bu sonuç bakterilerin uvrB mutasyonunu taşıdığını göstermiştir. Kullandığımız UV ışığının dozu, bu mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Bunun nedeni, DNA kesme tamir etme mekanizmasının engellenmiş olmasıdır.

R faktörü kontrolü:

Ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile test bakterilerinde bulunan R faktör taşıyan Pkm101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadığı tespit edildi. Bunun için Oxoid Nutrient Broth No:2'de büyütülen bakteri kültürü, ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak ekildi. Plaklar 37⁰C de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bakterilerin büyümesi kontrol edildi. Mutant suşlar plazmid içerdiği için ampisilinli ortamda büyüme gösterebildi.

Spontan olarak geriye dönüşüm sıklığının kontrolü:

Deneyde Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşlarının genetik yapılarının kontrolüne ek olarak, bu suşların belirli süre içinde uyarılmadan dönüşmesi sınıandı. Mutant bakteri suşlarının spontan olarak his- durumundan his+ durumuna dönüşebilmesi belli sınırlar içinde olabilmektedir. Bu sınır TA98 için 30-50 revertant / plak, TA100 için 100-150 revertant/ plaktır. Bu amaçla Oxoid Nutrient Broth No:2'de 14-16 saat süreyle 37⁰C de büyütülen bu bakterilerden 0,1 ml alınarak 45⁰C de tutulan top agar üzerine ilave edildi ve 0,2 ml histidin-biotin solüsyonu eklenip yavaşça çalkalanarak minimal glikoz agar plaklarına döküldü. Eklenen agarın homojen olarak yayılması için plaklar döndürüldü. Petriler ters çevrilerek 48 saat 37⁰C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plaklarda görülen koloniler sayılarak his⁺ revertantların sayısı belirlendi (Maron ve Ames 1983).

2.2.2.4. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması

Kullanılan test bileşiklerinin, standart test suşları için öldürücü olmayan dozlarının saptanabilmesi amacıyla, 1. p agara NB'de büyütülen 0,1 ml bakteri kültürü ve 0,1 ml olacak şekilde değişik konsantrasyonlardaki (doz) mutajenik etkisi araştırılan DMSO'da çözülmüş test maddesi eklendi. Karışım, nutrient agar plaklarına dökülerek 37⁰C de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plaklardaki koloni sayıları, kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik olmayan dozlar saptandı.

Buna göre test maddesinin 40 µl/ml seviyesinin üzerinde toksik olduğu belirlendi. Deneyler sitotoksik sınırdaki bulunan 10 µl/ml ve daha altındaki doz seviyeleri ile yapıldı.

2.2.2.5. Ames mutajenite testinin yapılması

Deneyin amacı, mutant hale getirilerek histidin aminoasidine gerek duyan oksotrof suşların, denemek istediğimiz test maddesi ile histidin yapabilme (prototrofik) özelliğini tekrar kazanması temeline dayanmaktadır. Bu nedenle deneylerde Ames/Salmonella/Mikrozom testine bağlı olarak plak inkorporasyon yöntemi uygulandı.

2.2.2.5.1. Plak inkorporasyon metodu ile mutajenite deneyinin yapılması

Deneyin amacı, mutant hale getirilerek histidin aminoasidine gerek duyan oksotrof suşların, denemek istediğimiz madde ile histidin yapabilme özelliğini tekrar kazanması şekline dayanmaktadır. Bu nedenle deneylerde Ames/Salmonella/Mikrozom testine bağlı olarak plak inkorporasyon yöntemi uygulandı. Deney S9'lu ve S9'suz olmak üzere iki ayrı şekilde yapıldı.

S9'suz deney

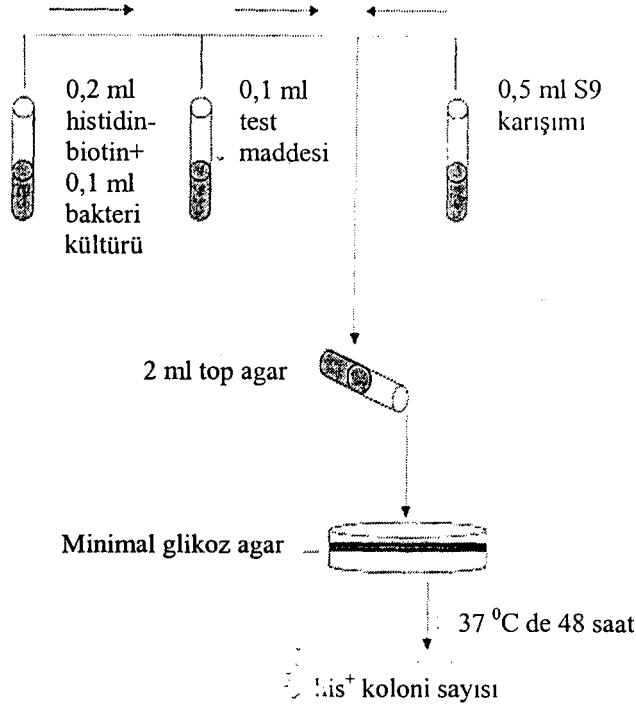
Bu amaçla, içlerine 0,2 ml histidin-biotin çözeltisi eklenmiş 2'şer ml lik yumuşak agar tüpleri içeren tüpler hazırlanarak 45⁰C lik su banyosunda tutuldu. Daha sonra tüplere 0,1 ml 14-16 saatlik nutrient broth da büyütülmüş bakteri kültürü, 0,1 ml test maddesi eklendi. Tüpler çalkalanıp, bekletilmeden MGA (minimal glikoz agar) plaklarına dökülüp, plaklara hızla 8 işareti yaptırılıp top agarın plak üzerinde homojen olarak dağılması sağlandı. 15 dakika donması beklendi. Daha sonra plaklar ters çevrilerek 37⁰C lik otüvde 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayıldı. Deney her doz için 3 ayrı plak olacak şekilde hazırlanarak yapıldı ve 2 kez tekrarlandı. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak

spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif (diagnostik) kontrol olarak, suş için 200 µg/100 µl 4-nitro-o-fenilendiamin kullanılarak yapıldı.

S9'lu deney

S9'lu kısımda tablet başına 3 ml mikrozomal enzim olmak üzere S9 karışımı hazırlanıp buz içinde bekletildi. 45°C lik su banyosu içinde bulunan ve 0,2 ml histidin-biotin solüsyonu içeren tüplere, 2 ml yumuşak agar, 0,1 ml test maddesi, 0,1 ml 14-16 saatlik nutrient broth da büyütülmüş bakteri kültürü ve 0,5 ml buzda bekletilmiş S9 karışımından eklendi. Tüpler iyice çalkalandı ve MGA (minimal glikoz agar) plaklarına döküldü. Plaklara 8 hareketi yaptırılarak karışımın homojen olarak dağılması sağlandı. 15 dakika kadar donması beklenip 37°C lik etüvde 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra his⁺ koloniler sayıldı (şekil.4).

Ayrıca deneyde spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif kontrol olarak da suş için 1µg /100 µl 2-Aminoflurene deneye paralel olarak denendi. Deney her doz için 3 ayrı plak olacak şekilde hazırlanarak yapıldı ve 2 kez tekrarlandı.



Şekil 2.1. S9'lu plak inkorporasyonunun basamaklarını içeren diagram

2.2.2.5.2. Plak inkorporasyon metodu ile antimutajenite deneyinin yapılması

S9'lu ve S9'suz deneylere başlanmadan önce antimutajenite deneyinde ön inkübasyon süresi belirlendi. Daha sonra bu ön inkübasyon süresi kullanılarak S9'lu ve S9'suz deneyler yapıldı.

Ön inkübasyon süresinin belirlenmesi

İçerisinde 2 ml top agar, 0,2 ml histidin-biotin solüsyonu olan tüplere 0,1 ml, 14-16 saatlik nutrient broth da büyütülmüş bakteri kültürü ilave edildi. Daha sonra tüplere 0,1'er ml, 1 µl carvacrol ve 0,1'er ml 4-NPD eklendi. Tüpler 15, 20 ve 30 dakikalık ön inkübasyon süreleri için kullanıldı. En uygun ön inkübasyon süresi olarak 30 dakika bulundu.

S9'suz deney

İçerisinde 2 ml yumuşak agar ve 0,2 ml histidin-biotin solüsyonu bulunan tüplere 0,1 ml, 14-16 saatlik nutrient broth da büyütülmüş bakteri kültürü, 0,1 ml test maddesi ve 0,1'er ml 4-NPD eklendi. Tüpler 37 °C lik etüvde 30 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpler iyice çalkalandı ve MGA (minimal glikoz agar) plaklarına döküldü. Plaklara 8 hareketi yaptırılarak karışımın homojen olarak dağılması sağlandı. 15 dakika kadar donması beklenip 37 °C lik etüvde 48-72 saat inkübe edildi. Deneye paralel olarak yapılan spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif (diagnostik) kontrol için ön inkübasyon yapılmadı. Deney her doz için 3 ayrı plak olacak şekilde hazırlanarak yapıldı ve 2 kez tekrarlandı.

S9'lu deney

S9'lu kısımda tablet başına 3 ml mikrozomal enzim olmak üzere S9 karışımı hazırlanıp buz içinde bekletildi. 45⁰C lik su banyosu içinde bulunan ve 0,2 ml histidin-biotin solüsyonu içeren tüplere, 2 ml yumuşak agar, 0,1 ml test maddesi, 0,1 ml 14-16 saatlik nutrient broth da büyütülmüş bakteri kültürü ve 0,1'er ml 2-AF eklendi. Tüpler 37⁰C lik etüvde 30 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplere 0,5 ml buzda bekletilmiş S9 karışımından eklendi. Tüpler iyice çalkalandı ve MGA (minimal glikoz agar) plaklarına döküldü. Plaklara 8 hareketi yaptırılarak karışımın homojen olarak dağılması sağlandı. 15 dakika kadar donması beklenip 37⁰C lik etüvde 48-72 saat inkübe edildi. Deneye paralel olarak yapılan spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif kontrol için ön inkübasyon yapılmadı. Deney her doz için 3 ayrı plak olacak şekilde hazırlanarak yapıldı ve 2 kez tekrarlandı.

