

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

**BAZI FLAVONOİDLERİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE  
ANTİGENOTOKSİK AKTİVİTESİ VE ANTİOKSİDAN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**EYLEM EROĞLU DOĞAN**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA  
TEMMUZ 2008**

Tezin Başlığı : **Bazı Flavonoidlerin *Drosophila melanogaster*'de Antigenotoksik Aktivitesi ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması**

Tezi Hazırlayan : **Eylem EROĞLU DOĞAN**

Sınav Tarihi : 18 Temmuz 2008

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Sınav Jürisi Üyeleri**

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

Mustafa Kemal Üniversitesi



Prof. Dr. Elif YEŞİLADA

İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Murat ÖZMEN

İnönü Üniversitesi



Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

İnönü Üniversitesi



Doç. Dr. Dilek ASMA

İnönü Üniversitesi



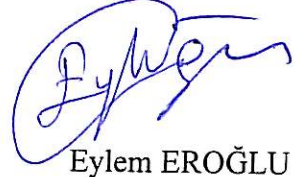
İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr.Ali ŞAHİN

Enstitü Müdürü

## Onur Sözü

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Bazı Flavonoidlerin *D.melanogaster*'de Antigenotoksik Aktivitesi ve Antioksidan Enzim Sistemleri Üzerine Etkisinin Araştırılması**”başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynaklar bölümünde yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.



Eylem EROĞLU DOĞAN

*Mutluluk Kaynağım Canım Kızım'a*

## ÖZET

Doktora Tezi

### BAZI FLAVONOİDLERİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE ANTİGENOTOKSİK AKTİVİTESİ VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Eylem EROĞLU DOĞAN

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

115+ ix sayfa

2008

Danışman: Prof. Dr. Elif YEŞİLADA

Sebze ve meyvelerde yüksek oranda bulunan flavonoidlerin çeşitli hastalıklardan korunmadaki katkıları nedeniyle genotoksik, antigenotoksik ve antioksidan etkilerinin bilinmesi önemlidir. Flavonoidlerin genotoksik ve antigenotoksik aktivitelerini belirlemek için çok çeşitli testler bulunmaktadır, ancak bunların arasından “*Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)” testinin hızlılık ve duyarlılık gibi bazı avantajları, onu, olası genotoksik ve antigenotoksik aktiviteleri saptamak için uygun bir test yapmaktadır.

Bu çalışmada mirisetin, luteolin, galangin ve resveratrol’ün genotoksik aktiviteleri ile MNU, SF ve MMC’e karşı antigenotoksik aktiviteleri standart çaprazın kanat imajinal hücrelerinde test edildi. Organizmanın antioksidan sistemi üzerine olan etkileri ise çeşitli flavonoid konsantrasyonlarına önceden maruz bırakılan larvalardan gelişen ergin erkek bireylerde araştırıldı. Genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmalarında trans-heterozigot bireylerin kanatları *mwh* ve/veya *flr* beneklerinin varlığı için mikroskop altında 400X büyütmeyle tarandı. Bu benekler, mitotik rekombinasyon ya da mutasyon (delesyon, nokta mutasyon, translokasyonun spesifik tipleri vs.) gibi farklı genotoksik olaylar nedeniyle olabilmektedir. Antigenotoksisite sonuçlarının değerlendirilmesinde mutajenlerin indüklediği benek sıklıklarının flavonoidler tarafından azaltılması dikkate alındı. Antioksidan sistem çalışmalarda ise ergin erkek bireylerin homojenatlarından elde edilen supernatanlarda redükte glutayon düzeyleri ile SOD, CAT, GR ve GST enzim aktiviteleri ölçüldü.

Sonuçlar, flavonoidlerin kullanılan tüm dozlarda genotoksisiteye ve organizmanın antioksidan savunma sistemi üzerinde önemli bir etkiye neden olmadıklarını, buna karşın mutajenlerin indüklediği benek sıklıklarını değişen oranlarda azaltarak antigenotoksik aktivite gösterdiklerini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, kanat benek testinin flavonoidlerin genotoksisite ve antigenotoksisitesini belirlemede uygun bir *in vivo* test olarak önerilebileceğini göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Mirisetin, Luteolin, Galangin, Resveratrol, *Drosophila melanogaster*, SMART, Genotoksisite, Antigenotoksisite, Antioksidan Sistem.

## ABSTRACT

PhD. Thesis

### ANTIGENOTOXIC ACTIVITY OF SOME FLAVONOIDS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* AND INVESTIGATION OF THEIR ANTIOXIDANT EFFECTS

Eylem EROĞLU DOĞAN

İnönü University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

115 + ix pages

2008

Supervisor: Prof. Elif YEŞİLADA (PhD)

It is important to know genotoxic, antigenotoxic and antioxidant effects of flavonoids found in vegetables and fruits at high levels due to their protective effects against different diseases. There is a great variety of different assays available to determine the genotoxic and antigenotoxic activities of flavonoids, but among them some advantages of *Drosophila* Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) such as fastness and sensitiveness, make it suitable for screening of probable genotoxic and antigenotoxic activities.

In this study, genotoxic activities of myricetin, luteolin, galangin and resveratrol, and their antigenotoxic activities against MNU, CP and MMC were tested in the wing imaginal cells of the standard cross. Their effects on the antioxidant system of the organism were investigated with the adult male flies developed from three day-old larvae which were exposed previously to different flavonoid concentrations. In the genotoxicity and antigenotoxicity studies, the wings of the trans-heterozygous flies were scored under 400X magnification for the presence of *mwh* and/or *flr* spots. These spots can be due to different genotoxic events such as mitotic recombination or mutation (deletion, point mutation, specific types of translocation, etc.). In the evaluation of antigenotoxic results, the decrease in mutagen induced spot frequencies by flavonoids taken into consideration. In the antioxidant system studies, reduced glutathione levels and SOD, CAT, GR and GST enzymes activities were measured using the supernatants obtained from the homogenates of adult male flies.

Results revealed that the flavonoids at all concentrations did not cause genotoxicity and any important effect on the antioxidant system of the organism, but displayed antigenotoxic activity by reducing the frequency of mutagen induced spots in varying proportions. These results indicate that wing spot test can be recommended as a suitable *in vivo* test for the determination of genotoxicity and antigenotoxicity of flavonoids.

KEYWORDS: Myricetin, Luteolin, Galangin, Resveratrol, *Drosophila melanogaster*, SMART, Genotoxicity, Antigenotoxicity, Antioxidant System

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgmeden beni yönlendiren, çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışma sürecinde karşılaşılan deneysel ve teorik sorunların çözümünde büyük emeği bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif YEŞİLADA'ya,

Tez çalışması süresince fikir ve önerileri ile yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e,

Enzim aktivite çalışmalarının hem deneysel hem de teorik aşamalarında yardım eden Sayın Doç. Dr. Dilek ASMA'ya,

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi arkadaşlarım Abbas GÜNGÖRDÜ ve Aygül KILIÇ'a,

Tezin deneysel ve yazılım aşamalarında bana destek olan değerli eşim Doğan DOĞAN'a ve istemeyerek ihmal ettiğim mutluluk kaynağım kızım Belinsu'ya,

Ayrıca, desteklerini hissettiğim tüm hocalarım ve arkadaşlarıma ve bu çalışmayı 2006/26 numaralı projeye destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na,

teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
	<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
	<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
	<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
	<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
	<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>1.</b>	<b>GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1.	Mirisetin .....	3
1.2.	Galangin.....	4
1.3.	Luteolin .....	5
1.4.	Resveratrol .....	6
1.5.	Genetik Toksikoloji ve Antigenotoksosite .....	8
1.6.	Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART).....	11
1.7.	Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi.....	15
1.7.1	Glutasyon (GSH).....	17
1.7.2	Süperoksit Dismutaz (SOD).....	18
1.7.3	Katalaz .....	20
1.7.4	Glutasyon Redüktaz (GR).....	20
1.7.5	Glutasyon S-Transferaz (GST).....	21
<b>2.</b>	<b>KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>23</b>
2.1.	<i>Drosophila</i> Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Yapılan Antigenotoksosite Çalışmaları .....	23
2.2.	<i>Drosophila</i> 'da Glutasyon ve Antioksidan Enzim Düzeyleri ile İlgili Olarak Yapılan Çalışmalar.....	26
2.3.	Flavonoidlerin Antigenotoksik ve Antioksidan Etkileri ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	28
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>32</b>
3.1	Kullanılan Organizma ile İlgili Genel Bilgiler .....	32
3.1.1	<i>Drosophila melanogaster</i> 'in Yaşam Döngüsü .....	33
3.2.	Kullanılan <i>Drosophila</i> Stoklarının Genetik Özellikleri .....	36
3.3.	Çalışmada Kullanılan Çapraz .....	36
3.4.	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	37
3.5.	Deney Koşulları .....	37
3.5.1	Çevre Koşulları.....	37
3.5.2	Besiyerinin Hazırlanışı.....	37
3.5.3	Bayıltma Yöntemi.....	39
3.5.4	Standart Çapraz İçin Ergin Birey Seçimi ve Larva Toplanması İşlemleri..	39
3.5.5	Mutajen ve Flavonoid Çözeltilerinin Hazırlanması ve Besiyerine Eklenmesi.....	40
3.6.	Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinin Uygulanması.....	41
3.6.1.	Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması.....	43
3.6.2.	Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi.....	44
3.7.	Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar.....	46
3.7.1	Homojenizasyon ve Santrifügasyon.....	46
3.7.2	Enzim Aktivite Tayini.....	46
3.7.2.1	Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması.....	47



3.7.2.2.	Katalaz Aktivitesinin Tayini ve Hesaplanması.....	47
3.7.2.3.	Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivite Tayini ve Hesaplanması.....	48
3.7.2.4.	Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması.....	48
3.7.2.5.	Redükte Glutasyon Miktar Tayini ve Hesaplanması.....	49
3.7.2.6.	Total Protein Tayini.....	49
3.7.2.7.	Enzim Aktivitesi Çalışmalarında İstatistiksel Analiz.....	50
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>51</b>
4.1.	Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular.....	51
4.1.1.	N-metil-N-nitrozoüre, Siklofosfamid ve Mitomisin C'nin Genotoksik Etkilerinin Araştırılması.....	51
4.1.2.	Flavonoidlerin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	56
4.1.2.1.	Etanolün Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	56
4.1.2.2.	Resveratrolün Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	57
4.1.2.3.	Galanginin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	59
4.1.2.4.	Luteolinin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	61
4.1.2.5.	Mirisetin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	62
4.1.3.	Flavonoidlerin Antigenotoksik Etkilerinin Araştırılması.....	64
4.1.3.1.	Resveratrolün Antigenotoksik Etkisinin Araştırılması.....	65
4.1.3.2.	Galanginin Antigenotoksik Etkisinin Araştırılması.....	70
4.1.3.3.	Luteolinin Antigenotoksik Etkisinin Araştırılması.....	75
4.1.3.4.	Mirisetin Antigenotoksik Etkisinin Araştırılması.....	80
4.2.	Resveratrol, Galangin, Luteolin ve Mirisetinin <i>Drosophila melanogaster</i> Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması.....	85
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>89</b>
5.1.	Resveratrol, Galangin, Luteolin ve Mirisetinin Genotoksik ve Antigenotoksik Etkisi.....	89
5.2.	Resveratrol, Galangin, Luteolin ve Mirisetinin Değişik Konsantrasyonlarının <i>Drosophila</i> Erginlerinde SOD, Katalaz, GR ve GST Aktiviteleri ile Redükte Glutasyon Düzeyine Etkisi.....	98
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>101</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>115</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Flavonoidlerin karbon iskeleti yapısı.....	2
Şekil 1.2.	Flavonol genel yapısı.....	3
Şekil 1.3.	Mirisetin kimyasal yapısı .....	3
Şekil 1.4.	Galanginin kimyasal yapısı .....	5
Şekil 1.5.	Luteolinin kimyasal yapısı .....	6
Şekil 1.6.	Resveratrolün trans ve cis izomerleri.....	7
Şekil 1.7.	Genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri .....	12
Şekil 1.8.	<i>flr3/TM3</i> , <i>BdS</i> ve <i>mwh/mwh</i> bireylerinin çaprazlanması sonucu oluşan transheterozigot <i>mwh/flr3</i> ve dengelenmiş heterozigot <i>mwh/BdS</i> bireyleri.....	12
Şekil 1.9	Mikroskopta benek varlığı için taranan kanat bölgeleri .....	13
Şekil 1.10.	Tekli ve ikili beneklerin oluşumuna neden olan farklı genotoksik olayları gösteren genetik mekanizmalar .....	14
Şekil 1.11.	Çeşitli benek tipleri .....	14
Şekil 3.1.	<i>Drosophila</i> 'nın yaşam döngüsü .....	33
Şekil 3.2.	Larvada imajinal disk yerleşimi ve erginde oluşturduğu yapılar .....	35
Şekil 3.3.	Kanat benek testinin şematik gösterimi.....	42
Şekil 4.1.	MNU uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.2.	SF uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması .....	54
Şekil 4.3.	MMC uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması .....	55
Şekil 4.4.	Resveratrol uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması .....	59
Şekil 4.5.	Galangin uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması .....	60
Şekil 4.6.	Luteolin uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması .....	62
Şekil 4.7.	Mirisetin uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması .....	64
Şekil 4.8.	MNU (1 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MNU ile birlikte uygulanan resveratrolün farklı dozlarının etkisi .....	67
Şekil 4.9.	SF (1 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine SF ile birlikte uygulanan resveratrolün farklı dozlarının etkisi .....	68
Şekil 4.10.	MMC (0.05 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MMC ile birlikte uygulanan resveratrolün farklı dozlarının etkisi .....	69
Şekil 4.11.	MNU, SF ve MMC'nin <i>D. melanogaster</i> 'de indüklediği somatik mutasyonlara karşı resveratrolün farklı dozlarının inhibisyon etkisi...	70
Şekil 4.12.	MNU (0.5 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MNU ile birlikte uygulanan galanginin farklı dozlarının etkisi .....	72
Şekil 4.13.	SF (0.5 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine SF ile birlikte uygulanan galanginin farklı dozlarının etkisi .....	73
Şekil 4.14.	MMC (0.025 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MMC ile birlikte uygulanan galanginin farklı dozlarının etkisi .....	74
Şekil 4.15.	MNU, SF ve MMC'nin <i>D. melanogaster</i> 'de indüklediği somatik mutasyonlara karşı galanginin farklı dozlarının inhibisyon etkisi.....	75

Şekil 4.16.	MNU (0.5 mM)'nun neden olduğu benek tipleri üzerine MNU ile birlikte uygulanan luteolinin farklı dozlarının etkisi .....	77
Şekil 4.17.	SF (0.5 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine SF ile birlikte uygulanan luteolinin farklı dozlarının etkisi .....	78
Şekil 4.18.	MMC (0.025 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MMC ile birlikte uygulanan luteolinin farklı dozlarının etkisi.....	79
Şekil 4.19.	MNU, SF ve MMC'nin <i>D. melanogaster</i> 'de indüklediği somatik mutasyonlara karşı luteolinin farklı dozlarının inhibisyon etkisi .....	80
Şekil 4.20.	MNU (1 mM)'nun neden olduğu benek tipleri üzerine MNU ile birlikte uygulanan mirisetinin farklı dozlarının etkisi .....	82
Şekil 4.21.	SF (1 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine SF ile birlikte uygulanan mirisetinin farklı dozlarının etkisi .....	83
Şekil 4.22.	MMC (0.025 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MMC ile birlikte uygulanan mirisetinin farklı dozlarının etkisi .....	84
Şekil 4.23.	MNU, SF ve MMC'nin <i>D. melanogaster</i> 'de indüklediği somatik mutasyonlara karşı mirisetinin farklı dozlarının inhibisyon etkisi .....	84

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Sandart <i>Drosophila</i> besiyeri için gerekli olan sarf malzemeler ve miktarları .....	38
Çizelge 3.2.	Sandart <i>Drosophila</i> besiyeri için gerekli olan asit karışımında kullanılan sarf malzemeler ve miktarları .....	38
Çizelge 3.3.	Faure çözletisi için gerekli sarf malzemeler ve miktarları.....	43
Çizelge 3.4.	Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi.....	45
Çizelge 4.1.	<i>Drosophila</i> kanat benek testi ile N-metil-N-nitrozoüre (MNU) uygulama gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler .....	52
Çizelge 4.2.	<i>Drosophila</i> kanat benek testi ile Siklofosamid (SF) uygulama gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler.....	53
Çizelge 4.3.	<i>Drosophila</i> kanat benek testi ile Mitomisin C (MMC) gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler.....	55
Çizelge 4.4.	<i>Drosophila</i> kanat benek testi ile etanol gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler.....	57
Çizelge 4.5.	<i>Drosophila</i> kanat benek testi ile resveratrol gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler.....	58
Çizelge 4.6.	<i>Drosophila</i> kanat benek testi ile galangin gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler.....	60
Çizelge 4.7.	<i>Drosophila</i> kanat benek testi ile luteolin gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler.....	61
Çizelge 4.8.	<i>Drosophila</i> kanat benek testi ile mirisetin gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler.....	63
Çizelge 4.9.	Resveratrolün farklı dozlarının MMC, SF ve MNU ile birlikte uygulanması sonucunda <i>D.melanogaster</i> kanat benek testinde elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler.....	66
Çizelge 4.10.	Galanginin farklı dozlarının MMC, SF ve MNU ile birlikte uygulanması sonucunda <i>D.melanogaster</i> kanat benek testinde elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler.....	71
Çizelge 4.11.	Luteolinin farklı dozlarının MMC, SF ve MNU ile birlikte uygulanması sonucunda <i>D.melanogaster</i> kanat benek testinde elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler.....	76
Çizelge 4.12.	Mirisetin farklı dozlarının MMC, SF ve MNU ile birlikte uygulanması sonucunda <i>D.melanogaster</i> kanat benek testinde elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler.....	81
Çizelge 4.13.	<i>D. melanogaster</i> 'de uygulanan etanolün süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyi üzerine etkileri.....	87
Çizelge 4.14.	<i>D. melanogaster</i> 'de uygulanan mirisetin dozlarının süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyi üzerine etkileri.....	87
Çizelge 4.15	<i>D. melanogaster</i> 'de uygulanan resveratrol, galangin ve luteolin dozlarının süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyi üzerine etkileri.....	88