2.2.3. SCE deneyinin yapılışı

SCE deneyi mutajenite ve antimutajenite olmak üzere iki şekilde yapıldı. Kan örnekleri sigara bağımlılığı olmayan, yakın bir tarihte viral enfeksiyon geçirmemiş bir dişi ve bir erkek gönüllüden alındı.

1. Gün

- 20⁰C de saklanan kromozom medyum dışarıya çıkartıldı. Medyum oda sıcaklığına geldiğinde 2,5 ml olacak şekilde tüplere paylaştırıldı (santrifüj tüpleri). Steril bir enjektöre 0,5 ml heparin çekildi. İğnesi değiştirildikten sonra aynı enjektörle 5 ml oluncaya kadar kan alındı. Enjektör hafifçe sallandı (heparin kanda 1/10 oranında bulunmalıdır) ve iğne çıkartılarak steril ortamda 1 damla dışarıya, 6 damla kültür tüpüne olmak üzere tüplere ekim yapıldı (6 damla: 0,2 ml ye karşılık gelmektedir). Kan ekimi yapıldıktan sonra her tüpe 50 µl BrdU konuldu. BrdU eklendikten sonra kültürler 37⁰C lik etüve inkübasyona bırakıldı. Kültürün toplam inkübasyon süresi 72 saattir.

2. Gün

Kültürlerin inkübasyonunun 24. saatinde test maddesi ile muamele işlemi gerçekleştirildi. Farklı dozlardaki test maddesi tüplere 50 µl olacak şekilde ilave edildi. Aynı zamanda tüplerin bir tanesine 50 µl DMSO, diğerine de 100 µl mitomisin C koyuldu. Bu işlemlerden sonra kültürler tekrar etüve bırakıldı.

3. Gün

Kültürler hiçbir muameleye maruz bırakılmadı.

4. Gün

Kültürün 70. saatinde colsemid (0,02 µg/ml) yada colchicine (0,06 µg/ml) ilave edildi. İlave edilen miktar 50 µl dir. Colchicine ilavesinden hemen sonra KCl hazırlandı ve 37⁰C lik etüve alındı. Bu arada fixatif (methanol:glasiyel asetik asit) hazırlandı ve buzdolabına kaldırıldı. Kültürün colchicine ile muamelesi bittikten sonra, 72. Saatte, kültürler etüvden çıkartıldı. 1750 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı (tüpün dibinde 1 ml kalacak şekilde) atıldı. Hücreler pasteur pipeti ile homojenize edildi. 37⁰C'de ısıtılmış %0,4'lük KCl yavaş yavaş (önce 1 damla, sonra 2,3 ve 4'er damla şeklinde her

damlatmadan sonra çalkalama işlemi yapılarak) ilave edildi. 1 ml KCl bu şekilde ilave edildikten sonra hızlı bir şekilde (3ml/3ml) KCl ile 5-8 ml ye tamamlandı. Bu işlemlerden sonra kültürler 37⁰C de 32 dakika inkübe edildi. Preparat hazırlama sırasında eğer hücreler patlamamışsa KCl deki bu inkübasyon süresi birkaç dakika daha uzatılabilir. Yada hücrelerin patlamasını kolaylaştırmak için daha yüksekte damlatma işlemi yapılabilir.

Inkübasyon süresi sonunda hücreler 1200 rpm. de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldı. Hücreler 1 ml lik bir kısımda homojenize edildi. Üzerine damla damla fixatif ilave edildi (Fixatif her zaman yeni hazırlanmış ve soğuk olmalıdır. 1 ml kadar fixatif damla damla ilave edildikten sonra 5 ml fixatif 3 ml ve 2 ml olacak şekilde hızlıca ilave edildi). O da ısısında 20 dakika bekletildi. Süre sonunda 1200 rpm. de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Hücreler süspansiyon edildi. Üzerine yukarıda anlatıldığı gibi fixatif eklendi. Bu fixatif muamele işlemi 3 kez tekrarlandı. Bu muamelelerin sonunda tüpte renksiz, saydam bir sıvı kalır. Eğer bu sağlanmamışsa muameleye devam edilir. Son santrifüjden sonra tüpün dibinde 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant dikkatlice alındı ve atıldı. Sonra preparat yapma işlemine geçildi.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipetiyle karıştırılarak (pipete bir miktar sıvı çekilir sonra hızlı bir şekilde tüpe püskürtülür) homojen hale getirildi. Pasteur pipetine 5-6 damla olacak şekilde hücre süspansiyonu çekildi ve damlatma düzeneğinde her lama 3-4 damla düşecek şekilde ve lam hareket ettirilerek yapıldı. Damlatma işlemi 60 cm yüksekten daha önceden hazırlanmış, soğuk ve ıslak lamlara yapıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra lamlar kurumaları için düz bir yüzey üzerinde üzeri kapatılarak 24 saat bekletildi.

5.Gün

1XSSC hazırlanarak şaleye dolduruldu ve 60⁰C ye ısınması için etüve alındı. 1XSSC nin sıcaklığının 60⁰C yi geçmemesi gerekir.

Preparatların ışınlanması: Işınlama solüsyonu (söransan tamponu) hazırlandı. Tabanı düz cam ışınlama kabına (büyük petri olabilir) lamlar hücreler üst tarafa gelecek şekilde dizildi. Üzerlerini bir film gibi örtecek şekilde ışınlama solüsyonu (söransan buffer) döküldü. Dalga boyu 254 nm. Olan 30 watt ışık yayabilen U.V. lambası ile 15 cm mesafeden ışınlandı (Lamba ile preparat arası

mesafe 15cm olmalıdır. Eğer lambanın watt'ı daha düşükse 8 watt gibi 12cm mesafeden ışınlama olabilir).

Işınlama süresi 30 dakikadır. Işınlama solüsyonunun lam üzerinde fazla olması SCE farkını direk etkilemektedir. Işınlama süresi bittiğinde preparatlar hiçbirşeyle yıkanmadan üzerindeki ışınlama solüsyonu silkelenerek alındı. 60 °C de ısıtılmış 1XSSC içinde 45-60 dakika inkübe edildi.

1XSSC içinde inkübasyon bitiminden 15 dakika önce giemsa solüsyonu hazırlandı. Inkübasyon süresi bitiminde preparatlar hiç yıkanmadan üzerindeki fazla SSC silkelenerek alındıktan sonra giemsa içinde boyamaya alındı. Boyama süresi 30 dakikadır. Boyama bitiminde preparatlar 3 ayrı kaptaki saf sudan sırası ile çalkalanarak geçirildi ve dik durumda kurutuldu. Kuruma işlemi bittikten sonra lamlar entellan ile kapatıldı. Yatık durumda kuruması beklendi. İmmersiyon ile inceleme yapmak için entellanın tam olarak kuruması yani sabitlenmesi gerektiği için 15 gün kadar beklenir. Daha sonra immersiyon ile inceleme yapılmalıdır.

2.2.3.1. İnceleme ve analizler

Lamlar mikroskop kullanılarak incelendi. Metafaz örtüsünün konumunu bulmak için 10X objektifli mikroskop kullanıldı. Daha sonra da metafaz kromozomlarının analizi için 100X objektifli mikroskop kullanıldı. Bu inceleme yapılırken lam üzerine immersiyon yağı damlatıldı. Analiz sırasında, metafaz kromozomları M1, M2, M3 olarak 3'e bölündü.

3. BULGULAR

Materyal ve metod bölümünde açıklandığı üzere, karvakrolün DMSO ile hazırlanan dozlarının mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri test edildi. Bu çalışmada karvakrolün 4-5 dozunun mutajenik ve antimutajenik aktivitesi Ames ve SCE yöntemleriyle tespit edilmiştir.

3.1. Ames

Her doz için üç ayrı plak kullanılıp aritmetik ortalamaları alınmış ve deney sonuçları Çizelge 2-9 da gösterilmiştir. Bu çizelgelerde test bileşenlerinin farklı dozlarında belirlenen revertant koloni sayıları yer almaktadır. Bu sonuçların Dunnett's testine göre varyans ve standart sapma değerleri de hesaplanarak tablolar yapılmış ve kontrol gruplarının karşılaştırılmalı değerleri verilmiştir. Deney sonuçları TA98 için Çizelge 2,4,6 ve 8'de, TA100 için Çizelge 3,5,7 ve 9'da verilmiştir.

Çalışmada, *origanum oil*'in baskın bileşeni olan carvacrol'ün (%74.0) antimutajenik ve mutajenik aktivasyon içeriği araştırılmıştır. Karvakrol aynı zamanda güçlü bir şekilde, sırası ile 4-NDP'nin ve 2-AF'nin metabolik aktivasyonun varlığı veya yokluğunda mutajenitesini indirger. Kalan mutajenlik sırası ile S9'lu veya S9'suz %60 - %80 ve %65 - %80 TA98'den ve %55 - %60 ve %50-%90 TA100'dendir. Karvakrol'ün etkileri doza bağımlı bir davranıştır. En yüksek doz düzeyinde (1µg/plak), sonunda hiçbir koloni gözlenmemiştir, yağda gözlemlenen benzer etkiler gibi toksikliği açığa çıkartılmıştır.

Çizelge 3.1. *Salmonella typhimurium* TA98 suşunun S9'suz Ames mutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz (µg/ml)	Rev/plak S9(-)
DMSO	40	39.50 ± 6.37
4-NFDA	1	3035.83 ± 57.60
Karvakrol	10	24.16 ± 3.92
	5	108.16 ± 7.73 ***
	1	119.33 ± 10.38 ***
	0.5	116.83 ± 18.38 ***
	0.1	146.33 ± 11.69 ***

*** P < 0.001, Dunnett test. 4-NFDA; 4-nitro-o-fenilendiamin (-S9). DMSO; dimetilsülfoksit.

Çizelge 3.2. *Salmonella typhimurium* TA100 suşunun S9'suz Ames mutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz (µg/ml)	Rev/plak S9(-)
DMSO	40	95.16 ± 7.46
4-NFDA	1	989.83 ± 20.96
Karvakrol	10	79.16 ± 19.40
	5	112.16 ± 15.85
	1	90.50 ± 21.58
	0.5	154.33 ± 21.49 ***
	0.1	181.33 ± 15.69 ***

*** P < 0.001, Dunnett test. 4-NFDA; 4-nitro-o-fenilendiamin (-S9). DMSO; dimetilsülfoksit.

Çizelge 3.3. *Salmonella typhimurium* TA98 suşunun S9'lu Ames mutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz (µg/ml)	Rev/plak S9(+)
DMSO	40	46.50 ± 12.50
2-AF	1	1672.00 ± 175.51
Karvakrol	10	28.00 ± 12.71
	5	39.00 ± 4.85
	1	54.16 ± 3.25
	0.5	124.00 ± 13.65 ***
	0.1	208.00 ± 12.36 ***

*** P < 0.001, Dunnett test. 2-AF; 2-aminofloren (+ S9). DMSO; dimetilsülfoksit.

Çizelge 3.4. *Salmonella typhimurium* TA100 suşunun S9'lu Ames mutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz (µg/ml)	Rev/plak S9(+)
DMSO	40	105.33 ± 14.29
2-AF	1	1262.50 ± 37.70
Karvakrol	10	20.66 ± 5.68
	5	77.50 ± 13.01
	1	83.16 ± 16.63
	0.5	60.33 ± 10.61
	0.1	61.33 ± 13.51

*** P < 0.001, Dunnett test. 2-AF; 2-aminofloren (+ S9). DMSO; dimetilsülfoksit.

Çizelge 3.5. *Salmonella typhimurium* TA98 suşunun S9'suz Ames antımutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz(μ g/ml)	Rev/plak	%KM
4-NFDA	1	3244.00 \pm 193.10	
Karvakrol + 4-NFDA	10+1	0	
	5+1	722.83 \pm 55.93 ***	22.25
	1+1	1025.50 \pm 141.89 ***	31.59
	0.5+1	1343.16 \pm 62.24 ***	41.39
	0.1+1	1458.83 \pm 62.24 ***	44.94

4-NFDA; 4-nitro-o-fenilendiamin (- S9), %KM; % Kalan mutajenite,
*** P < 0.001, Dunnett test.

Çizelge 3.6. *Salmonella typhimurium* TA100 suşunun S9'suz Ames antımutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz(μ g/ml)	Rev/plak	%KM
4-NFDA	1	1387.67 \pm 15.93	
Karvakrol + 4-NFDA	10+1	0	
	5+1	606.16 \pm 8.40 ***	43.68
	1+1	763.33 \pm 13.25 ***	55.00
	0.5+1	827.66 \pm 8.58 ***	59.64
	0.1+1	924.83 \pm 9.06 ***	66.64

4-NFDA; 4-nitro-o-fenilendiamin (- S9), %KM; % Kalan mutajenite,
*** P < 0.001, Dunnett test.

Çizelge 3.7. *Salmonella typhimurium* TA98 suşunun S9'lu Ames antimutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz(μ g/ml)	Rev/plak	%KM
2-AF	1	1888.66 \pm 55.54	
Karvakrol + 2-AF	10+1	0	
	5+1	347.00 \pm 46.05 ***	18.37
	1+1	498.83 \pm 38.60 ***	26.37
	0.5+1	554.83 \pm 32.28 ***	29.34
	0.1+1	657.66 \pm 36.87 ***	34.79

2-AF; 2-aminofloren (+ S9), %KM; % Kalan mutajenite.

*** P < 0.001, Dunnett test.

Çizelge 3.8. *Salmonella typhimurium* TA100 suşunun S9'lu Ames antimutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz(μ g/ml)	Rev/plak	%KM
2-AF	1	1250.33 \pm 50.55	
Karvakrol + 2-AF	10+1	0	
	5+1	131.16 \pm 21.16 ***	10.48
	1+1	179.50 \pm 27.70 ***	14.32
	0.5+1	183.66 \pm 17.42 ***	14.64
	0.1+1	648.16 \pm 42.54 ***	51.84

2-AF; 2-aminofloren (+ S9), %KM; % Kalan mutajenite.

*** P < 0.001, Dunnett test.

3.2. SCE

Çalışmada karvakrolün farklı dört konsantrasyonunun insan lenfosit hücresi kromozomlarında SCE frekansına etkilerinin *in vitro* şartlarda incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırma sonuçları Çizelge 10 ve 11’de gösterilmiştir. Çizelgeler Student’s *t*-test kullanılarak hazırlanmıştır. Gerek kontrol değerleri gerekse karvakrol ve Mitomisin C için verilmiş olan değerler 50’şer metafaz alanından elde edilen değerlerin ortalamasıdır. Metafaz alanlarındaki SCE görünümleri Şekil 3.1, 3.2, 3.3’de fotoğraflarda izlenebilir.

İnsan periferik lenfositleri üzerine *Origanum orites L.*’ den elde edilen karvakrol’ün mutajenik ve antimutajenik aktivasyonunu araştırmak için SCE testi yapılmıştır. İnsan lenfositlerindeki maddelerin mutajenikliğinin sonuçları Çizelge 10 ve 11’de gösterilmiştir. Karvakrol’ün kontrollerle karşılaştırılması için yapılan doz testlerinin hiçbirisinde, SCE’de önemli bir artış gözlenmemiştir. Buna karşın, çözücü kontrolü ile karşılaştırıldığında, en düşük dozdaki karvakrol ($p < 0.01$) SCE sayısını önemli miktarda indirmiştiir. Bu indirgeme Tablo 10’da da görüldüğü gibi, az da olsa doza bağlı bir davranıştır.

Karvakrol’ün olası antimutajenik etkisi aynı araştırmada mutajenikliğe sebep olan MMC ile açıklanmıştır. Antimutajenite testinin sonuçları Tablo 11’de doz, hücre başına düşen ortalama SCE sayısı ve mutajenik inhibisyon miktarı olarak verilmiştir. MMC kontrolüne göre kıyaslandığında karvakrol, güçlü ve doza bağlı olarak MMC’nin mutajenikliğini, kendi doz aralığındaki doğrusal artış ile düşük karvakrol konsantrasyonunda ortaya çıkan inhibisyondan düşük seviyeye indirir. İnhibisyon aralığı %79 ile %98 arasındadır. Yüksek doza karşı ($5 \mu\text{l ml}^{-1}$) inhibisyondaki düşüşün sebebi az da olsa karvakrol’ün toksikliğine bağlı olabilir.

Çizelge 3.9. Karvakrol eklenmiş insan lenfosit hücre kültürünün SCE mutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	Metafaz sayısı	SCE \pm SE / hücre
Kontrol (DMSO)	20.0	50	4.46 \pm 0.35
MMC	1.0	50	9.30 \pm 0.57
Karvakrol	5.0	50	3.96 \pm 0.38
Karvakrol	1.0	50	3.94 \pm 0.33
Karvakrol	0.5	50	3.64 \pm 0.32
Karvakrol	0.1	50	3.18 \pm 0.26*

DMSO: dimetilsülfoksit, solvent kontrol. Student t-test, *p<0.01.

MMC: mitomisin C, pozitif kontrol. SCE: sister chromatid exchange.

SE: standart hata.

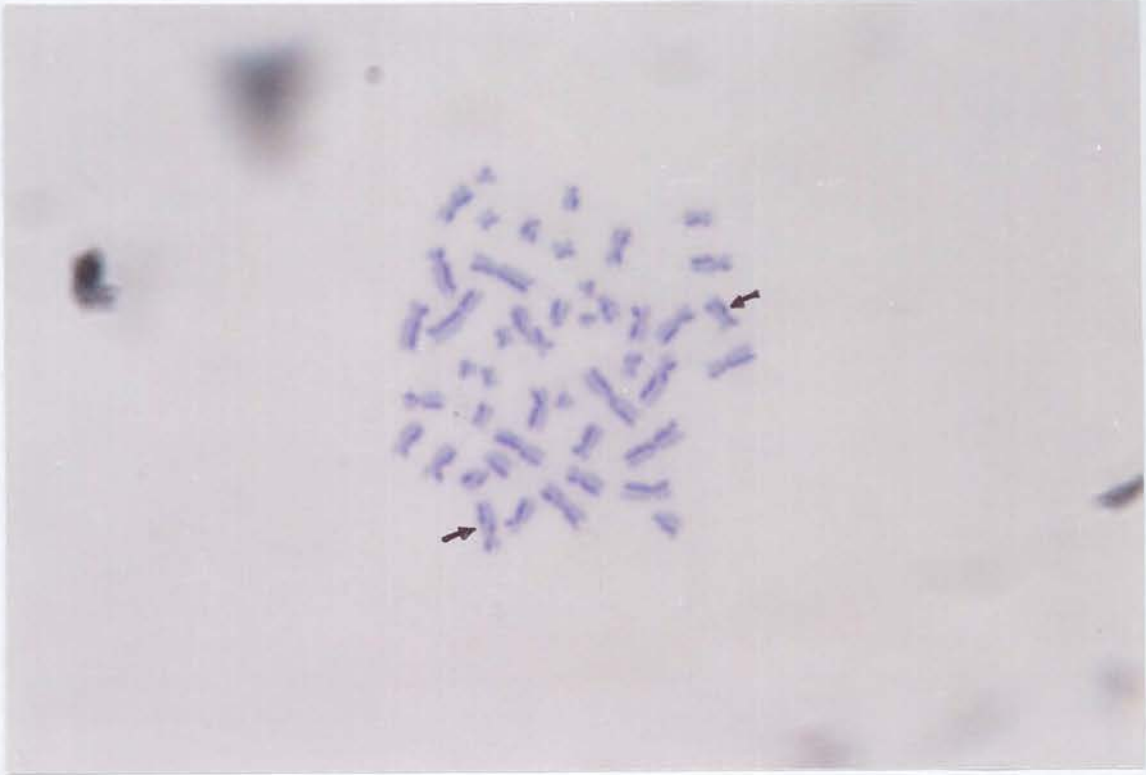
Çizelge 3.10. Karvakrol eklenmiş insan lenfosit hücre kültürünün SCE antimutajenite deneyinden elde edilen değerleri