## SİMGELER VE KISALTMALAR

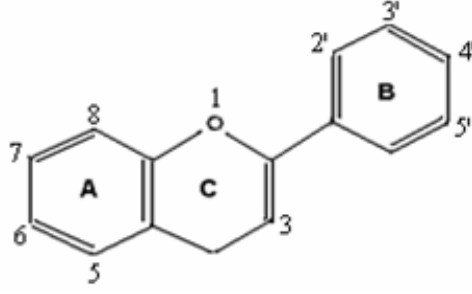
SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
<i>mwh</i>	Çoklu kanat kılı mutasyonunu tasır
<i>flr3</i>	Flare mutasyonunu tasır, <i>flr3</i> kanat kıllarının şekli seklini etkileyen resesif bir mutasyondur
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
GR	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon S- transferaz
GPX	Glutasyon peroksidaz
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır serum albumini)
ST	Standart çapraz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
GSSG	Okside glutasyon
GSH	Redükte glutasyon
DTNB	5-5'ditiyobis (2-nitrobenzoik asid)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asid
ANOVA	Varyans analizi
CDNB	1-kloro, 2,4 dinitrobenzen
OD	Optik dansite
MNU	N-metil N- nitrozoüre
MMC	Mitomisin C
SF	Siklofosfamid

## 1. GİRİŞ

Günümüzde doğal yaşamdan giderek uzaklaşma ve beslenme alışkanlıklarının değişmesi, kanser gibi tehlikeli ve ölümcül hastalıklara yakalanma olasılığını arttırmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, insanların bu tip hastalıklara yakalanma riskini azaltmada doğru beslenme desteğinin önemine dikkat çekmektedir [1]. Beslenme alışkanlıklarının daha fazla meyve, sebze ve tahıl tüketecek şekilde değiştirilmesi, kronik hastalıkların önlenmesinde etkin ve pratik bir yaklaşım olarak görülmektedir [2]. Bu tür fonksiyonel besinlerin, vücudun temel besin öğeleri gereksinimini karşılamının ötesinde, içerdikleri fitokimyasal adı verilen birçok biyolojik aktif bileşen sayesinde insan fizyolojisi ve metabolik fonksiyonları üzerinde ilave yararlar sağlayarak hastalıklardan korunmada ve daha sağlıklı bir yaşam sürmede katkı sağladıkları düşünülmektedir [3].

Fitokimyasalların doğada en çok bulunan ve en geniş sınıfını oluşturan flavonoidler, çeşitli özellikleri sayesinde vücuda zarar veren öğeleri etkisiz hale getirip sağlık üzerinde olumlu etkide bulduklarından, birçok araştırmaya konu olmuş ve olmaya da devam etmektedir [4.5]. Bitkilerden izole edilmiş, bitkinin bir takım gelişim aşamalarında ve savunmasında önemli rol oynayan yaprak, çiçek ve meyve gibi kısımlarında yaygın şekilde bulunan ve renginden sorumlu olan 4000 den fazla flavonoid bulunduğu belirtilmektedir [6]. Beslenmeye bağlı farklılıklardan dolayı flavonoid alımının miktarlarında populasyonlar arasında farklılıklar vardır. İnsanların günlük olarak besinlerle 16-1000 mg arasında flavonoid aldıkları tahmin edilmektedir [7]. Flavonoidler ısı altında genellikle kararlıdır, ancak pişirme ya da kızartma işlemleri sırasında çok az bir flavonoid kaybı olmaktadır [8]. Besinlerdeki flavonoidlerin bir kısmı doğrudan alınırken, bir kısmı da bağırsak florası tarafından glikozit formundan aglikon formuna dönüştürülerek pasif difüzyonla absorbe edilmektedir. Absorbsiyon sonrasında ise karaciğerde metabolize edilerek daha küçük yapıli bileşiklere dönüştürülmektedir [6].

Flavonoidler, iki aromatik A ve B halkasının üç karbon köprüsü (C) ve bir heterosiklik oksijenle bağlandığı difenilpropan ( $C_6-C_3-C_6$ ) iskelet yapısındadır (Şekil 1.1). A halkası 5 ve 7 pozisyonunda karakteristik bir hidroksilasyon gösterirken, B halkası genellikle 4', 3' ve 4' veya 4' ve 5' pozisyonlarında hidroksillenir.



Şekil 1.1. Flavonoidlerin karbon iskeleti yapısı

Flavonoidler bu molekül yapılarına göre flavonlar, flavonoller, flavononlar, izoflavonlar, kateşinler ve antosiyaninler olmak üzere altı farklı gruba ayrılabilir. Flavonoid grupları arasındaki yapısal farklılıklar; fenolik hidroksil gruplarının sayısı ve dağılımındaki çeşitlilikler, bunların substitüsyonları ve C-halkasının kimyası ile açıklanmaktadır [9]. Flavonoidlerin yapısında yaygın olarak bulunan hidroksil grupları reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla alkillenir veya glikozillenir. Bu nedenle, doğada flavonoidlerin metoksi ve glikozid türevlerine sık rastlanır [10]. Yapılan çalışmalar flavonoidlerin antiallerjik, antiviral, antitümör, antienflamatuar, antioksidan, antimutajen ve antigenotoksik etkileri de içeren birçok biyolojik aktivitede rol oynadıklarını göstermektedir [11]. Bu aktiviteler, temel olarak flavonoid yapısındaki hidroksil grubunun sayısına ve pozisyonuna bağlıdır. Tüm flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahip olup, antioksidan aktivitelerini; ksantin oksidaz, lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile şelat oluşturarak, süperoksit anyonları, lipid peroksit radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak ve diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek gösterdikleri belirtilmektedir [6,11,12].

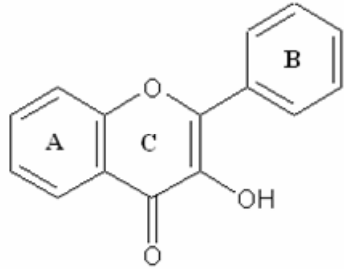
Flavonoidlerin, antigenotoksik ve antioksidan etkilerinin rapor edildiği çok sayıda *in vitro* çalışma bulunmasına rağmen az sayıda *in vivo* çalışmaya rastlanılmıştır. Flavonoidlerce zengin besin tüketimi ile insanlarda artan plazma antioksidan kapasitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, flavonoidlerin *in vitro* olarak kuvvetli antioksidan özellik göstermelerine karşın *in vivo* olarak antioksidan özelliklerinin bazı etmenlerden dolayı sınırlı olduğu bulgusu rapor edilmiştir [13]. Bu bulgu, bir maddenin antioksidan ya da antigenotoksik etkiye sahip olduğunu ileri sürmek için yapılacak *in vitro* çalışmaların yanında, özellikle yüksek yapılı organizmaları da temsil edebilecek model organizmalarla *in vivo* çalışmaların da yapılmasının çok önemli olduğunu göstermektedir.

**Bu çalışmanın amacı;** yapılan geniş literatür taramasına göre *Drosophila melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin çalışılmamış olduğu belirlenen flavonoidlerden mirisetin, luteolin, galangin ve resveratrolün antigenotoksik aktiviteleri ile antioksidan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız, flavonoidlerin söz konusu olası etkilerinin *in vivo* olarak araştırılması olanağı sağlayan hızlı, ekonomik ve güvenilirliği kanıtlanmış olan SMART testinde ilk defa değerlendirilmiş olması yönüyle orjinaldir.

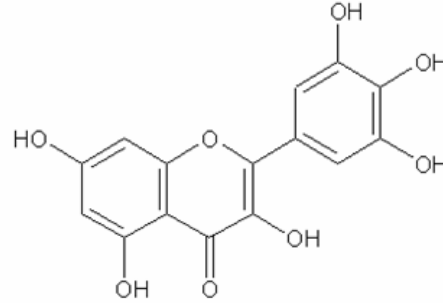
Tez çalışması kapsamında ele alınan flavonoidlerin hangi bitkilerde en çok bulunduğu, yapıları, hangi flavonoid sınıfında buldukları ve ne gibi özelliklere sahip oldukları aşağıda kısaca açıklanmaktadır.

### 1.1. Mirisetin

Mirisetin (3, 3', 4', 5, 5', 7-hekzahidoksiflavon), doğal olarak bulunan ve flavonol (Şekil 1.2) grubunda yer alan 3, 5, 7, 3', 4' ve 5' pozisyonunda hidroksil bağlı olan bir flavonoiddir [14] (Şekil 1.3). Flavonoller, C halkasının en fazla yükseltgendiği, yapı çeşidi en fazla olan, açık sarı veya sarı renkli ve besinlerde en çok rastlanan flavonoid sınıfıdır. Ortalama olarak besinlerin kilogramında 0.015 g ile 1.2 g arasında flavonol bulunur. En zengin flavonol kaynakları soğan, brokoli, pırasa, kırmızı şarap ve çaydır.



Şekil 1.2. Flavonol genel yapısı



Şekil 1.3. Mirisetinin kimyasal yapısı

Günlük olarak alınan birçok bitki kökenli yiyecek ve içerde mirisetin bulunmasına rağmen en fazla çayda, üzümde özellikle kabuğunda, keçiboynuzunda ve çilek, kiraz gibi küçük yumuşak meyvelerde bulunur [15,16]. Günde yaklaşık olarak 23 mg mirisetin besinlerle alınmaktadır [17]. Alınan mirisetinin bir kısmı gastrointestinal sistemden absorbe edilirken, kalan kısmı ise bağırsak florası tarafından metabolize edilir. Absorbe edilen mirisetinin metabolize edilmesinde büyük oranda karaciğerin



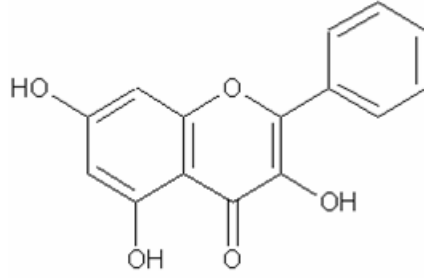
sorumlu olduğu ifade edilmektedir [18]. Mirisetin enzimatik olmayan ve enzimatik sistemler tarafından üretilen radikalleri süpürmede etkili bulunmuştur. Mirisetinin, enzimatik olmayan lipid peroksidasyonunda indikatör görevi yapan malonaldehiti [19] ayrıca sıçan mitokondrisinde askorbat, demir ve sülfat tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği belirtilmektedir [20]. Metal iyonlarıyla şelat oluşturabilme yeteneğinden dolayı yüksek mirisetin konsantrasyonunun DNA hasarını azalttığı belirtilmiştir [21]. Mirisetinin, benzopiren (benzo(a)pyrine) gibi polisiklik aromatik hidrokarbonların neden olduğu deri ve akciğer kanseri riskini deney hayvanlarında azalttığı ve insan karaciğer mikrozoamlarında benzoprien hidroksilasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir [22]. Benzopiren ve türevlerinin DNA ya bağlanmasını inhibe ederek çeşitli kanser türlerinin oluşumunu engellediği de belirtilmiştir [22]. Değişik test sistemlerinde çeşitli mutajenlerin indüklediği mutasyonları inhibe ettiği gösterilirken bazı çalışmalarda kendisinin de mutasyona neden olduğu ifade edilmektedir. TA98, TA100 ve TA1537 *Salmonella typhimurium* soylarında metabolik aktivasyon olmaksızın frameshift mutasyonuna neden olduğu belirtilmektedir [23]. Mirisetin RNA polimerazın, DNA polimeraz  $\alpha$  ve DNA polimeraz I'ın potansiyel inhibitörü olduğundan DNA polimeraz enzimlerinin DNA hasarlarını tamir etmelerini engellemektedir. Dimetilnitrosaminin hücre ölümüyle sonuçlanan DNA hasarına neden olduğu ve buna mirisetin eklendiğinde dimetilnitrosaminin indüklediği DNA hasarı ve hücre ölümünün arttığı rapor edilmekte ancak tek başına mirisetinin DNA hasarı ve hücre ölümüne neden olmadığı belirtilmektedir [24].

Mirisetin, lösemiye neden olan virüsler ve bağışıklık sistemini zayıflatan virüslerde revers transkriptazı inhibe etme yeteneği ile antiviral etki gösterdiği belirtilmektedir [25]. Ayrıca pıhtılaşmayı önleyici antitrombotik, antidiabetik ve çeşitli bakteri soylarına karşı antibakteriyal etkileri bulunduğu da rapor edilmiştir [23].

## 1.2. Galangin

B halkasında hiç hidroksil taşımayan ve en fazla lipofilik özellik gösteren galangin (3.5.7-trihidroksiflavon) flavonol grubunda yer alır (Şekil 1.4). Galangin birçok sebze ve meyvede bulunmasına rağmen özellikle bal, bal arılarının ağaç reçinelerinden yaptığı propolis (1 gr propolis te 13 mg galangin vardır), kestane, zencefil ve hem baharat hem de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Alpinia*

*officinarum* (havlıcan) -ekstratının %10'u galanginden oluşur- oldukça fazla olduğu belirtilmektedir [26,27].

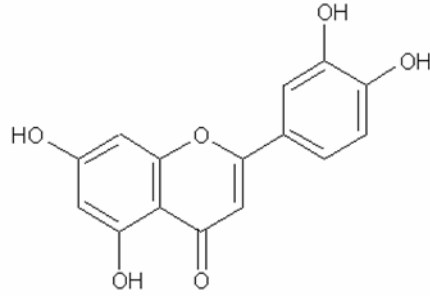


**Şekil 1.4.** Galanginin kimyasal yapısı

Galangin en etkili antioksidatif flavonoidlerden biridir ve birçok biyolojik aktivite rol almaktadır [26]. Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda galanginin çeşitli mutajenlerin DNA ya bağlanmasını veya DNA yı metillemesini azaltarak antigenotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir [28,29]. Galanginin, menopoz sonrası dişilerde östrojen seviyesini modifiye ettiği ve östrojen-reseptör pozitif insan göğüs kanseri hürelerinin çoğalmasını östrojen reseptörüne bağlanarak engellediği belirtilmektedir [30]. Ayrıca çeşitli kanser türlerine neden olan polisiklikhidrokarbon ve heterosiklik amin gibi maddelerin aktivasyonunda temel rolü olan sitokrom P450 enzimlerini inhibe ettiği belirtilmektedir [31]. Galangin bakır iyonları yardımıyla gerçekleşen düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun etkili bir inhibitörüdür [32]. Ayrıca NADPH varlığında süperoksit anyon radikallerinin oluşumunu engellediği belirtilmiştir [33]. Yapılan çalışmalar galanginin antioksidatif ve serbest radikal süpürücü etkileriyle enzim aktivitelerini düzenleme ve kimyasalların genotoksik etkilerini baskılama gibi özellikler gösterdiğini ortaya koymaktadır [26].

### 1.3. Luteolin

Flavonoidlerden flavone grubunda yer alan luteolin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon) kekik, maydanoz ve enginarıda yüksek oranda bulunurken; şekerpancarı, lahana, karnabahar, soğan, havuç, brokoli, mısır gibi çeşitli sebzelerde değişen oranlarda bulunmakta ve besinlerle günlük ortalama 2 mg kadar alınmaktadır [34,35] (Şekil 1.5).



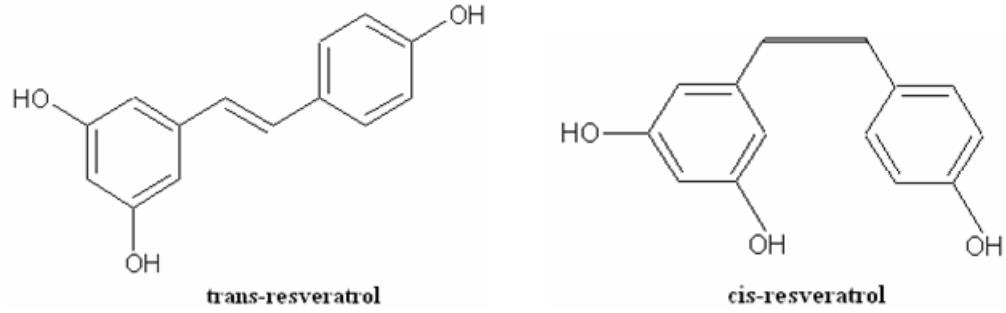
Şekil 1.5. Luteolinin kimyasal yapısı

Flavonoidlerin önemli üyelerinden bir olan luteolinin kuvvetli bir serbest radikal süpürücü olduğu ve antienflamatuar ve anti alerjik etkileri de içeren geniş farmakolojik özellikler gösterdiği belirtilmektedir. Luteolin ile ilgili yapılan çalışmalar antioksidan özellikleri ve antiproliferatif etkileri üzerine odaklanmıştır [36]. Luteolin, enginar yaprağı ekstraktının antioksidan aktivitesine katkıda bulunarak,  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları aracılığıyla meydana gelen LDL oksidasyonunu engellemektedir [37]. Luteolinin DNA topoizomeras I ve II'yi, tümör hücrelerinin çoğalmasında rol oynayan triozin kinazı inhibe etmesi ve apoptozisi indüklemesi nedeni ile kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli taşıdığı rapor edilmiştir [38].

#### 1.4. Resveratrol

Fitokimyasalların sınıflandırılmasındaki farklılıklardan dolayı çeşitli yayınlarda resveratrolün (3,4',5-trihidroksistilben) fitokimyasalların alt sınıfı olan stilben fitoaleksini olduğu belirtilirken [39], bir çok çalışmada da flavonoidlerin hidroksistilben olarak çok daha özelleşmiş bir sınıfa dahil edilmektedir [16]. Resveratrol, çeşitli bitkiler tarafından özellikle hayvan ve patojenlerin saldırısı, yaralanma veya UV'ye maruz kalmaya karşı dayanıklılık mekanizması oluşturulması amacıyla üretilir [40,41]. Üzümde, özellikle kırmızı üzümde (yaş üzümün kabuğu 50–100  $\mu\text{g}$  /1 gr içerir) ve kırmızı şarapta en fazla bulunurken dut, yaban mersini ve yer fıstığında ise değişen oranlarda bulunmaktadır [42].

Resveratrolün bitkilerden saf olarak elde edilmesi zaman ve madde kaybına yol açtığından, kimyasal yolla sentezi üzerine araştırmalar yoğunlaşmış ve *trans*-resveratrol elde edilmiştir. *Trans*-resveratrolün UV irradyasyonu ile *cis*-formu elde edilmektedir ve üzüm ekstrelerinde bulunmayan *cis*-izomeri *trans*- izomerine göre daha düşük biyolojik aktiviteye sahiptir [43] (Şekil 1.6).



**Şekil 1.6.** Resveratrolün *trans* ve *cis* izomerleri

Oral olarak alınan resveratrolün % 50-75'i gastrointestinal yoldan absorbe edilmekte ve karaciğer ve barsak hücrelerinde glukuronid ve sülfat konjugatlarına dönüştürülmektedir [44].

Kırmızı şarap dolayısıyla resveratrol tüketiminin fazla olduğu Fransız toplumunda, bol yağlı ve kırmızı etten zengin beslenmelerine rağmen kronik kalp hastalığına ve kardiyovasküler hastalıklardan ölümlere düşük oranda rastlanması, *Fransız paradoksu* olarak adlandırılmaktadır [45]. Resveratrolün kalp damar sistemi üzerindeki olumlu etkileri, onun östrojen benzeri biyolojik aktiviteleriyle ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) peroksidasyonunu önlemesiyle ilişkilendirilmektedir [46]. Resveratrolün çeşitli insan tümör hücre dizilerinde, doza bağlı olarak DNA sentezini ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği belirlenmiştir. Resveratrol, antikanserojen aktivitesini tümör süpresör proteinlerden p53 ü aktive ederek, ribonükleotid redüktaz, DNA polimeraz, tirozin kinaz ve sitokrom P450 1A1, siklooksijenaz-1 ve siklooksijenaz-2 enzimlerinin aktivitelerini ise inhibe ederek gösterdiği belirtilmektedir [47,48]. İnsan östrojen reseptör (ER) pozitif (MCF-7) ve ER negatif (MCF-10, MDAMB-231) meme kanseri hücre dizilerinde, resveratrolün apoptozu uyardığı rapor edilmiştir [49].

Resveratrolün besin kaynaklı olan MeIQx ve PhIP heterosiklik aminlerinin mutajenik etkilerini engellediği çeşitli test sistemlerinde gösterilmiştir [50,51]. Ayrıca, doğrudan mutajen MNU, promutajen AFB1, IQ ve siklofosamid'in indüklediği mikronukleus oluşumuna neden olan mutajenik etkileri, doza bağlı olarak önemli düzeyde azalttığı rapor edilmektedir [52]. Resveratrolün antimutajenik etkisini promutajenlerin metabolizasyonunda sorumlu faz I enzimlerini baskılayarak gösterdiği belirtilmektedir [49,52]. Bunun yanında, resveratrolün detoksifikasyon enzimlerine veya mutajenlerin metabolik aktivasyonuna etki ederek ya da mutajenlerin DNA'ya

bağlanmalarını engelleyerek antimutajenik aktivite gösterdiği belirtilmektedir [53]. Resveratrolün esas olarak bakırla şelasyon sonucu ortaya çıkan serbest radikal süpürücü etkisinden dolayı LDL oksidasyonunu önlediği belirtilmektedir [54].

Güçlü doğal bir antioksidan olan resveratrolün koenzim Q ile rekabet ederek serbest radikal oluşumunu engelleme, mitokondride oluşan süperoksit anyonlarını süpürme, Fenton reaksiyonu ürünlerinin indüklediği lipid peroksidasyonunu inhibe etme ve detoksifikasyon enzimlerini uyarma özelliği bulunmaktadır [55,56]. Ayrıca, çeşitli moleküllerin metabolize edilmesi sırasında oluşan, serbest radikal içeren reaktif oksijen türleri (ROS)'nin zararlı etkilerini, radikal süpürücü aktivitesiyle engellediği belirtilmektedir [40].

Resveratrolün antioksidan, antikanserojen, antimutajen özelliklerinin yanında antienflamatuar, antiviral, antibakteriyel ve östrojenik etkilerinin de bulunduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [57].

### **1.5. Genetik Toksikoloji ve Antigenotoksisite**

Kelime anlamı “zehir bilimi” olan toksikoloji, fiziksel veya kimyasal ajanların canlılar üzerindeki olumsuz etkilerini inceler. Başka bir ifadeyle, canlılar üzerinde olumsuz ya da istenmeyen etkiler bırakan ajanların yani toksikantların ortaya çıkışını, doğasını, tekrarlama oranını, mekanizmasını ve risk faktörlerini deneysel olarak inceleyen bir bilim dalıdır [58]. Toksikolojik araştırmalar toksik etkinin hücresel, biyokimyasal ve moleküler mekanizmasının yanında bağışıklıkla ilgili fonksiyonel etkilerini inceler ve bunların ortaya çıkma olasılığını değerlendirir. Toksikoloji immunotoksikoloji, hepatotoksikoloji gibi çeşitli alt dallara ayrılmıştır. Bu alt dallardan biri olan “genotoksikoloji” veya “genetik toksikoloji”, fiziksel ya da kimyasal ajanların DNA ve kromozamlar üzerine etkilerini inceler [59]. Hücrede DNA ve kromozomlarda hasara neden olan toksik ajanlar genotoksin, DNA molekülleri ile genotoksinlerin etkileşmesi sonucu ortaya çıkan ve gelecek nesillere taşınan toksisite ise genotoksisite olarak tanımlanmaktadır [60]. Çeşitli *in vivo* ya da *in vitro* testlerle belirlenen mutasyonlar, kromozom hataları, DNA iplikçiklerinde kırılma ve tamiri engellenen DNA-eddaktları genotoksisitenin varlığını gösterir [58]

Herhangi bir kimyasal özel bir koşulda toksik ya da genotoksik olabilir. Örneğin oral yolla belirli düzeyde alınan bir madde toksik etki göstermezken, aynı madde damar ya da solunum yoluyla alındığında toksik olabilir.

Son yıllarda besinlerle alınan doğal bileşiklere ilgi artmış ve besin mutajenleri olarak tanımlanan heterosiklik aromatik aminler, N-nitrozoaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi moleküllerin genotoksiteleriyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır [61]. Bunlardan N-nitrozoaminler tütsülenmiş ve salamura et, sosis, salam, balık, peynir ve soya yağı gibi besinlerde, alkollü içeceklerde, kozmetikte, sigarada, lastik ve kauçuk ürünlerinde bulunmaktadır [61]. İnsanlar oldukça yoğun bir şekilde bu maddeye ve N-methyl-N-nitrosourea (MNU) gibi türevlerine maruz kalmaktadırlar. MNU, DNA eddıkları ve nokta mutasyonları oluşturan doğrudan karsinojenik etki gösteren elektrofilik alkilleyici bir ajandır. MNU, elektronca zengin nukleofilik bölgelerden DNA bazlarını metilleyerek (N<sup>7</sup>-Guanin, N<sup>3</sup>-Adenin) alkilpurinleri ve aynı zamanda diğer alkilleyici ajanlara oranla oksijen atomlarına oldukça yüksek duyarlılık göstererek O<sup>6</sup> methylguanine mutajenitesini de oluşturmaktadır. O<sup>6</sup> methylguanine mutajenitesi sonucu G:C baz çifti A:T baz çifti eşleşmesine dönüşmekte ve dolayısıyla MNU'nun nokta mutasyonlar gibi genotoksik etkiler gösterdiği belirtilmektedir [62]. Alkilleyici bazı diğer ajanlar ise, insanların sağlıklı olmak amacıyla kullandıkları çeşitli ilaçlardır. Bu ilaçlardan farklı hastalıkların ve özellikle kanserin tedavisinde kullanılan siklofosamid ve mitomisin C'nin genotoksik ve hatta karsinojenik oldukları çeşitli test sistemlerinde gösterilmiştir [63,64].

Siklofosamid, temel olarak kanser tedavisinde kemoterapi ilacı olarak kullanılmakla birlikte, bağışıklık sistemini baskılayan immünsupresif bir ilaç olarak da romatizma, eklem yangıları, kronik hepatit gibi malign olmayan hastalıkların tedavisinde ve organ nakillerinde kullanılmaktadır [65]. Siklofosamid uygulanması ikincil kanserlerle ilişkilendirildiğinden, insan karsinojeni olarak sınıflandırılmıştır ve pro-ilac olarak adlandırılmaktadır. Metabolik aktivasyonun olmadığı durumlarda Siklofosamid DNA'ya bağlanamaz çünkü kendisi değil metabolitleri (Phosphoramid mustard ve acrolein) alkilleyici ajandır [66]. Siklofosamidin DNA replikasyonunun inhibisyonuna, baz substitüsyonları oluşturarak DNA hasarına, kromozomal hatalara, mikronukleus oluşumuna ve somatik mutasyonlara neden olarak genotoksik etkiler gösterdiği belirtilmektedir [65,66].

Mitomisin C (MMC) *Streptomyces caespitosus*'tan elde edilen, karsinojenik "kinon" ve "oktan" grupları ve "azoürüdin" halkası taşıyan sitotoksik bir antibiyotiktir [67]. Mitomisin C önceleri antibakteriyal olarak ancak son yıllarda gastrointestinal sistem, akciğer, meme ve mesane kanserlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır [68]. Siklofosamidde olduğu gibi metabolizasyon sonucu oluşan metabolitleri

genotoksik etkilere neden olmaktadır. Mitomisin C'nin radikaller üreterek ve DNA alkilasyonu ile DNA iplikçiklerinde kırılmalara yol açarak replikasyonu engellemek, nokta mutasyonlara neden olmak ve hücre siklusunun G1 ve S fazlarında DNA'yı etkileyerek bölünmeyi bloke etmek gibi genotoksik etkiler gösterdiği belirtilmektedir [68].

Siklofosamid ve Mitomisin C gibi metabolik aktivasyon sonucu genotoksik olabilen promutajenlerin ve MNU gibi doğrudan mutajenlerin bu olumsuz etkilerinin, sentetik ya da doğal çeşitli moleküllerle engelenbildiği farklı test sistemlerinde gösterilmiştir [69-70]. Bu genotoksik etkilerin, tamir mekanizmalarının indüklenmesi, genotoksinlere bağlanıp onların DNA'ya bağlanmalarını engelleme veya enzim aktivitelerini inhibe ederek metabolizasyonlarını bloke etme gibi çeşitli şekillerde engellenmesi antigenotoksisite ve bu aktiviteleri gösteren moleküller ise antigenotoksik ajan veya antimutajen olarak değerlendirilmektedir.

Biyolojik sistemlerin kararlılığını artırma temeline dayanan antimutajenizis, karsinojenleri de içeren çevresel genotoksik ajanların olumsuz etkilerini inhibe etmede en iyi yollardan biri olarak görülmektedir [71].

*In vivo* ve *in vitro* genotoksisite testlerinde, üreme hücrelerindeki veya somatik hücrelerdeki mutasyonlar temel alınmaktadır. Böylece gelecek nesillerde çeşitli kalıtsal hastalıkları oluşturan, üreme yeteneğini etkileyen ya da somatik mutasyonlar ile karsinojenik etkili olan mutasyonlar belirlenebilmektedir. Genotoksisite testleri yalnızca genotoksik ajanları ve onların etki mekanizmalarını belirlemez aynı zamanda antigenotoksik ajanların ve bu ajanların antigenotoksisite mekanizmalarını belirlemek amacıyla da yapılmaktadır [71].

Çok sayıda test olmasına rağmen genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılan testler arasında *Salmonella thyhimurium* mutant suşlarının kullanıldığı bakteriyel Ames testi, kromozomal aberrasyon, kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mikronükleus (MN) frekanslarının araştırıldığı sitogenetik testler, alkali ortamda DNA elektroforezinin yapıldığı tek hücre jel elektroforezi (SCGE) testi ile dominant letalite, halkasal X kromozom kaybı, bitişik X kromozomu, resesif letalite ve somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testlerini içeren çeşitli *Drosophila* testleri bulunmaktadır.

## 1.6. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

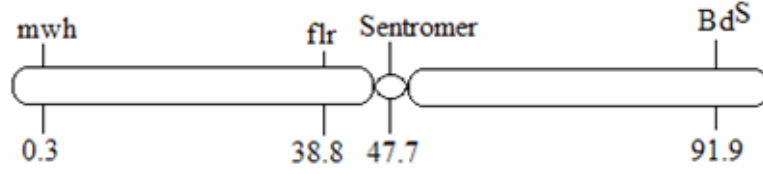
*Drosophila* küçük yapılı olması, kültürünün ekonomik ve kolay yapılması, yaşam döngüsünün kısa olması, çok sayıda yavru vermesi, larvalarının tükrük bezlerinde dev kromozamlara sahip olmaları, arı döl olarak saklanabilmeleri ve birçok mutant karaktere sahip olması gibi özellikleri nedeniyle genetik çalışmalarda tercih edilen ökaryotik bir organizmadır [72].

*Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon testlerinin diğer testlere göre hızlı, ekonomik ve güvenilirliği kanıtlanmış olması, bir jenerasyonda sonuç elde edilmesi, tek bir sinekte kanat ya da gözlerde çok sayıda hücrenin analizine olanak vermesi ve genotoksik etkinin fenotipte kolaylıkla farkedilmesi gibi avantajları bulunmaktadır [73].

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri (SMART), göz benek testi ve kanat benek testi olmak üzere iki çeşittir. Bunların her ikisi de nokta mutasyon, delesyon, kromozom bozuklukları ve mitotik rekombinasyonu belirlememize olanak verir. Kanatta mutasyona uğramış hücreler daha kolay gözlenirken, gözde daha zor gözlenmektedir [74]. Uygun işaret genlerinin heterozigotluğunun kaybını temel alarak geliştirilmiş olan bu testler, larvanın imajinal disklerinde mitotik olarak çoğalan büyük hücre gruplarını hedef alır. Eğer bu imajinal disk hücrelerinin herhangi birinde genetik bir değişiklik olursa, bundan sonraki oğul hücrelere bu değişiklik aktararak mutant hücre grupları (klonları) oluşur. Bu genetik değişiklik fenotipte gözlenebilen bir değişikliğe neden olursa, klonlar ergin sineğin kanatlarında ve gözlerinde mutant hücre benekleri olarak ortaya çıkar. Kimyasallara maruz bırakılan sineklerde indüklenmiş klonların toplam sayısı, uygulanan kimyasalın toplam genotoksik aktivitesi ile ilgili sayısal sonuçlar verirken, klonların tipi, klon oluşumunda rol oynayan mutasyonel mekanizmaları ortaya çıkarır [75].

Kanat benek testi için fenotipte gözlenebilen uygun işaret genleri iki tanedir. Bu genlerden ilki çoklu kanat kılı (*mwh*) genidir. Bu gen resesif bir gen olup homozigot olarak yaşatılabilen *mwh* stokları şeklinde tutulabilir ve *mwh* mutasyonu üçüncü kromozomun sol kolunun uca yakın bölümünde lokalize olmuştur (3-0.3). Homozigot olarak bulunduğu zaman hücre başına bir kanat kılı yerine çoklu kanat kıllarının oluşumuna neden olur [76]. Diğer işaret geni flare (*flr<sup>3</sup>*) ise kanat kıllarının şeklini etkileyen resesif mutant bir gendir. Bu gen de yine üçüncü kromozomun sol kolunda fakat sentromere daha yakın (3-38.8) olarak yer alır (Şekil 1.7).

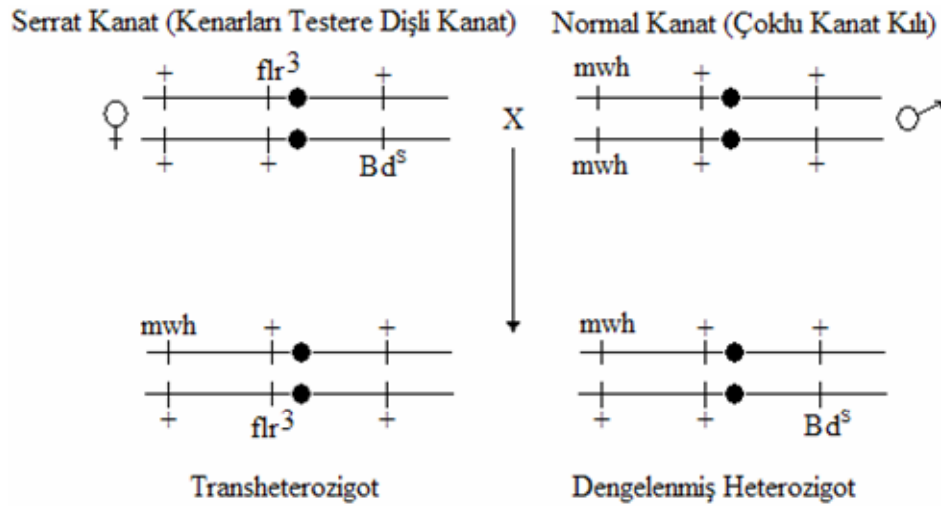




Şekil 1.7. Genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri [75].