Bileşim	Doz ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	Metafaz sayısı	SCE \pm SE / hücre	II %
Kontrol (DMSO)	20.0	50	4.46 \pm 0.35	
MMC	1.0	50	9.30 \pm 0.57	
Karvakrol+MMC	5.0	50	5.48 \pm 0.50 *	79.0
Karvakrol+MMC	1.0	50	5.20 \pm 0.45 *	84.8
Karvakrol+MMC	0.5	50	5.14 \pm 0.49 *	86.0
Karvakrol+MMC	0.1	50	4.53 \pm 0.35 *	98.6

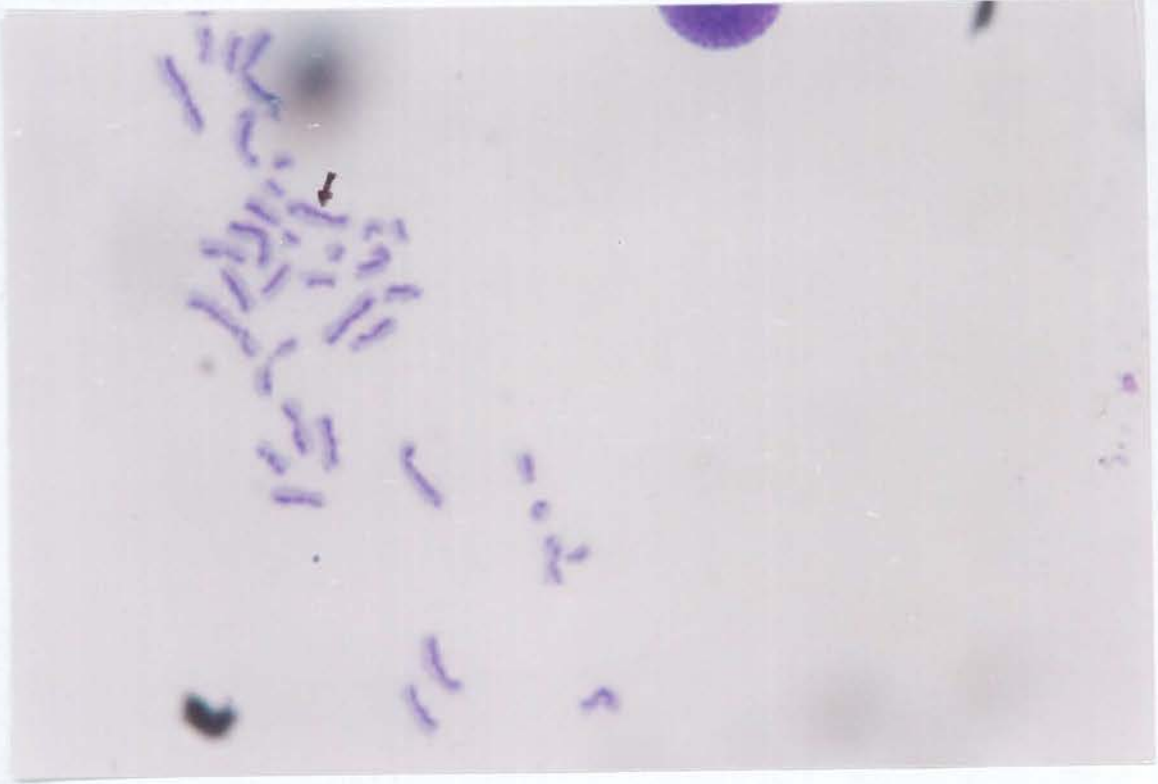
DMSO: dimetilsülfoksit, solvent kontrol. Student t-test, *p<0.01.

MMC: mitomisin C, pozitif kontrol. SCE: sister chromatid exchange.

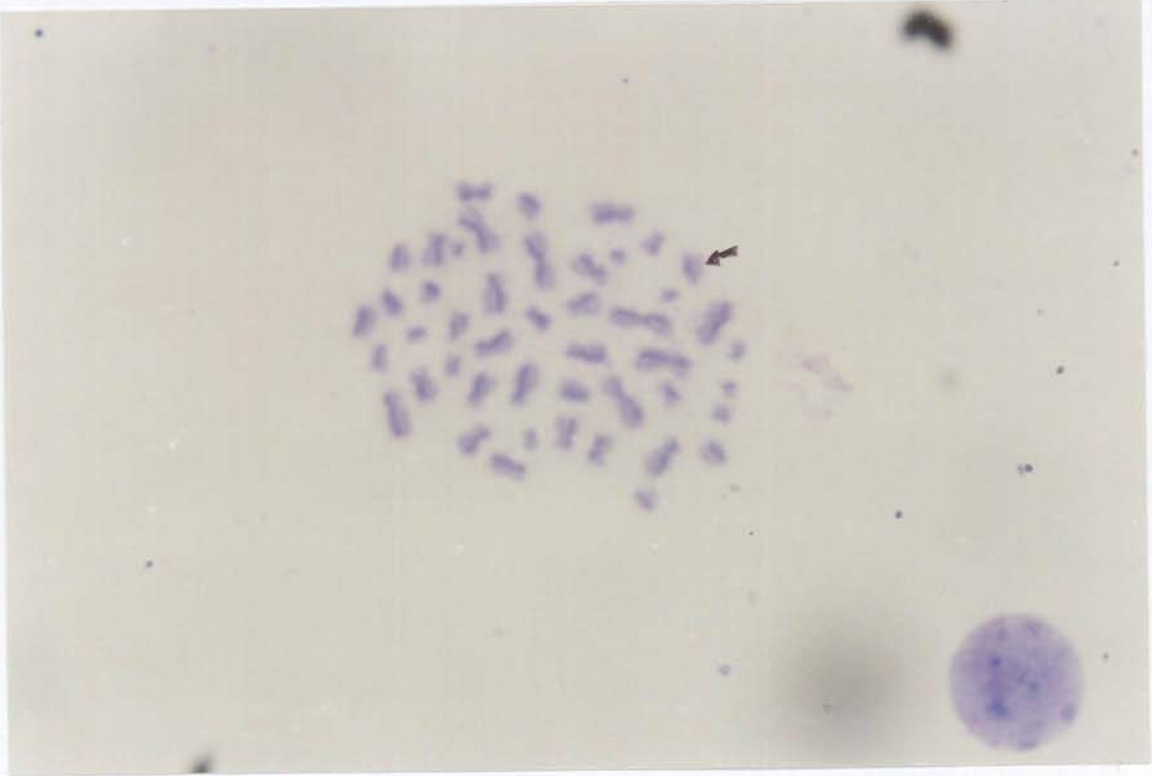
SE: standart hata. II: inhibitör indeksi.



Şekil 3.1. Spontan hücrelerden bir metafaz örneği (x100)



Şekil.3.2. 5µl/ml dozluk karvakrol eklenmiş hücrelerden bir metafaz örneği (X100)



Şekil 3.3. 1µl/ml dozluk karvakrol eklenmiş hücrelerden bir metafaz örneği (X100).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genetik hastalıklarda ve özellikle kanserde çevresel faktörler önemli olup, maruz kalınan genotoksik ajanların ortaya çıkarılması gelişen teknolojiyle daha da önem kazanmıştır. Günümüzde, bunun için çok çeşitli, basit, hızlı, ucuz ve etkili mutajenite testlerinin geliştirildiği ve yaygın olarak laboratuvarlarda kullanıldığı görülmektedir. Bu testlerin arasından en yaygın olarak kullanılanlardan ikisi Ames/Salmonella/Mikrozom ve SCE testleridir.

Bu çalışmamızda, iki farklı test sistemi kullandık. Bunlardan Ames testi bakteriler üzerinde, SCE ise insan kromozomları üzerinde sonuçlar vermiştir. Her iki test sisteminde de bulunan mutasyon sistemleri birbirinden farklıdır. Bu şekilde çalışmamızı daha geniş alanda sürdürmüş olduk.

Karvakrol insan yiyeceklerinin içinde tatlandırıcı olarak düşük konsantrasyonlarda bulunur. Farklı uygulamalarda yüksek dozlarda kullanıldığında ise karvakrol'un olası toksik özelliği önemi kavranmaktadır. Farenin ağız yolu (oral) LD₅₀ değeri ve Hep-2 hücreleri içindeki IC₅₀ değerleri karvakrol için hesaplandığında sırasıyla 810 mg kg⁻¹ ve 0,32 mM bulunmuştur (Jenner ve ark., 1964).