Flare geninin üç mutant aleli bilinmektedir ve hepsi de homozigot letaldır (*flr* için homozigot olan zigotlar ergine gelişemez). Fakat kanat imajinal disklerindeki homozigot hücreler yaşayabilir ve mutant kanat hücrelerine gelişebilir. Homozigot letalite nedeni ile *flr* allelleri birçok inversiyonlar ve yine homozigot letal olan dominant işaret gen taşıyan dengeleyici bir kromozomla birlikte *flr<sup>3</sup>/TM3*, *Bd<sup>S</sup>* stok olarak tutulur [75].

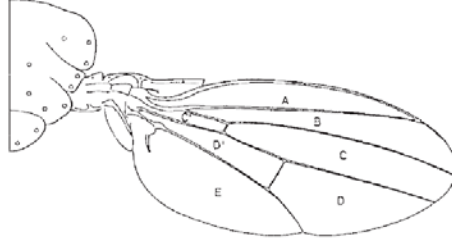
Kanat benek testi için iki ayrı çaprazlama kullanılmaktadır. Bunlardan biri standart çapraz (ST) diğeri ise promutajenlere duyarlı olan yüksek biyoaktivasyon çaprazı (YB) dır. Standart çapraz için yumurta verimi daha fazla olan *flr<sup>3</sup>/TM3*, *Bd<sup>S</sup>* soyundan toplanan virjin dişiler *mwh* erkekleri ile çaprazlanırken (Şekil 1.8), yüksek biyoaktivasyon çaprazında *ORR/ORR;flr<sup>3</sup>/TM3,Bd<sup>S</sup>* soyunun virjin dişileri ve *mwh* erkekleri çaprazlanır. Bu çaprazlar sonucunda gelişen heterozigot larvalara, mutajenik etkisi araştırılmak istenen maddeler uygulanır.



Şekil 1.8. *flr<sup>3</sup>/TM<sup>3</sup>*, *Bd<sup>S</sup>* ve *mwh/mwh* bireylerinin çaprazlanması sonucu oluşan trans-heterozigot *mwh/flr<sup>3</sup>* ve dengelenmiş heterozigot *mwh/Bd<sup>S</sup>* bireyleri

Ergin bireyler  $Bd^S$  işaret geninden temel olarak fenotipik olarak ayırt edilebilen iki farklı fenotipe sahiptir. (1) Trans-heterozigot sinekler ( $mwh\ flr^+ / mwh^+ flr^3$  fenotipik olarak yabancı tip kanatlara sahiptir). (2) Dengeleyici-heterozigot sinekler ( $mwh\ flr^+ / TM3, Bd^S$  fenotipik olarak kanat kenarları testere dişlidir). Dengeleyici-heterozigot bireylerde çok sayıdaki inversiyonlar nedeni ile rekombinasyonlar engellenmiştir ve mutasyonlar nedeni ile yalnızca  $mwh$  tekli benekleri ortaya çıkar [76].

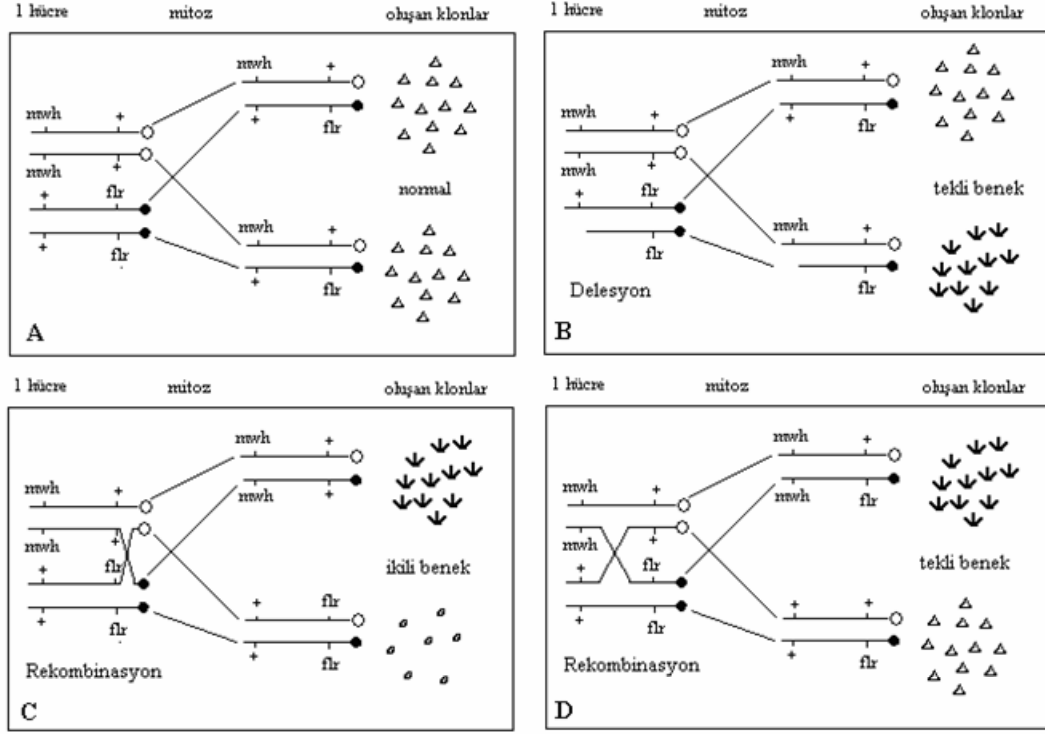
Ergin bireylerin kanatları, mutant hücre klonlarının varlığını araştırmak amacıyla mikroskop altında taranır (Şekil 1.9) ve gözlenen mutant hücre klonları farklı benek gruplarına ayrılarak kaydedilir.



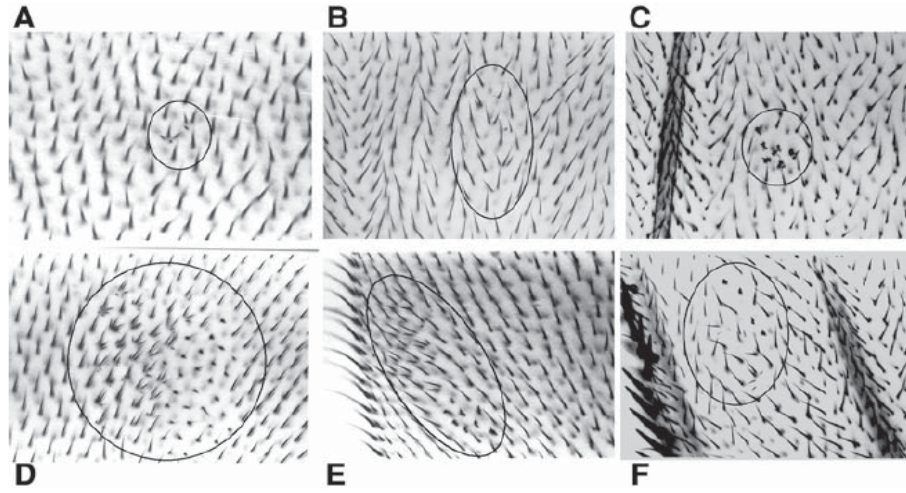
**Şekil 1.9.** Mikroskopta benek varlığı için taranan kanat bölgeleri (A-E) [75].

Tekli  $flr^3$  veya  $mwh$  benekleri (küçük ve büyük benekler); nokta mutasyon ( $flr^+$  ya da  $mwh^+$  da), kromozomal değişiklik (örneğin veya  $flr^+$  veya  $mwh^+$  delesyonu) ya da mitotik rekombinasyon olduğunu gösterir. Öte yandan ikili benekler (birbirine yakın duran  $flr^3$  ve  $mwh$  hücreleri) özellikle mitotik rekombinasyon sonucu oluşur (Şekil 1.10). Bu nedenle ikili benekler, uygulanan maddenin rekombinasyon aktivitesi hakkında ön fikir verir. İstatistik analiz için benekler fenotipleri açısından büyük tekli benek, küçük tekli benek ve ikili benekler olarak sınıflandırılırlar (Şekil 1.11).

Küçük benekler (bir ya da iki mutant hücre) pupada son bir-iki mitoz bölünme sırasında oluşurken, büyük benekler (üç ya da üçten fazla mutant hücre) daha erken, larva aşamasında oluşur. Ayrıca kromozomal aberasyonlar sonucu meydana gelen genetik bozukluklar, mutasyonun başlangıç zamanına bağlı olmaksızın çoğunlukla küçük klonlar olarak ortaya çıkar [72,75].



**Şekil 1.10.** Tekli ve ikili beneklerin oluşumuna neden olan farklı genotoksik olayları gösteren genetik mekanizmalar. **A:** Normal kanat kıllarının oluşumu, **B:** Delesyon sonucu tekli benek oluşumu, **C:** Mitotik rekombinasyon sonucu ikili benek oluşumu, **D:** Mitotik rekombinasyon sonucu tekli benek oluşumu [72]



**Şekil 1.11.** Çeşitli benek tipleri. **A:** *mwh* fenotipindeki küçük tekli benek (2 hücreli), **B:** *mwh* fenotipindeki büyük tekli benek (5 hücreli), **C:** *flr* fenotipindeki büyük tekli benek (6 hücreli), **D:** İkili benek (30 hücre *mwh* ve 30 hücre *flr* fenotipini göstermektedir) **E:** İkili benek (14 hücre *mwh* ve 8 hücre *flr* fenotipini göstermektedir) **F:** İkili benek (4 hücre *mwh* ve 4 hücre *flr* fenotipini göstermektedir) [75]

Şekil 1.11 de fenotipleri gösterilen benekler, farklı genetik mekanizmalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Beneklerin meydana gelmesine yol açan genetik mekanizmalar ise, Şekil 1.10 da topluca gösterilmiştir.

Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi, somatik hücrelerde heterozigotluğun kaybı olarak değerlendirilen çok sayıda genetik olayın belirlenmesine olanak verdiği için çok yönlü kullanılabilen *in vivo* bir testtir. Bu nedenle, SMART olası genotoksik maddeleri test etme olanağı sağlarken, doğal ya da sentetik çeşitli maddelerin olası antigenotoksik etkilerini araştırma olanağı da sağlamaktadır.

### 1.7. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi

Serbest radikaller, dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron içeren ve bu nedenle oldukça kararsız, kısa ömürlü, elektrik yüklü ya da yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir [77,78]. Bu atom ya da moleküller, eşlenmemiş elektronlar içerdiklerinden, kararlı hale gelebilmek için elektron alıcı (redüktan) ya da verici (oksidan) olarak davranma eğilimindedir. Bu nedenle oldukça güçlü reaktif ajanlar olarak tanımlanırlar [79]. Çok reaktif olmalarından dolayı başta lipidler olmak üzere proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve yükseltgenen tüm hücre elemanları ile tepkimeye girebilirler [80].

Organizmalardaki serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir ancak azot, karbon ve kükürt kaynaklı serbest radikaller de oluşabilmektedir [81]. Aerobik metabolizmaya sahip canlılarda moleküler oksijen hücre içinde çeşitli kimyasal tepkimeler sonucu suya dönüşürken, % 1-3 kadarının suya dönüşmemesi sonucu sürekli olarak serbest radikaller oluşur ve vücudun antioksidan savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılır [82]. Bu yapılmadığı takdirde, hücresel yapılar üzerinde toksik etkilere neden olur.

Normal metabolizma sırasında moleküler oksijenin tek elektron alması ile kısmi indirgenmesi sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri; süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil ( $OH$ ) radikalleridir. Oksijen molekülünün bir elektron alması ile süperoksit radikali, iki elektron alması ile hidrojen peroksit, üç elektron alması ile hidroksil radikali ve dördüncü elektronu alması ile su oluşur [83]. Bunlardan süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) çok çabuk ve çok kolay oluşan ve membranlardan kolayca geçemediği için fazla miktarda toksik olmayan fakat diğer radikallerin oluşumuna neden olduğundan önemli bir

radikaldir. Hidrojen peroksit ise süperoksit radikallerinin dismutasyonu (iki süperoksit radikalının iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturması) sonucu oluşan reaktif bir moleküldür. Hidrojen peroksit, reaktivitesi düşük olmasına rağmen membranlardan kolayca geçebilir ve bir süperoksit radikali ile tepkimeye girerek en reaktif ve en tehlikeli radikal olan hidroksil radikalini kolaylıkla oluşturabilir. Hidroksil radikali çok reaktif bir radikal olduğundan, hücrede bulunan hemen hemen bütün moleküllere (şekerler, proteinler, aminoasitler, DNA gibi) saldırabilir [84]. Hidroksil radikali özellikle DNA'nın yapısındaki guanin bazına etki ederek DNA da mutasyonlara yol açmaktadır.

Bu reaktif oksijen türleri normal metabolizma sırasında oluşabildikleri gibi, UV ve X ışınları, ilaçlar, kirleticiler, metal iyonları ve ksenobiyotikler gibi çevresel etmenlere maruz kalma sonucunda da indüklenmektedir [85]. Organizmalarda serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin bozulması, serbest radikallerin artmasına ve hücre hasarı oluşturmalarına yol açar. Bu duruma oksidatif stres denilmektedir. Oksidatif stres, antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalmasıyla ya da çeşitli durumlarda serbest radikallerin artmasıyla oluşur. Bunun sonucunda, hücrede DNA, protein, lipid, karbonhidrat ve enzimler zarar görebilir [86].

Çeşitli kaynaklardan birçok serbest radikal saldırısına maruz kalma, organizmaların bunlara karşı değişik savunma mekanizmaları geliştirmelerine yol açmıştır. Serbest radikallerin indüklediği oksidatif strese karşı çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır [87]. Antioksidan savunma mekanizmasında yer alan antioksidanlar genellikle zincir kıran bileşikler olarak bilinir ve düşük derişimde okside olabilecek bir substrat ile karşılaştığında, substratın oksidasyonunu geciktiren veya onu inhibe eden maddeler olarak tanımlanır [88]. Antioksidanlar, oksidan moleküllerin organizmaya olan zararlı etkilerini dört yolla engeller:

- **Süpürme Etkisi:** Çeşitli antioksidan enzimeler vasıtasıyla reaktif oksijen türlerinin tutularak ortamdaki uzaklaştırılması
- **Baskılama Etkisi:** Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi (Örneğin flavonoidler ve vitaminlerin oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirmeleri)
- **Zincir Koparma Etkisi:** Metal iyonlarının bağlanması ile radikal oluşum reaksiyonlarının önlenmesi

- **Onarma Etkisi:** DNA gibi radikallerin hedefi olan moleküllerin hasar sonrası tamir edilmeleri

Antioksidanlar, yapılarına göre enzimler ve enzim olmayan küçük moleküller; kaynaklarına göre organizmada bulunan ve dışarıdan alınanlar; çözünürlüklerine göre suda ve yağda çözünenler ve organizmadaki yerleşimlerine göre hücre içinde bulunanlar ve plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunanlar olmak üzere değişik kriterlere göre farklı şekilde sınıflandırılmaktadır [89]. Enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-s-transferaz (GST) gibi enzimlerden oluşurken, vitaminler, glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidanlar enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları içerisinde yer alır [87]. Ancak *Drosophila*'da glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi bulunmamaktadır. Normal koşullarda radikalik aktiviteyle bu antioksidanların intrasellüler düzeyleri arasındaki denge korunur.

### 1.7.1. Glutatyon (GSH)

GSH enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarından bir tanesidir ve L-glutamik asid, L-sistein ve glisinden iki basamaklı reaksiyonla oluşan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptiddir. Her basamakta bir mol ATP nin görev almasıyla  $\delta$ -glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimleri aracılığında oluşturulmaktadır. Glutatyon hücrede en fazla sitozolde, nükleusta ve mitokondrilerde bulunur. Birçok hayvan dokusundaki tüm glutatyon indirgenmiş halde yani GSH formunda bulunurken, *Drosophila*'da GSH formunun yanında yaklaşık % 20 oranında okside glutatyon (GSSG) da bulunmaktadır. Çoğu hücrede GSH'nin GSSG'ye oranının 500/1'den büyük olmasından dolayı GSH, glutatyonun en yoğun bulunan formu olarak kabul edilmektedir [90]. İndirgenmiş glutatyon (GSH) çeşitli reaksiyonlarla yükseltgenerek, okside glutatyon (GSSG) dönüşür. GSSG'nin tekrar indirgenmesi NADPH'nin de kullanıldığı bir reaksiyonla olur. Bu şekilde dokularda GSH/GSSG oranı yüksek tutulmaya çalışılır [89].

Organizmalar kimyasal maddelere maruz kaldığında, dokulardaki GSH konsantrasyonu ile dokuların  $H_2O_2$  ve diğer oksijen radikallerine karşı savunması azalır. Eğer fazla miktarda  $H_2O_2$  ve/veya hidroksil radikaline maruz kalınırsa, GSSG oluşumu artar ve GSH/GSSG oranı küçülür. Artan GSSG ise, bazı enzimleri inaktive eder. GSH

ve GSSG arasındaki bozulan denge, GR ve GPx enzimleri tarafından düzenlenmektedir. *Drosophila*'da ise memeli hücrelerinin aksine, selenyum-bağlı glutatyon peroksidaz bulunmadığından (SeGPx), daha genel bir detoksifikasyon enzimi olan GST'nin bu peroksidaz fonksiyonunu gerçekleştirdiği belirtilmektedir [91].

GSH, içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücreyi oksidatif hasarlara karşı korurken, glutatyon-S-transferazlar ve glutatyon peroksidazlar gibi çok sayıda antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin de önemli bir substratı olarak işlev yapar. GSH, hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) yıkan SeGPx ve dehidroaskorbat redüktaz enzimlerinin substratı olmasının yanı sıra, oksijen ve hidroksil radikallerini de temizler. Ayrıca kuvvetli nükleofilik özellik gösterdiğinden elektrofilik özellikteki toksik ksenobiyotik bileşiklerle konjugasyona girerek onların detoksifikasyonunu sağlar. Böylece DNA, hemoglobin ve eritrosit proteinleriyle kovalent bağ yapmalarını engellemiş olur. Ayrıca membran geçirgenliğinin sağlanması, DNA sentezi, protein konformasyonu ve enzim aktivitesinin ayarlanması gibi görevlerde de yer almaktadır.

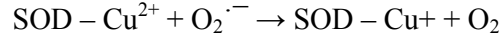
### **1.7.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)**

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan SOD enzimi, oldukça zararlı olan süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) radikalini katalitik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürerek uzaklaştıran ve lipid peroksidasyonu inhibe eden bir metalloenzimdir [92]

Tepkime sonucunda membranları geçemeyen süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), membranları kolayca geçebilen  $H_2O_2$ 'e dönüşmektedir.  $H_2O_2$  ise ağır metal iyonlarının varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile son derece aktif olan hidroksil ( $\cdot OH$ ) radikaline dönüşmektedir [93]. Bu nedenle SOD aktivitesindeki artışın oluşturabileceği aşırı  $H_2O_2$  birikmesinin, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerinin artan aktiviteleri ile kontrol altında tutulabileceği belirtilmektedir [94]. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda üretilen süperoksit radikalinin intraselüler düzeyi, SOD enzimi sayesinde düşük tutulur [95]. Böylece organizma oksidatif hasara uğramaktan korunmuş olur.

Mikroorganizmalardan en yüksek yapıları canlılara kadar, aerobik koşullarda yaşayan canlıların bütün doku, hücre ve hücre organelleri SOD enzimi içerirler [96]. Aktif merkezlerindeki metalin türüne bağlı olarak CuZn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD olmak üzere üç farklı SOD enzimi tanımlanmıştır.

Bunlardan CuZn-SOD enzimlerinin moleküler kütlesi 32.000 civarındadır ve aktif kısımlarında  $\text{Cu}^{2+}$  ve bir  $\text{Zn}^{2+}$  iyonu bulunan iki protein alt ünitesi içerir [97]. CuZn-SOD enziminde bulunan bakır iyonları aşağıdaki tepkimelere göre, oksidasyon ve redüksiyona uğrayarak dismutasyon reaksiyonunda fonksiyon görür. Çinkonun ise katalitik olarak bir rolünün olmadığı, sadece enzimi stabilize ettiği bildirilmektedir.



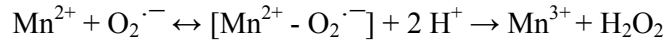
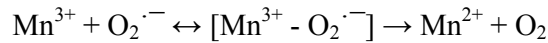
Net reaksiyon ise:



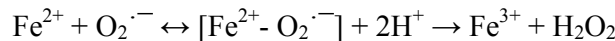
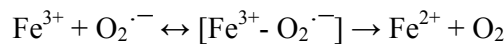
Reaksiyonlar sırasında  $\text{O}_2^{\cdot-}$  anyonu, enzimdeki  $\text{Cu}^{2+}$  ve guanido grubuna bağlanır ve bu esnada  $\text{O}_2^{\cdot-}$  den bir elektron  $\text{Cu}^{2+}$  ye transfer olurken  $\text{Cu}^+$  ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir  $\text{O}_2^{\cdot-}$  anyonu  $\text{Cu}^+$  dan bir elektron ve iki proton alarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluştururken, enzim tekrar  $\text{Cu}^{2+}$  formuna döner [94,98].

Hayvan hücrelerinde CuZn-SOD'lar daha çok sitozolde yerleşmiştir aynı zamanda lizozomlarda, çekirdekte ve iç ve dış mitokondriyel membran arasındaki boşlukta bulunurlar. Siyanür iyonları CuZn-SOD enzimlerinin güçlü inhibitörleridir. Ayrıca dietilditiyokarbamatlar, enzimin aktif bölgesindeki bakırı bağlayarak aktif bölgeden uzaklaştırmak suretiyle enzimi etkisiz hale geçirirler [99].

İlk defa *E. coli*'den izole edilen Mn-SOD enzimi başlıca mitokondri matriksinde yerleşmiştir ve CuZn-SOD enziminden tamamen farklı olduğu ortaya konulmuştur. Bu enzim siyanür ve dietilditiyokarbamatla inhibe olmaz ve molekül kütlesi 40.000 dir. Fakat CuZn-SOD gibi bu enzim de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikalini  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve moleküler oksijene katalizler [94,100].



Fe-SOD genelde iki protein alt ünitesi içerir, her proteinde bir veya iki demir iyonu bulunur. Enzim normal halde iken Fe iyonu +3 değerliklidir, katalitik döngüde  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  arasında dönüşüm gerçekleşir. Diğer SOD tiplerine göre Fe-SOD'ın  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dismutasyon oranı düşüktür. Fe-SOD'ın da Mn-SOD gibi yüksek pH'da aktivitesi düşüktür. Bu enzim de siyanür ile inhibe edilemez [101].



Henüz hiçbir hayvan dokusunda Fe-SOD olduğu rastlanmamışsa da ginkgo biloba, domates ve hardal yaprağı gibi bazı bitkilerde tespit edilmiştir [92].



### 1.7.3. Katalaz

Katalaz, 1937 yılında Sumner ve Dounce tarafından sığır karaciğerinden elde edilmiştir ve aktif kısımlarına hem grubu (Fe<sup>3+</sup>-protoporfirin) bağlı dört protein alt ünitesinden oluşan bir hemoproteindir. Her alt ünite, aynı zamanda enzimi kendi substratı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e karşı koruyan yani enzimi stabil eden (dengede tutan) bir molekül indirgenmiş NADPH taşır.

Katalaz özellikle karaciğer ve eritrositlerde yoğunlaşmış fakat hayvanların tüm organlarında da değişik oranlarda bulunmaktadır. Hücrede ise en yoğun peroksizomlarda ve az miktarlarda mitokondri, kloroplastlar ve endoplazmik retikulumda bulunmaktadır.

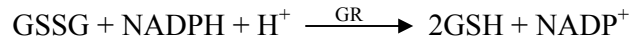
Hidroksil radikali oluşumuna neden olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> canlılar için oldukça zararlıdır ve ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu zararlı molekülü katalaz, su ve oksijene dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır. Ayrıca peroksizomlardaki peroksimal oksidaz enzimlerinin oluşturduğu peroksitleri de ortamdan uzaklaştırmakta görev alır. Basit bir şekilde katalaz varlığında  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2$  olarak reaksiyon gerçekleşmektedir. Ancak hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüştürülmesi, daha karmaşık reaksiyon zinciriyle yapılmaktadır [102].

Katalazın *in vitro* koşullar altında nitriti (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dönüştürebildiği ve vücuda absorbe olan elementel civayı (Hg) da civa II (Hg<sup>2+</sup>) ye okside edebileceği ileri sürülmektedir. *Drosophila*'da katalaz enziminin yapısal geni, 3. kromozomun sol kolu üzerinde 75D1- 76A konumunda bulunur. Katalaz aktivitesi, *Drosophila* gelişimi sırasında üçüncü geç instar larva ve pupa aşamalarında en yüksek düzeyine ulaşır. Ergin bireyler oluşuktan sonra ise katalaz aktivitesi durgun hale geçmektedir. Katalaz, *Drosophila*'da glutatyon peroksidaz bulunmadığından, organizmada oksidatif hasara neden olan oldukça reaktif hidroksil radikallerinin oluşumuna yol açan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin uzaklaştırılmasında temel enzim olarak görev yapar [103].

### 1.7.4. Glutatyon Redüktaz (GR)

Glutatyon reduktaz 478 aminoasitten oluşan, birbirinin aynı olan iki polipeptidinde flavin adenin dinukleotid (FAD) içeren ve molekül ağırlığı 120.000 olan bir flavo enzimdir. Bu nedenle, aktivitesi diyetle alınan riboflavine bağlıdır.

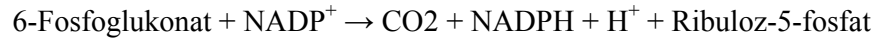
Peroksidazlar tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya diğer lipid peroksidlerin indirgenmesi sırasında redükte glutatyon (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Organizmanın GSH deposu sınırlı olduğundan reaksiyonlarda kullanılması amacıyla okside formun tekrar redükte forma dönüştürülmesi gerekmektedir. Glutatyon reduktaz pentozfosfat yol ağının ürünü olan NADPH ile okside glutatyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) katalizler.



Bu reaksiyonda gerekli olan NADPH, oksidatif pentoz fosfat yolağı olarak bilinen karmaşık bir metabolik yolakta sentezlenir ve bu yolaktaki ilk enzim ise glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimidir.



Oluşan 6-fosfoglukonat ise 6-fosfoglukonat dehidrojenaz enzimi aracılığıyla NADPH'a dönüştürülür.



Oluşan bu NADPH, glutatyon reduktazın alt ünitelerinin aktif bölgesine bağlı FAD'i indirgemektedir. İndirgenmiş FAD'deki elektronlar da GSSG'daki disülfür (-S-S-) köprüsüne aktarılarak disülfür bağı kırılmakta ve molekül GSH haline dönüştürülmektedir. GSSG olmadığı durumlarda NADPH'ın hücre içi düzeyinin azalması glutatyon reduktazı inaktive etmektedir. Oksidatif bir stres sonucu GSSG'nin hücre içi düzeyi artınca glutatyon reduktaz yeniden aktive olmaktadır [104].

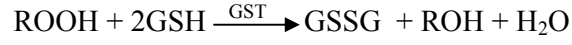
### 1.7.5. Glutatyon S-Transferaz (GST)

GST'lar, evrimsel olarak korunan ve çoğu organizmada bulunan, iki protein alt biriminden oluşan ve esas olarak sitozolde bulunan ve çok sayıda izoenzimi olan bir enzim ailesidir [105]. Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynarlar. Redükte glutatyonun konjugasyonunu elektrofilik ve hidrofobik substratlara katalizleyerek, oksijene karşı daha az reaktif ve daha çok çözünebilen bileşiklere dönüşmesini sağlarlar.



Bu ise membran-temelli glutatyon konjuge pompları (Faz III detoksifikasyonu) tarafından hücrelerden uzaklaştırılmalarını kolaylaştırır [106]. Diğer yandan, başta

araşidonik asit ve linoleaz hidroksiperoksitleri olmak üzere bazı GST izoenzimleri, lipid peroksidlere (ROOH) karşı Se-bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi göstererek antioksidan etkide bulunurlar [105]. Ayrıca sitokrom P-450 tarafından üretilen reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonunda ve lipid peroksidasyonuna karşı hücre membranlarının korunmasında da görev almaktadırlar.



*Drosophila*'da memelilerde bulunan sitozolik ve mikrozomal GST sınıflarından farklı olarak, üç farklı GST enzim sınıfı tanımlanmıştır. Sınıf I ve III GST lerin detoksifikasyonla ilişkili oldukları ve özellikle çeşitli insektisitlere karşı direnç oluşturmada etkin oldukları rapor edilmiştir [106].

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Yapılan Antigenotoksisite Çalışmaları

*Drosophila* kanat benek testi ya da diğer adıyla kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi kompleks karışımların ve çeşitli maddelerin genotoksik ve antigenotoksik aktivitelerini belirlemek için kullanılan güvenli ve çok yönlü bir testtir. Son yıllarda bu test ile bir çok mutajen ve karsinogene karşı çeşitli bileşiklerin ve kompleks karışımların antigenotoksik aktivitesi araştırılmıştır [107,108].

Abraham ve Graf [109], en popüler içeceklerden olan kahvenin siklofosamid, mitomisin C ve üretanın indüklediği somatik mutasyon ve mitotik rekombinasyona karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Çalışmada standart çapraz ve promutajenlere daha duyarlı yüksek biyoaktivasyon çaprazı kullanılmış ve genotoksinler değişik dozlarda ayrı ayrı ve/veya kahveyle birlikte besiyerine eklenerek uygulanmıştır. Çalışma sonucunda her iki çaprazda da artan kahve dozuna bağlı olarak genotoksinlerin indüklediği somatik mutasyon ve mitotik rekombinasyonun azaldığı belirtilmektedir.

Yapılan diğer bir çalışmada, kanser kemoterapisinde kullanılan ve serbest radikal oluşturduğu bilinen doksorobisine karşı, yüksek biyoaktif molekülleri inaktif edebilen antioksidan vitaminlerin antigenotoksik etkisi kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılmıştır. Çalışmada E, A ve C vitaminini ve bakır, çinko ve selenyum minerallerini içeren multivitamin karışımı insanlarda kullanılan dozlara benzer dozlarda doksorobisinin 125 mg/ml dozuna karşı birlikte ve ön uygulama şeklinde kullanılmıştır. Multivitamin karışımı tek olarak uygulandığında benek tiplerinin hiçbirinde önemli bir artış göstermemiştir. Ancak doksorobisin tüm benek tiplerini indükleyerek genotoksik etkisini göstermiştir. Doksorobisin ve multivitamin karışımı birlikte uygulandığında doksorobisinin neden olduğu tüm benek tiplerini multivitaminin azalttığı bulunmuştur. Hem standart çapraz hem de yüksek biyoaktivasyon çaprazından elde edilen larvaların kullanıldığı bu çalışmada, multivitamin (25 ve 50 mg/l) ön uygulaması tüm benek tiplerini önemli miktarda azaltmıştır. Yüksek biyoaktivasyon çaprazında ise 25 mg/l lik dozun küçük tekli benekler hariç diğer tüm benek tiplerini, 50 mg/l lik dozun ise tüm benek tiplerini azalttığı rapor edilmiştir [110].

Doğrudan ya da dolaylı etkili çeşitli monofonksiyonel alkilleyici ajanlara karşı klorofil pigmentinin sodyum-bakır tuzu olan klorofilinin (chlorophyllin) antigenotoksik etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 48 saatlik larvalara, klorofilinin farklı dozlarının bir günlük ön uygulama ile verilmesinin ardından aynı larvalara çeşitli mutajenlerin farklı dozları verilmiştir. Çalışma sonucunda dört farklı monofonksiyonel alkilleyici ajana karşı klorofilin kullanılan en yüksek dozunun (% 5) tüm benek tiplerini azaltarak oldukça güçlü bir antigenotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir [111].

Askorbik asitin (vitamin C) etil metansulfonat (EMS), metil metansulfonat (MMS) ve N-nitrozo N-etilüre (ENU) mutajenlerine karşı antigenotoksik etkisi, *Drosophila* kanat benek testi ile araştırılmıştır. Çalışmada günlük olarak alınması tavsiye edilen askorbik asit miktarı (17 mM) uygulanmış ve askorbik asitin genotoksisiteye neden olmadığı belirlenmiştir. 0.5 mM EMS, 0.1 mM MMS ve 0.01 mM ENU ile birlikte verilmesinin mutajenler nedeni ile oluşan tüm benek tiplerini önemli oranda azalttığı belirtilmiştir [112].

Valaderes ve ark. [113], antitümör bir ajan olan doksorobisine karşı propolisin (arıların reçinelerden doğal olarak yaptığı, kovanlarının çatlaklarını kapattıkları, peteklerin içini kapladıkları, dış saldırılara karşı savunmada ve kovana steril etmede kullandıkları yapışkan bir madde) antigenotoksik etkisini araştırmışlardır. Propolis suda 12.5, 25.0 and 50.0 mg/mL dozlarında olacak şekilde çözülerek ortalama 48 saatlik larvalara her doz ayrı ayrı ve doksorobisinin 0.125 mg/mL dozuyla birlikte verilmiş ve sonuçlar değerlendirildiğinde; hiçbir propolis dozu genotoksik etki göstermemiş ve hatta negatif kontrolde beklenen mutasyonları bile engellediği rapor edilmiştir.

Graf ve ark. [114], üretanın genotoksik etkisinin kahve ile, metil üre ve sodyum nitrat karışımının genotoksik etkisinin ise askorbik asit ve kateşin (bir tür flavonoid) ile önemli düzeyde azaldığını saptamışlardır.

*Helichrysum italicum*, *Ledum groenlandicum* ve *Ravensara aromatica* adlı üç şifalı bitkiden elde edilen uçucu yağların ayrı ayrı ve birlikte verilerek genotoksik etkisi ayrıca uretana karşı antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Uçucu yağların ayrı ya da birlikte verilmesinin genotoksik etkisi olmadığı belirtilirken, üretan ile birlikte verildiklerinde ise üretanın indüklediği benek tiplerini azalttıkları rapor edilmiştir. Ayrıca, eşit oranda karışımlarının ise çok daha etkili antigenotoksisite gösterdiği saptanmıştır. Bu yağların antigenotoksik etkisinin, bileşenlerinin sitokrom P-450 aktivasyon sistemi ile etkileşerek üretanın aktif metabolitlerinin sayısını azaltmasından kaynaklandığı şeklinde açıklanmaktadır [107].

Başka bir çalışmada, yaygın olarak kullanılan altı bitkisel içeceğin (*Matricaria chamomilla* (papatya), *Tilia cordata* (ihlamur), *Mentha piperita* (nane), *Mentha pulegium* (yarpuz, yabani nane), *Uncaria tomentosa* (kedi pençesi) ve *Valeriana officinalis* (kedi otu) genotoksik ve oksidatif bir genotoksikant olan hidrojen peroksitle karşı antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla insanların genellikle günlük aldıkları miktar olacak şekilde hazırlanmış ve standart çapraz larvalarına değişik dozlarda ayrı ayrı ve tek doz hidrojen peroksitle birlikte verilmiştir. İçeceklerden ihlamurun en yüksek dozu toplam benek sayısında pozitif sonuç vermiş ancak diğerlerinin hiçbir dozu genotoksik çıkmamıştır. Hidrojen peroksitin indüklediği tüm benek tiplerini ise tüm içeceklerin azalttığı yani hidrojen peroksitle karşı antigenotoksik etkilerinin olduğu ve bu durumun içeceklerin içeriğindeki fenolik bileşiklerin hidrojen peroksit kaynaklı reaktif oksijen türlerini süpürmelerinden kaynaklandığı belirtilmektedir [115].