Çalışmamızda parametreleri açısından iyi test edilmiş olan Salmonella/Mutajenite ve SCE testleri ile karvakrol'un mutajenik ve antimutajenik potansiyellerini ölçmeye çalıştık.

Origanum yağı ile yapılan çalışmalarda, yağın antimutajenik etkisinin içeriğinde bulunan thymoquinone, tymol ve karvakrol gibi bileşenlerinin varlığına bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (Başer ve ark., 1993; Milos ve ark., 2000; Daferera ve ark., 2003). Bu bileşenlerin genotoksitesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Thymoquinone'nin ise antitümör ve hepatokoruyucu aktiviteleri rapor edilmiştir (Daba ve Abdelrahem, 1995; Worthen ve ark., 1998; Badary, 1999). Bu çalışmada incelenen karvakrol'ünde genotoksik aktivitesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Hem DNA-tamir hemde Ames testlerinde karvakrol'ün genotoksik potansiyelinin çok zayıf olduğu rapor edilmesine rağmen, Hep-2 hücrelerinde fragmentasyona sebep olmuştur (Stammati ve ark., 1999). Söz konusu çalışmada, Ames testinin zayıf pozitif sonucu sadece metabolik

konusu çalışmada, Ames testinin zayıf pozitif sonucu sadece metabolik aktivasyondan bağımsız olarak, Salmonella'nın TA100 zinciri için incelenmiştir. Diğer taraftan karvakrol' ün *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde antitümörejenik etkisi bulunmuştur (Zeytinoğlu ve ark., 1998; He ve ark., 1997). Bu da bulgularımızı desteklemektedir. Bu birkaç antitümörejenik aktivite çalışması dışında karvakrol' ün antimutajenik aktivitesi ile ilgili daha önce hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Bu sonuçlar, karvakrol' ün değişik çalışmalardan elde edilen antitümörejenik etkisini destekleyen güçlü antimutajenik etkisi olduğunu göstermektedir (Zeytinoğlu ve ark., 1998; He ve ark., 1997). Aeshbach ve arkadaşlarının (1994) rapor ettiği gibi bu antimutajenik aktivite mekanizması, onun kendi antioksidan doğasından kaynaklanabilir.

Aynı zamanda, Ultee ve arkadaşlarının (2002) önerdiği gibi, antimutajenik aktivasyonlar, iyon kanallarına sızabilme ve membran lipidlerini değiştirebilme yeteneğine de bağlı olabilir.

Ames deneyinde kullanılan her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar, ya DNA daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri yada bir bazın eklenmesi veya çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Test edilen bileşiğin neden olduğu mutasyonun mekanizması, moleküler düzeyde bu suşlarla gösterilebilir. SCE' nin DNA sentezi sırasında, birbirine yakın olarak replike olan replikasyon çatallarındaki iplik kırılmalarıyla oluştuğu fikri desteklenmektedir (Tucker ve ark., 1993). Bu yüzden farklı mutasyonları kapsayan, daha farklı yöntemlerle belki daha farklı sonuçlar elde edilecektir. Dolayısıyla bu durum, daha çok *in vitro* antioksidan çalışmaları ve diğer bağlantılı çalışmalarla da daha fazla desteklenmelidir.

SCE deneyinde 10 µl ml⁻¹ lik doz ile yapılan testte, karvakrol' ün lenfositte karşı toksik etki gösterdiği sonucuna varılmış ve düşük düzeyde mutajenikliğin azalmasının antimutajenik doğasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Metaboliklerin aktivasyonu için gerekli olan P450 veya S9 gibi metabolik enzim eksikliği içerisinde gerçekleşen tüm araştırmalara rağmen, gelecekteki çalışmalar promutajenlerin üzerindeki karvakrol etkisini açığa çıkaracak metabolik aktivasyon varlığı içerisinde devam edilecektir.

Bütün bu sonuçlar hem besinlerde hem de çeşitli ürünlerde bulunan karvakrol' ün kullanımının güvenli olduğunu sonuçlarda göstermektedir. Karvakrolün antimutajenik etkisi, insan sağlığını genotoksik ajanlara karşı korumadaki yeteneği gösteren önemli bir özelliktir. Karvakrol' ün kanseri önleyici bir ajan olarak kullanılması için çalışmalar genişletilerek insan kullanımına sunulması gerekmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. ABACIOĞLU N., ONURSAL E., HATUNOĞLU K. ve ABACIOĞLU H., *Türkiye Tıbbi İlaç Rehberi: Palme Yayıncılık Ankara*, **324**, 598-599 (1998).
2. AESCHBACH R., LOLIGER J., SCOTT B.C., MURCIA A., BUTLER J., HALLIWELL B. ve ARUOMA O.I., *Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingeron and hydroxytyrosol: Food.Chem.Toxicol.*, **32**, 31-36 (1994).
3. AGARWAL I. ve MATHELA C.S., *Study of antifungal activity of some terpenoids: Indian Drugs Pharm Ind.*, **14**, 19-21 (1979).
4. A.K. GIRI, *The genetic toxicology of parasetamol and aspirin a review: Mutat Res.*, **296**, 199-210 (1993).
5. AMES B.N., MC. CANN. ve J., YAMASAKI, E., *Methods for Detecting Carcinogenes and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test: Mutat.Res.* **31**, 347-367 (1975).
6. ARÇE G., VINCENT D., CUNNINGHAM M., CHOY W. ve SARRIF A., *In vitro and in vivo genotoxicity of 1,3-butadine and metabilie: Environment Health Perspective*, **86**, 75-8 (1990).
7. ARROYO-GOMEZ S., DIAZ-SANCHEZ Y., ANGEL-MENESES M., VILLALOBOS-PIETRINI R. ve LEON-RODRIGUEZ J.D., *Cytogenic Biomonitoring in a Mexican Floriculture Worker Group Exposed to Pesticides: Mutat.Res.*, **466**, 117-124 (2000).
8. ASLAM M. ve RAHMAN Q., *Cytotoxic and genotoxic effects of calcium silicates on human lymphocytes in vitro: Mutat Res.*, **300**, 45-48 (1993).
9. AYDIN S., ÖZTÜRK Y., BEİS R. ve BASER KHC., *Investigation origanum onites, Sideritis congesta and Satureja cuneifolia essential oils for analgesic activity: Phytother. Res.*, **10**, 342 (1996).
10. AYDIN S., BAŞER K.H.C. ve ÖZTÜRK Y., *The chemistry and paharmacology of origanum water, Proceeding of the 27th International Symposium on Essential Oils, September 8-11, 1996, Vienna, Austria*, Eds. Franz Ch., Mathe A., Buchbauer G., Carol Stream, 52-60 (1997).
11. BAÇCHI A., BONARDI A., CARCELLI M., MAZZA P., PELAGATTI P., PELIZZI G., SOLINAS C. ve ZANI F., *Organotin Complex with Pyrole-2,5-dicarboxaldehyde bis (acylhydrazones): J-Inorg-Biochem. Feb*, **1; 69**, (1-2), 101-12 (1998).
12. BAĞCI H., *Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları, Ortadoğu Teknik Üniversitesi*, 25-55 (1985).
13. BADARY O.A., *Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice: J. Ethnopharmacol.*, **67**, 135-142 (1999).
14. BAŞER K. H. C., ÖZEK T., TÜMEN G. ve SEZİK E., *Composition of the essential oils of Turkish Origanium species with commercial importance: J. Essent. Oil Res.*, **5**, 619-623 (1993).
15. BEEK B. ve OBE G., *Sister Chromatid Exchanges in human Leucocyte Chromosomes; Spontaneous and Induced Frequencies in Early and Late-Proliferating Cells in vitro: Hum Genet.*, **49**, 51-61 (1990).

16. BRESOLIN, S. ve VARGAS, V.M.F., *Phytotherapy Res.*, **7**, 260-262 (1993).
17. BRIAN J.D. ve NATALIE D., *Assays for the detection of Chromosome damage in cultured mammalian cells: Mutagenite Testing.*, (1990).
18. BROOKS T.M., PRISTON R.A., WRIGHT A.S. ve WATSON W.P., *Mutagenesis*, **10(5)**, 409-415 (1995).
19. BUDAVARI S., J. O'NEIL K., SMITH A. ve HECKELMAN A., *The Merck Index, 11th Edition, Merck and Co., Inc., N.J., USA* (1989).
20. BUKVIC N., GENTILE M., SUSCA F., FARELLI M., SERIO G., BUANADONNA L., CARURSO A. ve GUANTI G, *Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians: Mutat.Res.*, **498**, 159-167 (2001).
21. CACCIONI D., *Inhibition of fungus germination and growth by essential oil components, 23rd International Symposium on Essential Oils, September 9-12, 1992. Scottish Agricultural College, Auchincruive Ayr, Scotland, B-P49* (1992).
22. CARRONA A.V. ve NATARAJAN A.T., *Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques: Mutat Res.*, **204**, 7-406 (1988).
23. CASE G.L., HE, L., MO, H. ve ELSON C.E., *Induction of geranyl pyrophosphate pyrophosphatase activity by cholesterol suppressive isoprenoids: Lipids*, **30**, 357-359 (1995).
24. CHANG C., HSIA S., STONER G. ve HSU I., *Acrylonitrile-induced SCE and DNA single-strand breaks in adult human bronchial epithelial cells: Mutat Res.*, **241**, 355-360 (1990).
25. COZZI R., NICOLAI M., PERTICONE P., DE SALVIA R. ve SPUNTARELLI F., *Desmutagenic activity of natural humic acids; inhibition of mitomycin C and malcic hydrazide mutagenicity: Mutat. Res.*, **299**, 37-44 (1993).
26. DABA M. H. ve ABDELRAHMAN M. S., *Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes: Toxicol. Lett.*, **95**, 23-29 (1998).
27. DAFERERA D. J., ZIOGAS B. N. ve POLISSIOU M. G., *The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. And Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis: Crop Protection* **22**, 39-44 (2003).
28. DARNELL J. E., LODISH H. F. ve BALTIMORE D., *Growing and manipulating cells and in Molecular Cell Biology: Scientific American Books-Freeman and Company* 151-188 (1990).
29. DIDRY N., DUBREUIL L. ve PINKAS M., *Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria: Pharm. Acta Helv.*, **69(1)**, 25 (1994).
30. FERRARI M. DE, ARTUSO M., BONASSI S., BONATTI S., CAVALIERI W., PESCATORE D., MARCHINI E., PINOSA V. ve ABBONDANDOLA A., *Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: Mutat Res.*, **260**, 105-113 (1991).
31. FRESHNEY R.I., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique: Wiley-Liss, Inc.* (1994).
32. FORMAN D. ve AMES B., *The Ames Test and Causes of Cancer reprinted: British Medical Journal.*, **303**, 428-429 (1991).