El Hamss vd [116], tarafından yapılan çalışmada, kırmızı biber (*Capsicum annuum*) ve karabiberin (*Piper nigrum*) metil metan sulfonata (MMS) ve bir promotajen olan etil karbamata karşı antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada biberlerin eşit miktarları suda bekletilmiş ve süzöldükten sonra ayrı ayrı ve genotoksinlerle ön uygulama ve birlikte uygulama olmak üzere verilmiştir. Kırmızı biberin her iki genotoksinin de neden olduğu benek tiplerini azalttığı, karabiberin ise sadece etil karbamatin indüklediği benek tipleri üzerine inhibitör etki gösterdiği ancak metil metan sulfonatin genotoksik etkisini önleyemediği belirtilmektedir. Her iki türünde antimutajenik etkilerinin metabolik aktivasyonu baskılamalarından veya mutajenlerin aktif gruplarıyla etkileşme girmelerinden kaynaklanmış olabileceği rapor edilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada, yeşil dolmalık biberin bir çeşidinin hazırlanan suyunun (BS) metil üre (MU) ve sodyum nitrite (SN) karşı antigenotoksik etkisi araştırılmıştır. İki günlük larvalara biber suyu % 12.5, % 25 ve % 50 dozlarında, metil üre ve sodyum nitrit 20 mM dozunda ayrı ayrı ve birlikte (MU+SN, MU+BS, SN+BS, MU+SN+BS) uygulanmışlardır. Biber suyunun tüm uygulama gruplarında MU ve SN nin indüklediği benek tiplerini % 40-80 arasında değişen oranlarda azalttığı belirlenmiştir. Bu sonucun, biber suyunun bileşenlerinden olan ve nitroso bileşiklerinin neden olduğu genotoksisiteyi önlediği bilinen C vitamininden kaynaklandığı belirtilmektedir [117].

## 2.2. *Drosophila*'da Glutasyon ve Antioksidan Enzim Düzeyleri ile İlgili Olarak Yapılan Çalışmalar

İnsanda belirlenen 300 hastalık geninin yaklaşık % 61 inin *Drosophila* genomunda da bulunduğu belirtilmektedir [118]. Ayrıca *Drosophila*'nın insanda oksidatif stresle ilişkili olan Parkinson, Alzheimer, Huntington gibi hastalıklar ve nörodejeneratif bozuklukların başarılı bir şekilde araştırılmasında kullanıldığı belirtilmektedir [119]. İlave olarak, *Drosophila*, kısa ömürlü ve kısa jenerasyon zamanlı olmasından dolayı, yaşlanmanın genetik belirteçlerinin araştırılmasında ve serbest radikallerin yaşlanma ve ömür uzunluğu üzerine etkilerinin antioksidan sistemlerle engellenmesi ile ilgili araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [120].

Diyetsel yağlar *Drosophila*'da yaşlanma sürecini hızlandırır ve lipid hidroperoksit (LPO) birikimiyle yüksek oranda ölüme neden olur. *Drosophila* Oregon-R-C soyunun erkeklerine, yağların indüklediği ölümleri engellemek ve yaşam sürelerini uzatmak amacıyla brokoli ekstraktları (BE) ve yeşil çay kateşinleri (YÇK) besiyerine eklenerek verilmiştir. Yağ olarak domuz yağından hazırlanan yağ asitleri kontrol amacıyla % 1, % 5, % 10, % 15, % 20 ve % 25 hacimlerinde her doz için 10 tüp ve her tüpde 20 erkek sinek olacak şekilde uygulanırken, 10 mg YÇK ve 50 mg BE ayrı ayrı % 5 ve % 10 yağ asitleriyle birlikte verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubunda sineklerin ömür uzunluğunun 55 gün ve % 50 sinin (dozun uygulandığı sineklerin % 50 si) yaşadığı zaman 38 gün olarak bulunurken, % 25 yağ asidi içeren grupta ise ömür uzunluğu 6 gün ve % 50 sinin yaşadığı zaman ise 4 gün olarak belirtilmektedir. YÇK ve BE eklenen tüm gruplarda ömür uzunluğunun ve % 50 sinin yaşadığı zamanın arttığı rapor edilmiştir. Bu durum yağ asitleri ile birlikte verilen YÇK ve BE ile beslenen sineklerde LPO seviyesinin önemli düzeyde azalmasıyla açıklanmıştır. Ayrıca katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin de sadece yağ asitleriyle beslenen sineklerle karşılaştırıldığında önemli düzeyde arttığı belirtilmektedir [121].

Le Bourg ve ark. [122], 2000 yılında ve önceki yıllarda *Drosophila melanogaster*'de yüksek yerçekiminin (hypergravity) (3 g ve 5 g) etkisini çalışmışlardır. Buna göre, yüksek yerçekiminin yaşlanma davranışlarını geciktirdiği, erkek sineklerde ömür uzunluğunu ve her iki eşeyde de sıcağa karşı direnci artırdığını ortaya çıkarmışlardır. Bu pozitif durumun iki önemli enzim olan SOD ve katalazla ilişkisinin varlığını araştırmak amacıyla yapılan çalışmada ise, yine sinekler iki hafta süreyle aynı yüksek yer çekimlerine maruz bırakılmış ve ayrıca dünya yerçekiminde de (1 g) kontrol

grupları oluşturulmuştur. Sonuçta iki, dört ve altı haftalık sineklerdeki enzim aktiviteleri üzerine yüksek yerçekiminin etkisinin olmadığı rapor edilmiştir.

Diğer bir çalışmada yaşa bağlı olarak *Drosophila* Oregon yabanıl tipi ve mutant körelmiş kanat soylarında katalaz, glutatyon redüktaz aktivitesinde ve total glutatyon miktarındaki değişimler ve iki soyun erkekleri arasındaki ömür uzunluğu farklılıkları araştırılmıştır. Oregon yabanıl tip erkeklerinin körelmiş kanatlı erkeklerden daha uzun ömürlü oldukları, Oregon soyunda maksimum ömür uzunluğu 85 gün iken körelmiş kanat soyunda 56 gün olduğu belirtilmiştir. Her iki soyda da yaşa bağlı katalaz aktivitesindeki değişimlerin benzer olduğu ve yaşlanma sürecinde ise azalma gösterdiği, Oregon yabanıl soyunda glutatyon redüktaz aktivitesinin 10. ve 40. günler arasında arttığı ancak bundan sonra aniden azaldığı, körelmiş kanat soyunda glutatyon redüktaz aktivitesinin ise ilk 40 gün azaldığı ancak sonraki süreçte aniden arttığı belirtilmektedir. Redükte glutatyon ve okside glutatyon miktarlarının Oregon yabanıl soyunda 40. güne kadar yavaşça arttığı sonra aniden azaldığı, vestigal soyunda ise ilk on gün durağan kaldıkları yirminci günlerde aniden azaldığı ve sonrasında her ikisinde miktarlarının arttığı rapor edilmektedir [123].

Yapılan bir başka çalışmada, farklı düzeylerde katalaz aktivitesine sahip mutant soylar kullanılarak, katalaz aktivitesiyle ömür uzunluğu ve antioksidan savunma sistemindeki bazı parametrelerin ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmada heterozigot ve katalaz aktivitesi bulunmayan  $cat^{n1}/cat^{n4}$  ve yaklaşık % 14 oranında katalaz aktivitesi gösteren homozigot  $cat^{n2}$  soyları ve referans (kontrol) stok olarak da *cp in ri pP* kullanılmıştır. Sonuçlara göre düşük katalaz aktivitesinin ve katalaz aktivitesi yokluğunun ortalama ve maksimum ömür uzunluğunu etkilemediği, glutatyon konsantrasyonunun ise  $cat^{n2}$  sineklerinde artma eğiliminde olduğu, gama-glutamilsistein sentez aktivitesinin  $cat^{n1}/cat^{n4}$  sineklerinde önemli düzeyde yüksek olduğu, her iki soyda da SOD ve glutatyon redüktaz aktivitelerinde farklılık olmadığı belirtilmektedir [124].

Durusoy ve ark. [125], Oregon yabanıl tip, siyah vücut rengi (ebony mutant) ve Oregon dişileri ve ebony erkeklerinin çaprazlanmasıyla elde edilen hibrit sineklerinde, yaşa bağlı katalaz aktivitesi ve ömür uzunluğunu çalışmışlardır. Ömür uzunluğunda her iki eşey kullanılırken, katalaz aktivitesinde sadece erkek sinekler kullanılmış ve eşey farkı gözetmeksizin ortalama ömür uzunluklarının ebony için 42 gün, Oregon yabanıl tip için 54 gün ve hibrid bireyler için ise 66 gün olduğu rapor edilmiştir. Katalaz aktivitesi ölçümlerinin ikinci günden başlamak üzere birer hafta arayla tüm sinekler ölene kadar yapıldığı ve ebony mutant sineklerde katalaz aktivitesinin başlangıçta



Oregon yabanıl tipe göre oldukça yüksek ve 9. günde ise başlangıca göre ani bir yükseliş olduğu sonrasında ise aktivitenin azalarak devam ettiği belirtilmektedir. Oregon yabanıl tip ve hibrid sineklerde ise başlangıçta katalaz aktivitesi benzer ancak Oregon yabanıl tipde 9. günde, 16. günde ve 23. günde aniden artış gösterdiği, sonrasında ise yavaşca azaldığı belirtilmektedir. Hibrid sineklerde ise 9. günde aniden arttığı sonrasında ise yavaşca azaldığı ancak ebony mutantından düşük aktivite gösterdiği rapor edilmektedir

Uzun süre fenole maruz kalmanın oluşturabileceği toksik etkilerin araştırıldığı bir başka çalışmada; glutatyon-S-transferazların enzimatik aktiviteleri, mRNA miktarındaki değişim ve ergin sineklerin yaşayabilirlik oranları araştırılmıştır. Glutatyon-S-transferazların enzim aktivitelerinin fenole maruz kalmaya bağlı olarak indüklendiği ve yabanıl tip sineklerin fenolün toksik etkisine karşı direnç geliştirdikleri belirtilmiştir [126].

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise paraquat ve hidrojen peroksit maruz bırakılan *Drosophila melanogaster* erginleri brokoli, lahana, çin lahanası ve havuç özütü ile beslenmiş ve brokoli özütünün, sineklerin toplam vücut lipid hidroksiperoksit düzeyini düşürerek ve CuZnSOD, MnSOD ve katalaz enzim aktivitelerini artırarak ortalama yaşam ömrünü, kontrole ve diğer üç sebze özütü ile beslenen erginlere göre arttırdığı rapor edilmektedir [127].

### **2.3. Flavonoidlerin Antigenotoksik ve Antioksidan Etkileri ile İlgili Yapılan Çalışmalar**

Son yıllarda çeşitli kanserojenlere, mutajenlere ve genotoksinlere karşı koruyucu etkilerinin gösterilmesinden ve antioksidan özelliklerinden dolayı flavonoidlere ilgi artmıştır. Antioksidan aktiviteleri ve serbest radikal süpürme yeteneklerinden dolayı yaşlanma ve hastalıkları önlediği yönündeki iddialar nedeniyle flavonoidler, günümüzde besinlere ilave olarak kullanılmaya başlanmıştır [128]. Flavonoidlerin antigenotoksik ve antioksidan etkileriyle ilgili çeşitli test sistemlerinin kullanıldığı çalışmalar vardır ve aşağıda özetlenmiştir.

İnsan melanom HMB-2 hücreleriyle yapılan *in vitro* bir çalışmada luteolin ve kuersetin flavonoidlerinin hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) indüklediği DNA hasarına ve çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan Melfalanın (MH) indüklediği kromozomal aberasyonlara karşı koruyucu etkileri iki farklı test kullanılarak araştırılmıştır. Tek hücre

jel elektroforezi kullanılarak yapılan çalışmada, flavonoidler 20, 50, ve 100 µmol/l ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µmol/l dozlarında hücrelere uygulanmış, her iki flavonoidin de doz artışına paralel olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in indüklediği DNA hasarlarını önemli düzeyde (20 µM dozunda %40 iken 100 µM da ise %80 olarak) engellediği belirtilmiştir. Kromozomal aberasyonların araştırıldığı teste ise MH'ın 750 ng/ml dozuna karşı kuersetinin 20 ve 50 µM ve luteolinin ise 5, 10 ve 20 µM dozları kullanılmış, en yüksek dozların MH'ın indüklediği kromozomal aberasyonları önemli düzeyde engellediği rapor edilmiştir [129].

Yapılan bir çalışmada, mitomisin C'nin farklı dozlarının (0.5, 1 ve 1.5 mg/kg) fare eritrositlerinde indüklediği mikronukleus oluşumuna karşı bir flavonoid olan galanginin farklı dozlarının (0.1, 1, 10 ve 100 mg/kg) etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, galangin, mitomisin C den 24 saat önce, 24 saat sonra ve bir hafta hergün galangin uygulamasından sonra mitomisin C olmak üzere farklı uygulamalar ile verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, galanginin tüm uygulama gruplarında mikronukleus oluşumuna neden olmadığı ve mitomisin C tarafından indüklenen mikronukleus oluşumunu ise doza ve uygulama guruplarına bağlı olarak değişen oranlarda baskıladığı belirtilmiştir [130].

Öglena'da yapılan bir çalışmada, süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olarak öglenada geri dönüşümsüz beyaz rengin oluşumundan sorumlu antibakteriyel bir ilaç olan ofloxacinin, 43 ve 86 µmol/L dozlarına karşı değişik flavonların, flavonollerin ve flavononların etkisi araştırılmıştır. Kullanılan tüm flavonoidlerin içinde en etkili antimitojenin galangin olduğu ve bunun da yapısındaki yedinci karbona bağlı, C(7), hidroksil grubunun süperoksit anyonlarını süpürmede önemli olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir [131].

Edenharder ve Grünhage [132], mirisetin ve luteolinin de yer aldığı 40 tane flavonoidi kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, tersiyer-bütül hidroperoksite (BHP) ve kümen hidroperoksite (CHP) karşı flavonoidlerin antijenotoksik etkisini araştırmak amacıyla *S. typhimurium* TA102 bakterisiyle Salmonella testini ve peroksil radikalleri oluşturan 2.2'-azo-bis (2-amidinopropan) dihidroklorit (AAPH)'e karşı flavonoidlerin radikal süpürücü etkilerini araştırmak amacıyla da kırmızı kan hücreleriyle hemoliz testini kullanmışlardır. BPH ve CHP'nin indüklediği mutajenik etkiyi, kullanılan flavonoidlerin değişen oranlarda azalttıkları ve luteolinin yapısı nedeniyle mirisetinden daha etkili bir antimitajenik flavonoid olduğu belirtilmektedir. AAPH'nin oluşturduğu peroksil radikallerini süpürmede yine en etkili

flavonoid luteolin olarak belirtilirken, flavonoidlerin BPH ve CHP'ye karşı antigenotoksik etki göstermelerinin onların radikal süpürücü etkilerinden kaynaklandığı rapor edilmektedir.

Diğer bir çalışma, sıçan hepatositleriyle yapılmış ve mirisetinin demirin indüklediği DNA oksidasyonunu tamir edebilme yeteğinin varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada ferrik nitrilotriasetat (Fe-NTA) ile hepatositler 4 saat inkübe edilmişler ve DNA bazlarında oksidasyon oluşturulmuştur. Bu oksidasyon demirin lipid peroksidasyonunu indüklemesiyle ilişkilendirilmiştir. Demirle birlikte artan konsantrasyonda mirisetin eklenmesinin, lipid peroksidasyonunu ve DNA bazlarının oksidasyonunu önlediği bulunurken, bu sonucun mirisetinin DNA tamir mekanizmalarını aktive etmesinden ileri geldiği belirtilmektedir [133].

Taj ve Nagarajan [134], sıçanlarda önce çok kızartılmış balık ve koyun pizolasının klastojenik etkilerinin olduğunu gösterdikleri bir çalışma yapmışlar ve bu klastojenik etkilere karşı luteolin ve kuersetin flavonoidlerinin koruyucu etkisini yine sıçanların kemik iliğinde araştırmışlardır. Sıçanlar çok kızartılmış balık ve etle beslenirken flavonoidler ön uygulama, birlikte uygulama ve besin sonrası uygulama şeklinde sıçanlara verilmiş ve sonuçlar mikronukles oluşumu ve kromozomal aberrasyonların varlığı olarak değerlendirilmiştir. Her iki flavonoidin de tüm dozlarının mikronukleus oluşumunu ve kromozom aberrasyonunu inhibe ettiği, ancak en etkili sonucun flavonoidlerin ön uygulaması ile elde edildiği ve ayrıca luteolinin daha etkili bir antigenotoksik ajan olduğu belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada kanser tedavisinde kullanılan bleomisin adlı ilacın indüklediği kromozom aberasyonlarının galangin ile ihibisyonu fare dalağı lenfositlerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılmıştır. Hem *in vivo* hemde *in vitro* olarak uygulanan galanginin bleomisinin indüklediği kromozom aberasyonlarını baskıladığı rapor edilmektedir [135].

İnsan lenfositlerinde hidrojen peroksidin ( $H_2O_2$ ) indüklediği DNA hasarlarına karşı mirisetin, kuersetin, silmarin,  $\alpha$ -tokoferol ve  $\beta$ -karotenin antigenotoksik etkileri tek hücre jel elektroforezi yöntemiyle araştırılmıştır. Kuersetin doz artışına paralel olarak DNA kırıklarını ve bazların oksidasyonunu kullanılan tüm dozlarda engellerken, mirisetinin sadece 100  $\mu$ M dozu etkili olmuştur. Diğer uygulanan maddeler ise hiçbir dozda antigenotoksik etki göstermemişlerdir. Katalaz, glutatyon reduktaz ve peroksidaz aktivitelerinin hücre kültüründe azaldığı, bundan dolayı mirisetin ve kuersetinin

doğrudan hidrojen peroksitin indüklediği DNA hasarlarını engellediği belirtilmektedir. [136].

Farelerde naftalinin neden olduğu oksidatif strese karşı resveratrolün koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, malondialdehit (MDA) ve glutatyonunda (GSH) bulunduğu çok sayıdaki parametreye çeşitli dokularda bakılmıştır. Çalışmada BALB-c farelerine sadece naftalin (100 mg/kg) ve naftalinle birlikte resveratrol (10 mg/kg) verilmiştir. Sadece naftalin uygulanan grupta doku GSH düzeyi azalırken MDA düzeyi artmış ancak resveratrol eklenen gruplarda bu parametrelerin zıt yönlü olarak değiştiği yani MDA düzeyinin azalırken GSH düzeyinin arttığı rapor edilmiştir. Bu sonuçla ilişkili olarak resveratrolün oksidan ve antioksidan dengeyi sağlamada rolünün olduğu belirtilmiştir [137].

Sgambato ve ark [138], resveratrolün insan göğüs, kolon ve prostat kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak hücre büyümesini ve kültürdeki hücre sayısını azalttığını belirtmişlerdir. Ayrıca, resveratrolün yoğun sigara dumanı ve hidrojenperoksit gibi oksidatif ajanlara maruz kalınması sonucunda reaktif oksijen türlerinin artmasını engellediğini rapor etmişlerdir. Böylece resveratrolün antioksidan etkisinden dolayı birçok genotoksinin neden olduğu oksidatif DNA hasarını önlediğini belirtmişlerdir.

Ağır metal iyonlarına ve serbest radikal saldırılarına çok duyarlı C12 olarak adlandırılan sinir hücreleriyle yapılan bir çalışmada, etanolün indüklediği lipid peroksidasyonu ve hücre ölümüne karşı resveratrolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Alkol ve resveratrolün birlikte uygulanması sonucunda hücrelerin oksidatif hasardan korunduğu ve oksidatif stresin indüklediği hücre ölümlerini engellediği ve resveratrolün güçlü bir antioksidan olduğu rapor edilmektedir [139].

Başka bir çalışmada, böbrek kanserinin oluşumunda özel rolü bulunan potasyum bromatın neden olduğu oksidatif DNA hasarının önlenmesinde resveratrol, vitamin E, melatonin ve  $\alpha$ -fenil-N-terciyer-butil nitron (PBN) antioksidanlarının etkisi sıçan böbreğinde araştırılmıştır. Sıçanlara önce antioksidanlar sonra potasyum bromat uygulanmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle deoksiguanozin (dG) temel alınarak 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (oxo<sup>8</sup>dG) ölçümü yapılmış ve potasyum bromat kaynaklı brom radikallerin ve oksitlerin (Br<sup>•</sup>, BrO<sup>•</sup> ve BrO<sub>2</sub><sup>•</sup> gibi radikaller) gözlenen DNA hasarında doğrudan sorumlu olduğu ve resveratrolün tamamıyla diğer antioksidan maddelerin ise kısmen oxo<sup>8</sup>dG oluşumunu engelledikleri belirtilmektedir. Böylece böbrek dokusunu potasyum bromatın indüklediği oksidatif DNA hasarına karşı çeşitli antioksidanların koruyabildikleri gösterilmiştir [140].

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Organizma ile İlgili Genel Bilgiler

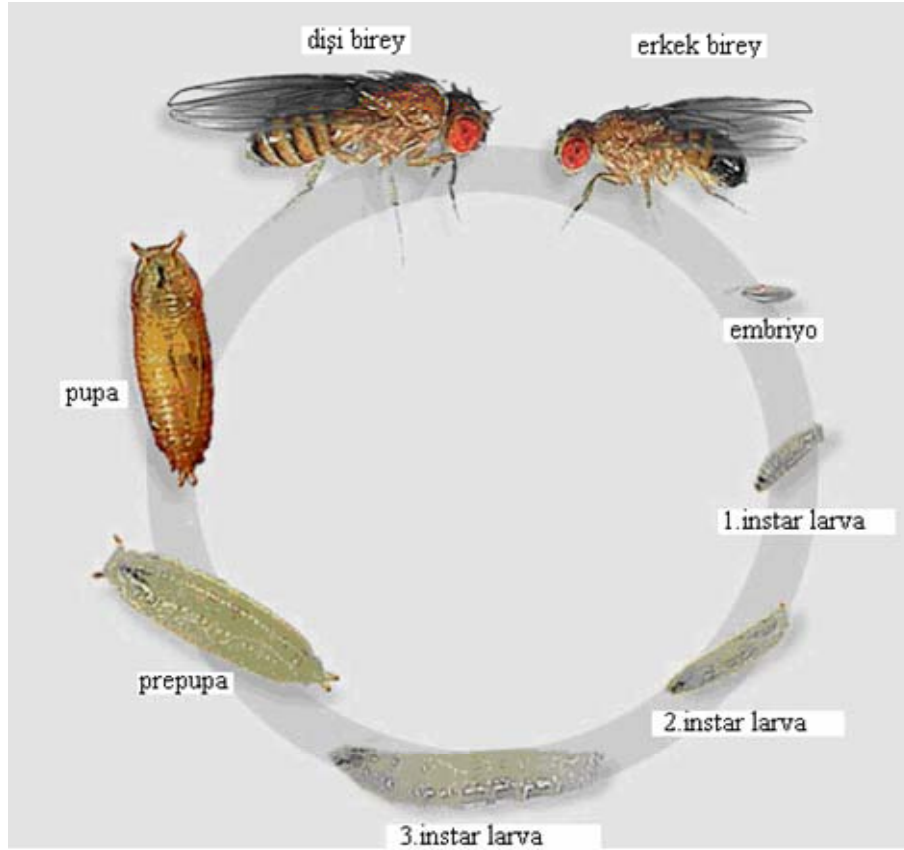
*Drosophila* hayvanlar aleminin *Insecta* sınıfına dahil olan *Diptera* takımının *Drosophilidae* familyası (sirke sinekleri) içinde yer alır. *Drosophila* larvaları, ekşiyen meyveler üzerinde geliştiği için meyve sinekleri olarak da adlandırılmaktadır. Bu familya genetikte deney hayvanı olarak kullanılan *Drosophila melanogaster*'i de içeren pek çok türü kapsar [141].

*D.melanogaster* ilk kez 1910 yılında Thomas Morgan tarafından genetik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Genetik çalışmalarda *Drosophila*'nın tercih edilmesini sağlayan ve diğer organizmalara üstün kılan birçok özelliğinden bazıları aşağıda verilmektedir [142,143].

- *Drosophila* çok çeşitli doğal ya da mutant varyasyonların gözlenebildiği bir organizmadır ve mutant bireylerde kıl tipi, göz şekli, göz rengi, vücut rengi kanat şekli gibi farklı fenotipik özellikleri çıplak gözle ya da binoküler mikroskop altında incelemek oldukça kolaydır.
- Yumurtadan çıktıktan sonra  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve % 40- 60 bağıl nemde yaklaşık 9-10 günde ergine gelişip ürmeye başladığından hayat devri çok kısadır.
- Bir dişi birey günde ortalama 40- 50 yumurta bırakır. Yani bir defada oldukça fazla sayıda döl elde edilebilir olması genetiksel özellikleriyle ilgili bilginin doğru belirlenmesi ve sonuçların güvenilirliği açısından oldukça önemlidir.
- Laboratuvarında kültürleri kolaylıkla yapılabilir ve besinleri ucuzdur.
- Az sayıda ve kolay incelenebilen kromozoma sahip olmalarının yanı sıra üçüncü evre larvalarının tükürük bezlerinde de dev kromozomların bulunması kromozom haritaları ve kromozom fonksiyon analizlerinin yapılmasını sağlar.
- Arı döl olarak saklanabildikleri gibi kontrollü çaprazlamaların yapılabilmesi için en uygun organizmalardan biridir.
- *Drosophila* genetik olarak aktif türlerde promutajen ve prokarsinojenlerin geniş bir dizisinin değiştirilmesi için potansiyel enzimatik aktiviteye sahiptir. Ayrıca memelilerinkine benzer bir detoksifikasyon sistemi bulunduğu da gösterilmiştir.

### 3.1.1. *Drosophila melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

Dört çift kromozomları bulunan ve tam bir metamorfoz geçiren meyve sinekleri, yumurta (embriyonik), larva, pupa ve ergin olmak üzere hayat döngüsünde dört farklı evreye sahiptir. (Şekil 3.1). *Drosophila*'nın ideal yaşam şartları  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve % 40-60 bağıl nem ortamıdır ve bu şartlarda yumurtadan ergine gelişme süreleri ortalama 9-11 gündür [74]. *D. melanogaster*'in yumurtadan ergine gelişim evreleri ve ömür uzunluğu sıcaklık, beslenme, populasyon yoğunluğu, radyasyon, nem gibi çeşitli faktörler tarafından farklı şekilde etkilenmektedir [144].



Şekil 3.1. *Drosophila*'nın yaşam döngüsü [145]

*D. melanogaster* dişileri pupadan çıktıktan 2- 3 gün sonra yumurtlamaya başlar. Dişinin yaşamı boyunca yumurta üretimi sabit değildir, türlere göre 6. ile 10. günler arasında maksimuma çıkar ve geometrik olarak sabit hızla düşer. Yumurtanın döllenmesi uterusunda gerçekleşir ve dişi yumurtalarını ya döllenmeyi takiben hemen besiyerine bırakır ya da embriyo gelişiminin ilk dönemlerini uterusunda geçirir. Yumurtalar türlere göre farklılık gösterse de ortalama 0.5 mm uzunluğunda olup genel

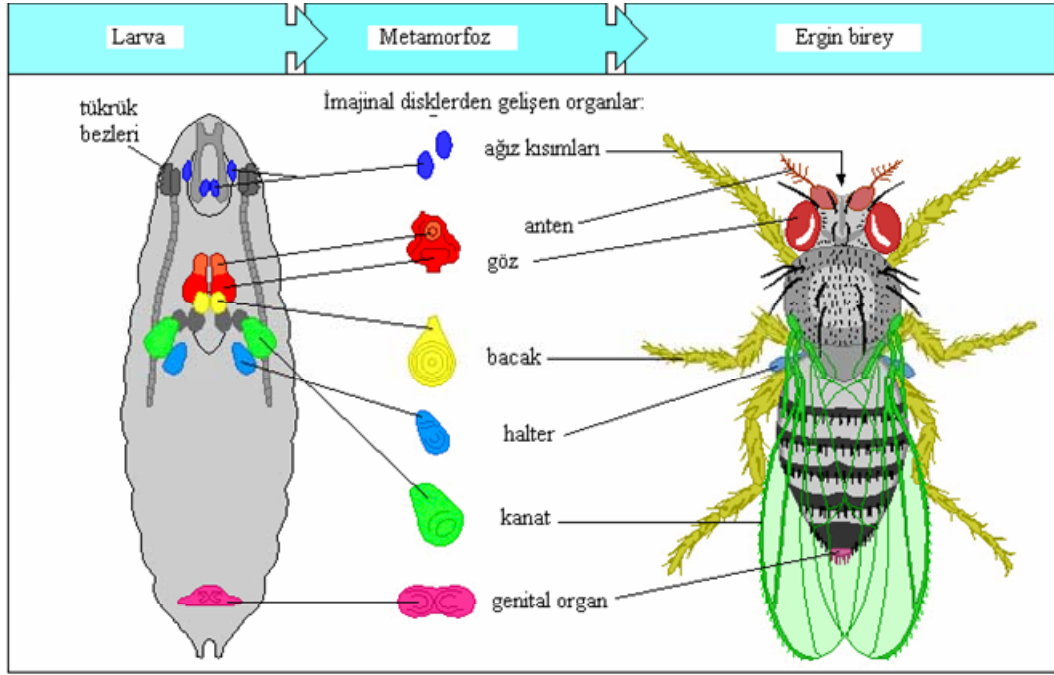
olarak oval şekilli ve şeffaf görünümündedir. Yumurta, folikül epiteli tarafından salgılanan ve yumurtayı koruyan korion ile çevrilidir. Anterior tarafta korion tabakasının uzantıları olan, yumurtanın bırakıldığı yumuşak zemine batmasını önleyen ve oksijen alınımından sorumlu olan türlere göre sayısı ve uzunluğu değişen filamentler bulunmaktadır. Yumurtalar  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  de 22–24 saat içinde açılarak zigot embriyonel gelişimi tamamlanmış olur ve ergine hiç benzemeyen larva çıkar [146].

Genç larva genellikle yumurtanın ön kutbundan iç basıncın yükselmesi ve kasların kontraksiyonu ile korionu patlatarak çıkar [147]. Beyaz renkli ve segmentli kurtçuk benzeri larvalar sürekli beslenerek besiyerinin içine doğru ilerler ve yaklaşık beşgünlük varlıkları süresince kendi ağırlıklarının üç katını tüketerek 0.05 mg dan 0.20 mg ağırlığına ulaşırlar [148]. Larval gelişim sırasında gömlek değiştirme olarak adlandırılan, kütikül tabakasının iki kez yenilenmesi larval yaşamı üç evreye ayırır. İki gömlek değiştirme arasındaki peryota “instar” denmektedir böylece larval yaşamda yumurtadan çıkma ile ilk gömlek değiştirme 1.instar, ilk gömlek değiştirme ile ikinci gömlek değiştirme arası 2. instar ve ikinci gömlek değiştirmeden sonra pupalaşmaya kadar 3.instar olarak adlandırılmaktadır. Bu instarların süreleri; 1.instar 1gün, 2.instar 1gün ve 3. instar 2-3 gündür Larva 3.instar döneminde yaklaşık 4-4.5 mm uzunluğunda olabilir [149,150].

Embriyo gelişimi sırasında imaginal diskler olarak adlandırılan yapılar gözlenir (Şekil 3.2). Bu imaginal disk hücreleri larva dönemi süresince mitoz bölünme ile pupa evresine kadar çoğalır. Pupa evresinde bu hücre grupları erginin farklı organlarını oluşturur. Örneğin, göz bir göz imaginal diskinden, kanat bir kanat imaginal diskinden meydana gelir. 1.instar sırasında kanat diskinde yaklaşık olarak 50-100 hücre bulunurken erken pupa evresinde kanat farklılaşması başladığı zaman hücre sayısı yaklaşık 30000 olur [150,151]. Larva üçüncü instarın sonunda iken beslenmelerini tamamlayıp bulunduğu besiyerini terk eder ve bulunduğu kabın kuru yerine geçer.

Bu evre prepupal dönemdir ve larvalar buldukları kabın duvarına tırmanırlar. Bu aşamada ektisteroid hormonun artışıyla kendilerini çevreleyen kütikül sertleşir ve buldukları yerde sabitleşerek pupa dönemine geçmiş olurlar. İlk başta beyaz olan pupa iki saat sonra sarı-kahve rengi alır. Pupa aşamasında bir erginin organları ve vücut formuna sahip bir bireyin gelişmesi için gerekli dönüşümler gerçekleşir. Bu gelişme  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve % 40-60 bağıl nemde 4-5 günde tamamlanır. Gelişimin tamamlanması ile pupanın rengi koyulaşır, kıvrılmış durumda olan kanatlar iki koyu eliptik yapı olarak

görülebilmek ve göz pigmentleri belirginleşir. Ergin, pupa kılıfının anteriorunu delerek ortaya çıkar [151,153].



**Şekil 3.2.** Larvada imajinal disk yerleşimi ve erginde oluşturduğu yapılar [152]

Pupadan yeni çıkan ergin bireyler açık renkli, pigmentsiz ve uzun vücutludur. Fakat bir kaç saat içinde pigmentasyon gerçekleşir ve koyulaşır. Aynı zamanda başlangıçta kırışık olan kanatları açılarak normal ergin görünümünü alırlar. Erkek bireyler bir iki saat içinde eşeyssel olgunluğa ulaşırken, dişi bireyler 3.5-4 saat sonra eşeyssel olgunluğa erişirler ve çifleşme yani döllenme olmaksızın yumurta bırakabilirler. Ancak döllenmemiş yumurtalar açılmaz [146,150]. Ergin bireylerde vücut baş (kaput), göğüs (toraks) ve karın (abdomen) olmak üzere üç kısma ayrılır. Baş ve toraks duyu organı olarak görev yapan kıllarla kaplıdır. Altı segmentten oluşan başın iki yanında petek gözler, tepesinde üç tane basit göz ile iki anten bulunur. Toraks üç segmentten oluşur ve her segmentte bir çift bacak bulunur. İkinci segmentte bir çift kanat yer alırken üçüncü segmentteki kanatlar körelmiş ve bunlar halter organına dönüşmüştür [154]. Abdomen dişi ve erkek bireylerde farklılık göstermektedir. Dişi bireylerin abdomeninin ucu uzun ve sivri, erkek bireylerinki daha kısa, yuvarlak (küt) ve siyahtır. Bu özellikler cinsiyetin belirlenmesinde yeterlidir ancak çok genç erkeklerde, abdomendeki pigmentasyon yoğunlaşmadığından dişi birey seçiminde hatalar olabilir. Cinsiyetin tam olarak anlaşılması için erkeklerin birinci çift bacağındaki, eşey tarağı olarak adlandırılan koyu renk sıra sıra kıllar karakteristiktir [142,151].



### 3.2. Kullanılan *Drosophila* Stoklarının Genetik Özellikleri

Çalışmada kullanılan normal metabolik aktiviteye sahip stoklar Temmuz 2005 tarihinde Brezilya Federal do Rio Grande do Sul Üniversitesi Genetik Bölümü'nden Heloisa Helena Rodrigues de Andrade tarafından gönderilmiş ve o tarihten itibaren bölümümüzdeki *Drosophila* için ideal yaşama koşulları olan 25°C'de % 60 bağıl nem ortamının sağlandığı insekteryumda standart besin ortamında kültüre alınarak genetik yönden homojen olarak yaşatılmaktadır. Somatik mutasyon ve rekombinasyonları belirlemek için bu stokların üçüncü kromozomları üzerinde bulunan iki belirleyici gen kullanıldı. Stokların genetik yapısı şu şekildedir;

1.  $flr^3 / ln (3LR) TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e^s Bd^S$  bu stok kısaca  $flr^3 / TM3, Bd^S$  olarak gösterilmektedir.