33. FUCIC A., HORVAT D. ve DIMITROVIC B., *Mutagenicity of vinyl chloride in man: comparasion of chromosome aberrations with micronucleus and SCE freqencies: Mutat.Res.*, **242**, 265-270 (1990).
34. GASIOROWSKI K., BROKOS B., SZYBA K. ve LESZEK J., *Antimutagenic activity of fluphenazine in short-term tests: Mutagenesis*, **16(1)**, 31-38 (2001).
35. GENNART J PH., BALEUX C., VERELLEN-DUMOULIN CH., BUCHET J.P., MEYER R. DE. ve LAUWERYS R., *Increased SCE and tumor markers in workers e.pposed to elemental chromium, cobalt and nickel containing dusts: Mutat Res.*, **299**, 55-61 (1993).
36. GHOSH A., CHAKRAVERTI D. ve ADHIKARI P.C. *Action of tymol, carvacrol and p-cymene on the synthesis of macromolecules of V. Parahaemolyticus and V. Chlorare: J.Inst.Chem.*, **58**, 101-102 (1986).
37. GIRI A.K., DAS M., REDDY V.G. ve PALL A.K., *Mutagenic and genotoxic effects of theophylline and theobromine in Salmonella assay and in vivo sister chromatid exchanges in bone marrow cells of mice: Mutat. Res.*, **444**, 17-23 (1999).
38. GUENTHER E. ve ROBERT E.K., *The Essentials Oils Publishing Co.*, **2**, 503-505 (1975).
39. HE L., MO H., HADISUSILO S., QERESHI A.A. ve ELSON C. E., *Isoprenoids suppress the growth of murine B 16 melanomas in vitro and in vivo: J. Nutr.*, **127(5)**, 668-674 (1997).
40. HIRSCH-B., *SCE are preferentially induced at expressed and nonexpressed common fragile sites: Hum. Genet.*, **83(3)**, 302-306 (1991).
41. HONGSLO J., BRGER A., BJRGE C. ve HOLME J., *Increased frequensy of SCE and chromatid breaks in Lymphocytes aftertreatment of human volunteers with therapeutic doses of paracetamol: Mutat Res.*, **261**, 1-8 (1991).
42. HOO J. ve PARSLow M., *Relation Between the SCE Points and the Replication Bands: Chromosoma* **73**, 68-73 (1979).
43. HOWEL R.T., *Sister chromatid exchange evaluation as an aid to the diagnosis and exclusion of Fanconis anamia by induced chromosome damage analysis: J. Med. Genet.*, **28**, 468-471 (1991).
44. VON DER HUDE W., CARSTENSEN S., GURTLER R. ve OBE G., *Structure activity relationships of epoxides: Induction of sister chromatid exchanges in V 79 cells by enantiomeric epoxides: Mutat. Res.*, **278**, 289-297 (1992).
45. INOE K. ve KOSUGI K., *Insecticides containing cedar oil or its components for clothes: Ikari pharmaceuticals*, 175,914 (1989).
46. JANSSON K., MAKI-PAAKKANEN J., VAITTINEN S., VARTIAINEN T., KOMULAINEN H. ve TUOMISTO J., *Cytogenetic effects of 3-choloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (mx) in rat peripheral Lymphocytes in vitro and in vivo: Mutat Res.*, **229**, 25-28 (1993).
47. JENNER PM., HAGAN EC., TAYLOR JM., COOK EL. ve FITZHUNG OG., *Food flavourings and compounds of related structure. 1.Acute oral toxicity: Food and Cosmetics Toxicology*, **2**, 327-343 (1964).
48. KARL T. K., JOHN K. W., FREDERIC F.L., EDWARD L.B. ve JR. JOHN B.L., *Effects of Cigarette Smoking and Solvent Exposure on SCE*

- frequency in Painters: Enviromental and Molecular Mutagenesis.*,11, 389-399 (1988).
49. KARL T.K., THOMAS J.S., KATHERINE H., RICHARD L. ve JOHN B. L., *SCE in Lymphocytes from styrene-exposed boat builders: Mutat Res.*, **241**, 215-221 (1990).
 50. KASSIE F., LAKY B., NOBIS E., KUNDI M. ve KNASMÜLLER S., *Genotoxic effects of methyl isothiocyanate: Mutat.Res.*, **490**, 1-9 (2001).
 51. KATSIFIS S.P., KINNEY P.L., HOSSELET S., BURNS F.J. ve CHRISTIE N.T., *Interaction of nickel with mutagens in the induction of SCE in human lymphocytes: Mutat. Res.*, **359**, 7-15 (1996).
 52. KAUR I.P. ve SAINI A., *Sesamol exhibits antimutagenic activity aganist oxygens species mediated mutagenicity: Mutat.Res.*, **470**, 71-76 (2000).
 53. KLIGERMAN A.D., EREXON G.L. ve WILMER J.L., *Induction of sister chromatid exchange (SCE) and Cell-cycle inhibition in mouse peripheral blood B Lymphocytes exposed to mutagenic carcinogens in vivo: Mutat.Res.*, **157**, 181-187 (1985).
 54. KRİMER N., BASER KHC. ve TÜMEN G., *Carvacrol rich plants in Turkey: Chem. Nt. Compounds* 37 (1995).
 55. LAHDETIE J., ENGSTRÖM K., HUSGAF K., PURSIANIEN L., NYLUND L., VAINIO H. ve ASAORSA M., *Maternal smoking induced cotinine Levels and genotoxicity in second trimester amniotic fluid: Mutat Res.*, **300**, 37-43 (1993).
 56. LATT S. A., ALLEN J., BLOOM S. E., CARRANO A., FALKE E., KRAM D., SCHNEIDER E., SCHRECK R., TICE R., WHITFIELD B. ve WOLFF S., *Sister chromatid exchanges: a report of gene-tox program: Mutat. Res.*, **87**, 17-62 (1981).
 57. LEE H., BIAN S.S. ve CHEN Y.L., *Genotoxicity of 1,3-dithiane and 1,4-dithiane in the CHO/SCE Assay and the Salmonella/Microsomal Test: Mutat Res.*, **312**, 213-218 (1994).
 58. LENGHA R.E., *The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety Data, Volume I-II: Sigma-Aldrich Corporation* (1988).
 59. LEUNG H., *Evaluation of the genotoxic potential of alkyleneamines: Mutat Res.*, **320**, 31-43 (1994).
 60. LUKUSA T., MEULEPAS E., FRYNS J.P., VAN-DEN-BERGHE H. ve CASSIMAN J.J., *Nosignificant increase in spontanous and ethly methane sulfonate-induced SCE at the Xq27.3 fragile site: Cancer-Genet-Cytogenet.* **1**, 49(1)87-99 (1990).
 61. LUKUSA T., MEULEPAS E., FRYNS J.P., VAN-DEN-BERGHE H. ve CASSIMAN J.J., *Spontaneous I-RA IGB is a hot spot for SCE: Hum-Genet.*, **87(5)**, 583-586 (1991).
 62. LÜLECİ G., BAŞARAN S., BAĞCI G. ve KESER İ. *Sitogenetik Uygulama Yöntemleri* (1990).
 63. MARON D.M. ve AMES B.N., *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test: Mutat Res.*, **113**, 173-215 (1983).
 64. MILLER K., *SCE in human B and T Lymphocytes exposit to bleomycin, cyclophosphamide and ethylmethanesulfonate: Mutat Res.*, **247(1)**, 175-182 (1991).
 65. MILOS M., MASTELIC J. ve JERKOVIC I., *Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from*

- oregano (Origanum vulgare L. Ssp. Hirtum): Food Chem.*, **71**, 79-83 (2000).
66. MONARCA S., FERETTI D., ZANARDINI A., MORETTI M., VILLARINI M., SPIEGELHALDER B., ZERBINI I., GELATTI U. ve LEBBOLO E., *Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses: Mutat. Res.*, **490**, 159-169 (2001).
 67. MORALES-RAMIREZ P., MADRIGAL-BUJAJIDAR E., MERCADER-MARTINEZ J., CASSANI M., GONZALE G., CHAMARO-CEVAILOS G. ve SALAZAR-JACOBO M., *Sister chromatid exchange induction produced by in vivo and in vitro exposure to alpha-asarone: Mutat. Res.*, **279**, 269-273 (1992).
 68. MORALES-RAMIREZ P. ve GARCIA-RODRIGUEZ M.C., *In vivo effect of chlorophyllin on ray induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells: Mutat. Res.*, **320**, 329-334 (1994).
 69. MOSESSO P. ve PALITTI F., *The genetic toxicology of 6-mercaptopurine: Mutat Res.*, **296**, 279-294 (1993).
 70. MOTYKIEWICZ G., MICHALSKA J., PENDZICH J., PERERA F.P. ve CHORAZY M., *Acytogenetic study of men environmentally and occupationally exposed to airborne pollutants: Mutat Res.*, **280**, 253-259 (1992).
 71. MUSILOVA J., MICHALOVA K. ve HOFFMANOVA H., *Increased satellite association induced by BrdU treatment of Phytohemagglutinin-stimulated blood Lymphocytes: Hum. Genet.*, **65**, 91-93 (1983).
 72. ORTIZ A.I., POLLASTRINI M.T., BAREA M. ve ORDONEZ D., *Mutagenesis*, **10(5),11(5)** 27-31 (1996).
 73. OVERNIK E., HELLMOLD H., BRANTING C. ve GUSTAFSSON J. A., *Princess Takamatsu Symp.* **123**, 23-33 (1995):
 74. PADMA P.R., AMONKAR A.J. ve BHIDE S.V., *Antimutagenic Effects of Betel Leaf Extract Against the Mutagenicity of two Tobacco-specific N-nitrosamines: Mutagenesis, Vol.4 No:2*, 154-156 (1989).
 75. PARK J.H., LEE B.J., KIM K., LEE K.H., CHE J.H., K ANG K.S. ve LEE Y.S., *Genotoxicity of Drinking Water from Three Korean Cities: Mutat. Res.*, **460**, 173-178 (2000).
 76. PERRY P. ve WOLF S., *New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids: Nature*, **251**, 158-165 (1974).
 77. PERRY P. ve THOMSON E. J., *Methodology of Sister Chromatid Exchanges in handbook of Mutagenicity Test Procedures ed. By Kilbey b. J., Nichols W. and Ramel C: Elsevier Science Publisher. Bv*, 487-529 (1984).
 78. RICE PJ. ve COATS JR., *Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae): J. Econ. Entomol.*, **87(5)**, 1172 (1994).
 79. RIVAS-OLMEDO G., DIAZ BARRIGA-ARCEO S. ve MADRIGAL-BUJAJIDAR E., *Inhibition of mitomycin C-induced SCE by vitamin C in vivo: Journal of Toxicology and Environmental Health.*, **35**, 107-113 (1992).

80. SAHU R.K., KATSIFIS S.P., KINNEY P.L. ve CHRISTINE N.T., *Effects of nickel sulfate, lead sulfate and sodium arsenite alone and with UV light on sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes: Mol. Toxicol.*, **2(2)**, 129-136 (1989).
81. SANTANA-RIOS G., ORNER G., AMANTANA A., PROVOST C., WU S.Y. ve DASHWOOD R.H., *Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in salmonella assay: Mutat. Res.*, **495**, 61-74 (2001).
82. SASIADEK M., NORPPA H. ve SORSA M., *1,3-Butadiene and it's epoxides induce SCE in human Lymphocytes in vitro: Mutat Res.*, **261**, 117-121 (1991).
83. SBRANA I., CARETTO S., RAINALDI G. ve LOPRIENO N., *Induction of chromosomal aberrations and SCE by chloramphenicol: Mutat. Res.*, **248(1)**, 145-153 (1991).
84. SCHIMMER U., KRUGER A., PAULINI H. ve HAEFELE F., *Pharmazine (German) 49(6)*, 448-451 (1994).
85. SCHWARZ K., ERNST H. ve TERNES W., *Evaluation of antioxidative constituents from Thyme: J. Sci. Food Agric.*, **70**, 217-223 (1996).
86. SINUES B., BROTO A., SUARES M.A., DUCE F., MARTINEZ-BERGANZE A. ve BERNAL M.N., *Cytogenetic study in peripheral Lymphocytes from asthmatic patients receiving continued with theophylline: Mutat Res.*, **280**, 271-277 (1992).
87. SIPI P., JARVENTAUS H. ve NORPPA H., *Sister chromatid exchanges induced by vinyl esters and respective carboxylic acids in cultured human lymphocytes: Mutat. Res.*, **272**, 75-82 (1992).
88. SIVROPOULOI A., PAPANIKOLAOU E., NIKOLAU C., KOKKINI S., LANARAS T. ve ARSENAKIS M., *Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils: J. Agric Food Chem.*, **44**, 1202-1205 (1996).
89. STAMMATIA A., BONSA P., ZUCCOB F., MOEZELAARC R., ALAKOMID H-L. ve VON WRIGHTD A., *Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term: Food Chem. Toxicol.*, **37(8)**, 813-823 (1999).
90. STAVRIC B., MATULA T.I., KLASSEN R. ve DOWNIE R.H., *Food Chem. Toxicol.*, **34(6)**, 515-523 (1996).
91. STREFFER C., *Chromosomal damage in preimplantation mouse embriyos and it's development through the cell cycle: Mutat Res.*, **299**, 313-315 (1993).
92. SUZANNE M. MORRIS., *The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells: Mutat. Res.*, **258**, 161-188 (1991).
93. TANKER M. ve SEZİK E., *Bitkilerin Kanser Tedavisindeki Yeri ve Nerium oleander Semineri: VI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildirileri, Ankara 17* (1998).
94. TIBORI A. G., *Nasal spray: Intreprenderea de Medicamente*, **67**, 352 (1979).
95. TUCKER J., AULETTA A., CIMINO M., DEARFIELD K., JACOBSON-KRAM D., TICE R. ve CARRONA A., *SCE Second Report of the Genetox Program: Mutat Res.*, 101-180 (1993).

96. UENOBE, F., NAKAMURA, S.I. ve MIYAZAWA, M., *Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1: Mutat.Res.*, **373**, 197-200 (1997).
97. ULTEE A., BENNIK M. H. I. ve MOEZELAAR R., *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus: Appl. Environ. Microb.*, **68(4)**, 1561-1568 (2002).
98. VAHL H.H., KARBE L. ve WESTENDORF J., *Genotoxicity Assessment of Suspended Particulate Matter in the Elbe River: Comparison of Salmonella Microsome test, Arabinose Resistance test, and Umu-test: Mutat.Res.*, **Nov. 27, 394 (1-3)**, 81-93 (1997).
99. VARGAS V.M., MOTTA V.E. ve HENRIQUES J.A., *Mutat Res.*, **319**, (1):31-45 (1993).
100. VIKSE R., KLUNGSCYR L. ve GRIVAS S., *Mutagenic Activity of Three Synthetic Isomers of the Food Carcinogen 2-Amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ) in the Ames Tes.: Mutat.Res.*, **319**, 273-278 (1993).
101. WAGNER H., WIERER M. ve BAUER R., *In vitro inhibition of prostaglandin biosynthesis by essential oils and phenolic compounds: Planta Med.*, **3**, 184-187 (1986).
102. WALL M.E., TAYLOR H. ve WANI M.C., *Journal Natural Produce.*, **50(4)**, 764 (1987).
103. WANG C.K., SU H.Y. ve LIU C.K., *Chemical Composition and Toxicity of Tawanese Betel Quid Extract: Food-Chem-Toxicol. Feb-Mar*; **37 (2-3)**, 135-44 (1999).
104. WILSON R., RAU D. ve BLOOMFIELD V., *Comparison of polyelectrolyte theories of the binding of cations to DNA: Biophys*, **30**, 347-326 (1980).
105. WORTHEN D. R., GHOSHEH O. A. ve CROOKS P. A., *The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed Nigella sativa L. : Anticancer Res.*, **18**, 1527-1532 (1998).
106. WULF H.C., *Monitoring of genotoxic exposure of humans by the sister chromatid exchange test: Danish Medical Bulletin*, **37**, 132-143 (1990).
107. XING W. ve ZHANG Z., *A comparison of SCE test in human lymphocytes and Vicia faba: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens: Mutat. Res.*, **241**, 109-113 (1990).
108. YANG W.F., TSAI F.J., KUO H.W., WU W.Y., WANG R.Y. ve LAI J.S., *Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds: Mutat.Res.*, **464**, 289-296 (2000).
109. ZEYTİNOĞLU M., AYDIN S., ÖZTÜRK Y. ve BASER KHC., *Inhibitory effects of carvacrol on DMBA induced pulmonary tumorigenesis in rats: Acta Pharmaceutica Turcica*, **XXX (2)**, 93 (1998).
110. ZEYTİNOĞLU H., İNCESU Z. ve BAŞER K. H. C., *The inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-ras oncogene: Phytomedicine*, **10(4)**, 292-299 (2003).
111. ZHAN Z. ve YANG J., *Effects of amino acids on sister chromatid exchanges: Mutat Res.*, **280**, 69-73 (1992).
112. ZHANG Z., YANG J., ZHANG Q. ve CAO X., *Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potential mutagenic agents: Mutat Res.*, **261**, 69-73 (1991).

113. ZHONG B.-Z., GU Z.-W., WALLANCE W.E., WHONG W.-Z. ve ONG T., *Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster, V 79 cells: Mutat Res.*, **321**, 35-42 (1994).

6. EKLER

6.1. Ames deneyinde kullanılan materyallerin hazırlanışı

Aşağıda Ames/Marön test yöntemine göre hazırlanan çözelti ve ortamlar verilmiştir.

(50X) Vogel Bonner Medium

Kullanımı: MGA ve HBA (master) plakları

MgSO ₄ .7H ₂ O:	10gr
Sitrikasit monohidrat:	100 gr
K ₂ HPO ₄ :	500 gr
NaH ₂ NH ₄ (PO ₄ .H ₂ O):	175 gr
Distile su (45°C):	670 ml

Bu maddeler sırasıyla suyun içerisine eklenir ve hacim 1 lt'ye tamamlanır. 1 lt'lik iki kaba bölüştürülerek 121°C de 20 dakika süreyle otoklav edilir.

(0,5 Mm) Histidin/Biotin Çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyi (100 ml Top agara 10 ml olarak)

D-Biotin (F.W: 247,3):	30,9 mg
L-Histidin HCL (F.W: 191.7):	24 mg
Distile su:	250 ml

Biotin şuyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür, daha sonra histidin ilave edilerek 121°C de otoklav edilir ve +4°C de saklanır.

(% 0,8/0,2 NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Kullanımı: Ampisiline direnç kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

Ampisilin trihidrat:	0,8 gr
0,02 M. NaOH:	100 ml

Ampisilin trihidrat, 0,02 M. NaOH içinde çözülür ve sterilizasyon için 0,22 µm Çaplı filtreden geçirilir. +4°C de saklanır.

(% 0,05) Kristal viyole

Kullanımı: Genotip (rfa) mutasyonu kontrolü.

Kristal viyole: 0,05 gr

Distile su: 100 ml

Boya ve su karıştırılarak çözelti hazırlanır. Solusyon ışık geçirmeyen bir kaba konup +4°C de saklanır.

Biotin Çözeltisi

Kullanımı: Genotip kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanması.

D-Biotin: 0,00065 mg

Distile su: 50 ml

Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve karışım 1,5 atm. basınçta 20 dakika otoklav edilir.

Histidin Çözeltisi

Kullanımı: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması.

L-Histidin.HCL (F.W.191.7): 0,125 gr

Distile su: 25 ml

Çözelti hazırlanıp, 20 dakika 1,5 atm. basınçta, 121°C de otoklav edilir.

(% 40) Glikoz Çözeltisi

Kullanımı: MGA ve HBA plaklarının hazırlanması

Glikoz: 80 gr

Distile su: 200 ml

Glikoz distile su içinde çözülür. Karışım 20 dakika 121°C de otoklav edilir, 0-4°C de saklanır.

(2 µg/µl) 2-Aminofluorelin (2AF)

Kullanımı: Pozitif kontrol

1,0 mg/petri başına olmak üzere dimetilsülfoksit (DMSO) de çözülerek kullanılır. S9 karışımı gerektiren kimyasaldır. 0-4°C de saklanır.

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

Kullanımı: S9 karışımı

NADP (F.W 765,4): 383 mg

(0,15M) KCL Çözeltisi

Kullanımı: Mikrozom izolasyonu

KCL: 11,275 gr

Distile su: 1000 ml

KCL, bir miktar distile suda çözülerek toplam hacim 1000 ml ye tamamlanır. Karışım 121°C de 20 dakika otoklav edilir ve +4°C de saklanır.

Top Agar (Üst Agar)

Kullanımı: Mutasyon deneyi

Agar: 6 gr

NaCl: 5 gr

Distile su: 1000 ml

Agar, su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılıp karıştırılarak çözülür. Karışım 121°C de 20 dakika otoklavda steril edilir. Oda sıcaklığında saklanır.

Histidin/Biotin Plakları (HB Agar)

Kullanımı: Histidin gereksinim kontrol deneyi.

Agar :	7,5 gr
% 40 Glikoz:	25 ml
50XVB Tuzları:	10 ml
Distile su:	457 ml
Steril Histidin HCL Çözeltisi:	5 ml
Steril Biotin Çözeltisi:	3 ml

Agar ve su karıştırılarak 121⁰C de 20 dakika otoklav edilir. Karışım önce 45⁰C ye soğutulup % 40 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir ve karıştırılır. Solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biotin eklenir ve karıştırılarak petri kutularına 20-25 ml olarak dağıtılır.

Histidin/Biotin/Ampisilin Plakları (HBA Agar)

Kullanımı: Ampisiline dirençlilik testi ve Master Plate hazırlanmasında kullanılır.

Agar:	7,5 gr
Distile su:	455 ml
50XVB Tuzları:	10 ml
% 40 Glikoz:	25 ml
Steril Histidin:	5 ml
Steril Biotin Çözeltisi:	3 ml
Steril Ampisilin Çözeltisi:	1,575 ml

Agar ve su karıştırılarak 121⁰C de 20 dakika otoklav edilir. Karışım 45⁰C ye soğutulup, % 40 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin bu solüsyona eklenip karıştırılır. Biraz daha soğuyunca biotin ve ampisilin eklenerek petrilere 20-25 ml olarak dağıtılır. Bu plaklarda bakteriler +4⁰C de 2 ay saklanabilir.

Minimal Glikoz Agar Plakları

Kullanımı: Mutasyon deneyi.

Agar:	7,5 gr
Distile su:	465 gr
50XVB Tuzları:	10 ml
% 40 Glikoz:	25 ml

Agar ve su 2 lt.lik bir kaptaki karıştırılıp çözülür ve 121⁰C de 20 dakika otoklav edilir. Karışım 45⁰C ye soğutulur, % 40 glikoz ve 50XVB tuzları eklenir. Petri kutularına 20-25 ml olarak dağıtılır.

Nutrient Agar Plakları

Kullanımı: Gecelik kültürün ml.sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolü için kullanılır.

a) Kristal viyole b) UV ye duyarlılığı

Oxoid nutrient broth no: 2:	12,5 gr
Agar:	7,5 gr
Distile su:	465 ml

Tüm maddeler 2 lt lik bir kaptaki karıştırılır ve 20 dakika 121⁰C de otoklav edilir. Karışım petri kutularına 20-25 ml olarak dağıtılır.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı

Kullanımı: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmelerinde kullanılır.

Oxoid nutrient broth no: 2:	3,75 gr
Distile su:	150 ml

Çözelti hazırlanıp 121⁰C de 20 dakika otoklav edilir. +4⁰C de saklanır.

S9 Karışımı

Ticari olarak alınan S9 tabletleri (1 tablet için) 14 ml distile suda çözülür. Üzerine 3 ml rat mikrozomu ilave edilir ve toplam hacim steril su ile 20 ml'ye tamamlanır. Bu karışım buz içinde (0-2⁰C) kullanıma kadar saklanır. Kullanılacağı zaman hazırlanıp hemen tüketilir.

6.2. SCE deneyinde kullanılan materyallerin hazırlanışı

Tampon A (100 ml)

KH_2PO_4 : 4,536 gr

KH_2PO_4 tartılıp, bir miktar distile suda çözülüp 100 ml. ye tamamlanır.

Tampon B (100 ml)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 5,932 gr

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ tartılıp, bir miktar distile suda çözülüp 100 ml'ye tamamlanır.

* Tampon A ve Tampon B oda sıcaklığında saklanır. Deneye başlamadan hazırlanır, hemen kullanılması gerekmez. Kullanılan distile suyun PH'ı 7 olmalıdır.

SSC (5X)

$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 11,05 gr

NaCl : 21,9 gr

Trisodyumsitrat ve sodyumklorürün her ikisinde ayrı ayrı kaplarda bir miktar distile su çözülür. Her ikisinde bir şişeye dökülür ve üzeri distile su ile 500 ml'ye tamamlanır. Bu stok 5XSSC dir. Bu stoktan 20 ml alınıp üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (1XSSC). Deneyde 1XSSC kullanılır. Buzdolabında saklanır.

KCl (% 0,4)

KCl: 0,4 gr

Bidistile su: 100 ml

KCl, bidistile su içerisinde çözülür. Buzdolabında saklanır.

Heparin (%0,1)

Serum fizyolojik (steril): 10 ml

Heparin: 0,01 gr

Heparin serum fizyolojik içerisinde çözülür. Buzdolabında saklanır.

İçine konulduğu şişenin etrafı ışık almaması için alüminyum folyo ile sarılır.

BrdU

BrdU: 0,0025 µg

Bidistile su: 5 ml

BrdU, bidistile suda çözülür. Hazırlanan BrdU 0,2 µm'lik membrandan geçirilir. Işık geçirmemesi için şişenin etrafı sarılır. Buzdolabında saklanır. 2,5 ml kromozom medyumuna toplam 25 µg BrdU konulması gerekir ve bu miktarın tercihen 50 µl içinde olması uygundur.

Cochicine (10 µg/ml)

Colchicine: 0,0024 gr

Bidistile su: 4 ml

Colchicine bidistile suda eritilir ve filtreden geçirilir. 5 µg/ml colchicine hazırlamak için 2 ml, 10 µg/ml'lik colchicine den alınır ve 2 ml bidistile su ile karıştırılır. Deneylerde 5 µg/ml'lik colchicine den kullanılmıştır. Buzdolabında saklanır. Mitoz arttırıcı özelliğindedir.

Fixatif

Methanol: 75 ml

Acetic acid glacial: 25 ml

Methanol ve acetic acid glacial karıştırılır. Bu karışım preparasyondan hemen önce hazırlanır ve buzdolabına koyulur.

Işınlama solüsyonu (Söransan buffer)

Tampon A: 5 ml

Tampon B: 5 ml

Distile su: 90 ml

Tampon A, Tampon B ve distile su karıştırılarak hazırlanır. Işınlama işlemi başlamadan önce hazırlanmalıdır.

Giemsa solüsyonu

Tampon A: 5 ml

Tampon B: 5 ml

Giemsa: 5 ml

Distile su: 85 ml

Tampon A, Tampon B, Giemsa ve distile su karıştırılır. Boya hazırlandıktan sonra dik bir şaleye filtre kağıdı ile süzülür. Yüzeyinde oluşan florasan tabaka filtre kağıdı ile alınır. Boyama işlemi başlamadan önce hazırlanır.

Deneyde kullanılan lamların hazırlanmaları

Temiz lamlar şale içine dizilir. Lamların üzerine 1N HNO₃ koyulur ve 24 saat bekletilir. 24 saat geçtikten sonra lamların üzerindeki HNO₃ dökülür. Şale yarım saat çeşme suyunun altında bekletilir. Sonra şaledeki lamlar 3 kez distile su ile yıkanır. Yıkama işlemi bittikten sonra şalenin içine distile su koyulur ve buzdolabında saklanır.