2.  $mwh/mwh$

$flr^3$  geni fenotipe çeşitli şekillerde olabilmektedir. Sineklerin kanatlarındaki normal, düz ve uzun kıllar yerine, kısalmış nokta şeklinde, koyu renkli balon şeklinde veya kalın ve düzgün olmayan bir şekilde olmak üzere çeşitlilik göstermektedir [155].  $flr^3$  (3-38,8) geni homozigot halde iken embriyonik evrede letal etki gösterdiğinden [156,157] bu geni taşıyan bireyleri letal etkiden korumak ve de rekombinasyonu baskılamak için dengeleyici TM3 kromozomu ile birlikte bulunmaktadır. Ancak kanat imajinal disklerindeki homozigot hücreler yaşayabilir ve mutant kanat hücrelerine gelişir.

Belirleyici genlerimizin diğeri ise  $mwh$  (3-0.3), yani normal durumda bir hücreden bir kanat kılı (trikom) yerine aynı hücreden üç veya daha fazla kanat kılının çıkması şeklinde kendini ifade eder. Homozigot  $mwh$  soyu olarak yaşatılabilir. [76,155].

Çalışmada belirleyici olarak kullanılan  $mwh, flr$  genleri *Drosophila*'nın en büyük kromozomu olan üçüncü kromozom üzerinde bulunduğundan belirleyici genler arasındaki mesafenin uzak olması rekombinasyon ve mutasyonların incelenmesi açısından avantaj sağlamaktadır.

### 3.3. Çalışmada Kullanılan Çapraz

Çalışmada normal düzeyde sitokrom P-450 aktivitesine sahip standart çapraz (ST) kuruldu. Standart çaprazı kurmak için  $mwh$  erkekleri ve yumurta verimi daha fazla olan  $flr^3/TM3, Bd^S$  soyunun bakire dişileri kullanıldı.

### 3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agar agar, dietil eter, propiyonik asit, gliserol, kloral hidrat Merck'ten; ortofosforik asit Atabay Kimya Sanayi Ltd. şirketinden; arap zımkı (gum arabic) Sigma'dan; MNU Sigma'dan, Mitomycin C Serva'dan, Siklofosfamid MP'den temin edildi. Flavonoidler olan galangin, mirisetin ve luteolin Fluka'dan, resveratrol ise Sigma'dan ve hazır *Drosophila* besiyeri Ward's Biology'den temin edildi. Enzim aktivite tayininde kullanılan kimyasallar olan sitokrom-c, ksantin, ksantin oksidaz, GSSG (okside glutatyon), GSH (redükte glutatyon), DTNB{(5-5'ditiyobis (2-nitrobenzoik asid))}, GSSG-redüktaz, SOD (süperoksid dismutaz) ve NADPH (B-Nikotinamid Adenin dinükleotid (redükte) Sigma Chemical Company'den, NaOH, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, EDTA (etilen diamin tetra asetik asid) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Merck firmasından temin edildi.

### 3.5. Deney Koşulları

#### 3.5.1. Çevre Koşulları

Bütün stok kültürleri ve deney sistemleri 25 ±1<sup>0</sup>C sıcaklık ve % 40-60 bağıl nem ve karanlık ortama sahip Biyoloji Bölümü'ndeki insekteryumda tutuldu. Çalışmalar sırasında yalnızca seçme, aktarma, larva toplama ve preparat hazırlama işlemleri aydınlık ortamda yapıldı.

#### 3.5.2. Besiyerinin Hazırlanışı

Çalışmalarımız sırasında *Drosophila* kültürlerinin saklanması, çoğaltılması ve çaprazlanması aşamalarında Bozcuk [158] tarafından geliştirilen standart besiyeri kullanıldı. Kanat benek testinin bir bölümünde ve enzim çalışmaları için larva toplanması aşamalarında ise hazır *Drosophila* besiyeri kullanıldı. Standart besiyeri mısır unu, toz şeker, bira mayası, agar agar ve asit karışımından oluşmaktadır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** Sandart *Drosophila* besiyeri için gerekli olan sarf malzemeler ve miktarları

Sarf Malzeme	Miktar
Mısır unu	52 g
Şeker	47 g
Maya	9,5 g
Agar	3 g
Asit karışımı	3 ml
Distile su	510 ml

Besiyerinde kullanılan asit karışımında propiyonik asit, ortofosforik asit ve distile sudan oluşmaktadır (Çizelge 3.2) [158]. Bu asit karışımı besiyerinin kontaminasyonunu engellemek amacıyla antifungal olarak kullanılmaktadır. Bu karışım kullanılmadığı takdirde besi yeri fungus ile kontamine olduğundan, bireylerin gelişimi olumsuz yönde etkilenmekte ve dişilerde yumurta verimi düşmektedir. Asit karışımı stok olarak hazırlanır ve besiyeri pişirildikten sonra stok iyice çalkalanarak yeterli miktarı besin ortamına eklenir.

**Çizelge 3.2.** Sandart *Drosophila* besiyeri için gerekli olan asit karışımında kullanılan sarf malzemeler ve miktarları

Sarf Malzeme	Miktar (ml)
Ortofosforik asit	83
Propiyonik asit	386
Distile su	1081
Toplam	1550

Besiyeri hazırlamak için asit karışımı hariç gerekli tüm katı maddeler ve distile su yeterli büyüklükte ve ateşe dayanıklı bir kap içine konulur ve karıştırılarak kaynatılır. Karışım kaynamaya başlayınca 10 dakika daha kısık ateşte karıştırılarak pişirilir. Ateşten indirilen besiyerine gerekli miktarda asit karışımı ilave edilerek asidin eşit olarak dağılması için iyice karıştırılır. Bu şekilde hazırlanan besiyeri soğumadan steril olarak bekletilen 250 ml lik kültür şişelerine 1-2 cm yüksekliğinde dökülür. Şişelerin üzerleri temiz kurutma kağıdı ile kapatılarak besiyerleri soğutularak katılaşmaya bırakılır. Besiyeri katılaştıkça şişelerin ağzı hidrofob pamuk ve gazlı bezden yapılmış steril tampon ile kapatılır. Hazırlanan besiyeri üç gün içerisinde kullanılmadığı takdirde

bozular. Bu nedenle larva toplama aşamasına kadar yapılan deneyler için, her seferinde taze besiyerleri hazırlandı.

Çalışmalarımızın bir bölümünde Wards Biology'den temin edilen hazır besiyeri kullanıldı. Bunun için 7.5 cm yüksekliğinde 2.5 cm çapında steril olarak bekletilen tüplere 0.5'er gram hazır besiyeri konuldu. Bu besiyerine daha sonra distile su, flavonoid ve/veya mutajen çözeltileri çalışma gruplarına uygun olarak eklendi.

### 3.5.3. Bayıltma Yöntemi

Çalışmaların çeşitli aşamalarında, çalışmayı olası kılmak amacıyla ergin bireyler bayıltıldı. Bu amaçla karbondioksit veya eter kullanılabilir. Ancak laboratuvarımızda daha ekonomik ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle eterizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bayıltma işlemi şu şekilde gerçekleştirilir: Hidrofob pamuğa gazlı bez sarılarak hazırlanmış tampon ile kapatılan bir kültür şişesi "bayıltma şişesi" olarak kullanıldı. Tampona bir kaç damla eter damlatılarak kültür şişesindeki sinekler bu şişeye aktarıldı. Eterli tamponla kapatılmış bayıltma şişesinde bir iki dakika kalan sinekler baygın halde cam levha veya beyaz bir fayans üzerine alınarak gerekli çalışmalar yapıldı.

### 3.5.4. Standart Çapraz İçin Ergin Birey Seçimi ve Larva Toplanması İşlemleri

Uygulamaların yapılacağı trans-heterozigot larvaları elde etmek için, erkek *mwh* bireyleri ile bakire (virjin) *flr<sup>3</sup>* dişi bireyleri kullanılarak çaprazlamalar yapıldı. Dişilerin döllenmesi için bilinen bir genotipten spermlerin kullanılması *Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon test sisteminde temeldir. Bakire dişi bireylerin toplanabilmesi için, *flr<sup>3</sup>* stoğunun bulunduğu kültür şişesindeki ergin bireyler ortamdaki uzaklaştırıldı. Hiç ergin bireyin bırakılmadığı *flr<sup>3</sup>* kültür şişesinden 4'er saat aralıklarla pupadan çıkan dişi bireyler toplanarak yeni besiyerine aktarıldı. Bireylerin yaşı üreme verimi üzerine etkili olduğundan benzer şekilde *mwh* stoğundan genç erkek bireyler seçildi ve farklı bir besiyerine aktarıldı. Yeterince birey toplandıktan sonra taze besiyeri kullanılarak standart çapraz yapıldı. Döllenmenin ve embriyogenezin gerçekleşebilmesi için bireyler bir gün süre ile çaprazlama şişesinde bırakıldı. Çaprazlanan bireyler yeni bir besi yerinde sekiz saat bekletilerek yumurta bırakmaları sağlandı. Bu süre sonunda erginler yumurta bıraktıkları besiyerinden uzaklaştırılarak farklı bir kültür şişesine

alındı. Besiyerine bırakılan döllenmiş yumurtalardan çıkan larvaların üçüncü larva evresine (üçüncü instar) erişmesi için  $72\pm 4$  saat beklenecek besiyeri ortamına % 17 lik NaCl (sodyum klorür, tuz) çözeltisi ile yıkanarak besiyerindeki larvaların ayrılması sağlanır. Larva içeren tuz çözeltisi kurutma kağıtlarının üzerine alındı. Ardından, larvalar sayılarak zarar vermeden toplandı ve içinde 0.5 gr hazır besiyeri ve 2.5 ml test çözeltisi bulunan 2.5 X 7.5 ebatındaki cam tüplere aktarıldı. Kontrol ve uygulama grupları için aynı işlemler yapıldı.

### **3.5.5. Mutajen ve Flavonoid Çözeltilerinin Hazırlanması ve Besiyerine Eklenmesi**

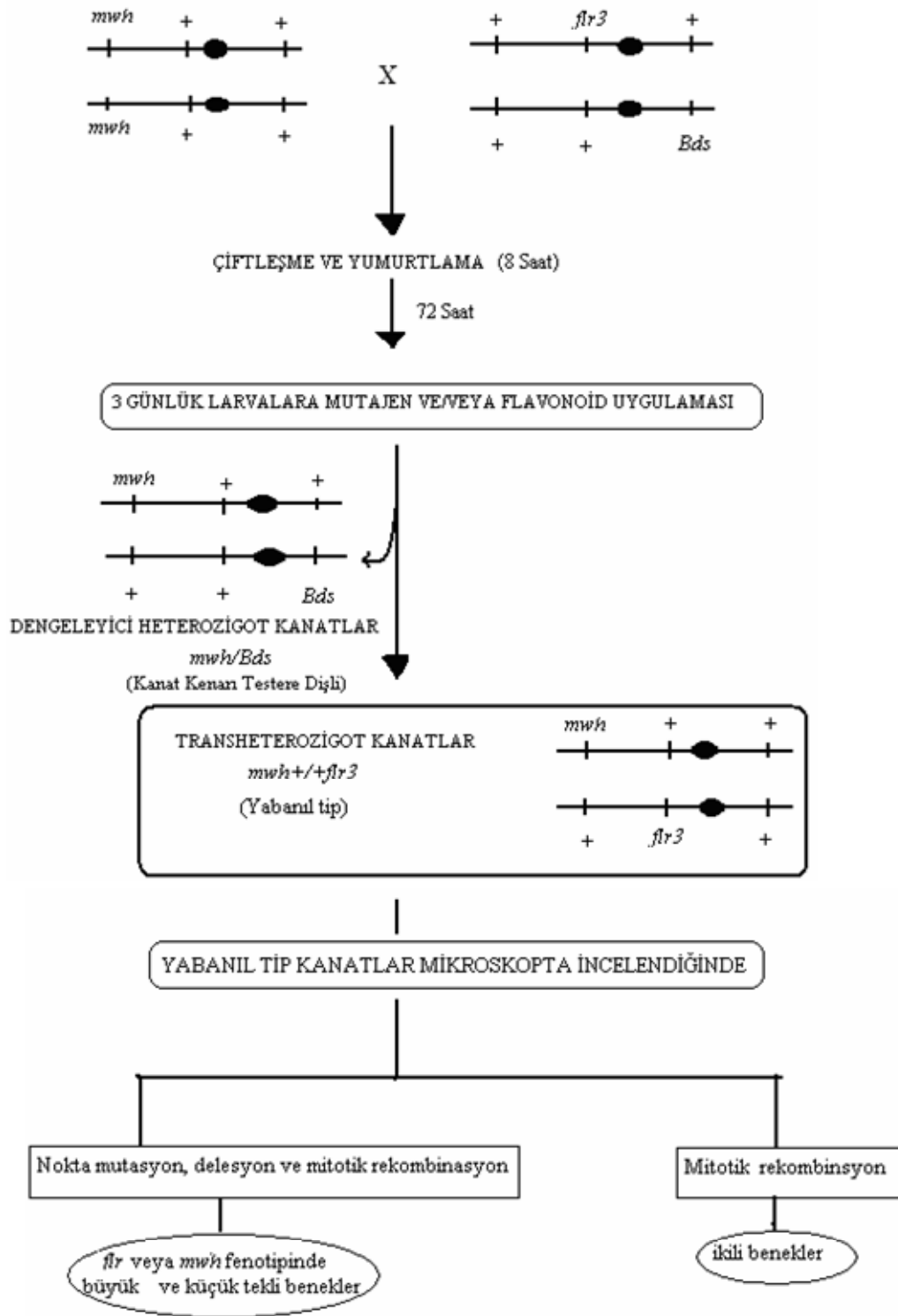
Çalışmada MNU, kemoterapi ilaçlarından mitomisin C ve siklofosfamid mutajenlerinin ve çeşitli bitkilerde bulunan flavonoidlerin dört tanesinin (galangin, mirisetin, luteolin ve resveratrol) doz taramaları yapılarak uygulama dozları belirlendi. Mutajenlerin farklı üç dozu, flavonoidlerin ise genotoksik etkilerini belirlemek için değişen sayıda farklı dozları, flavonoidlerin antijenotoksik aktivitelerini araştırmak için ise belirlenen üçer dozu kullanıldı. Ayrıca, antijenotoksikite sonucuna göre flavonoidlerin glutatyon ve antioksidan enzimler üzerine etkilerini belirlemek amacıyla da üçer dozu kullanıldı.

Kullanılan her maddenin farklı derişimlerde önce stok çözeltileri hazırlandı. Mutajenlerin ve mirisetinin stok çözeltileri distile suyla, flavonoidlerden galangin, luteolin ve resveratrolün ise etil alkolle hazırlandı.

Her stok için gereken miktarlar, elektronik bir terazide tartılarak uygun büyüklükteki koyu renk saklama şişelerine alındı ve üzerlerine hesaplanan hacimde distile su ve/veya alkol eklendi. Bu stok çözeltilerden de gerekli hesaplamalar yapılarak belirlenen uygulama dozları distile su ile hazırlandı. Hazırlanan bu uygulama dozları bekletilmeden içerisine 0.5 gr hazır besiyeri konulmuş steril cam deney tüplerine farklı deney grupları oluşturmak amacıyla her tüpe 2.5 ml olmak üzere gruplara özgü test çözeltilerinden eklendi. Mutajen ve flavonoid gruplarının yanında sadece distile su kullanılan negatif kontrol grubu ve etil alkol ile hazırlanan gruplar içinde distile su ile hazırlanmış etil alkol kontrolü oluşturuldu.

### 3.6. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinin Uygulanması

Besinlerle günlük olarak değişen miktarlarda aldığımız flavonoidlerden luteolin, galangin, mirisetin ve resveratrolün genotoksik aktivitelerini ve çeşitli mutajenlere (MNU, siklofosfamid ve mitomisin C) karşı antigenotoksik etkilerini kanat benek testi ile araştırmak için standart çapraz (ST) kuruldu (Şekil 3.3). *mwh* erkekleri ile flare dişileri çaprazlanarak sekiz saat süreyle taze besiyerine yumurtlamaları sağlandı. Sekiz saatin sonunda ebeveynler besiyerinden uzaklaştırıldı ve bu yumurtalardan çıkan ve  $72 \pm 4$  lik larvalar (üçüncü evre larvaları) gruplara özgü olarak hazırlanan cam tüplerdeki besiyerlerine sayılarak transfer edildi. Böylece negatif kontrol, etil alkol kontrolü, mutajenlerin ve flavonoidlerin farklı dozlarıyla uygulama grupları eş zamanlı olarak oluşturuldu. Bu şekilde yeterli sayıdaki larvalar gruplara ayrılarak ergine gelişmeleri izlendi ve her uygulama gurubu için yaşayabilirlik yüzdeleri ve genotoksik aktiviteleri kullanılan dozlarla ilişkili olarak araştırıldı. Yaşayabilirlik yüzdesi her grup için ayrı ayrı olmak üzere, larvadan ergine gelişebilen bireylerin oranı olarak hesaplandı. Genotoksisite çalışmalarından sonra antigenotoksisite çalışmalarında mutajenlerle birlikte hazırlanan flavonoidler yukarıda anlatıldığı şekilde eş zamanlı olarak uygulandı.



Şekil 3.3. Kanat benek testinin şematik gösterimi

### 3.6.1. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması

Uygulama ortamında test çözeltilerine maruz bırakılan larvaların pupa evresini takiben çıkan ergin bireyler Bölüm 3.3.5’de anlatıldığı şekilde eterle bayılarak toplandı. Ergine gelişen transheterozigot ( $mwh^{+}/+flr^3$ , normal kanatlı) ve testere diş şeklinde kanat kenarlarına sahip bireyler arasından normal kanata sahip bireyler seçildi. Bunlar arasında transheterozigotlar hem mutasyon ve hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonlara (beneklere) izin verirken, dengeleyici (balancer) heterozigotlar ( $mwh^{+}/+TM3, Bds$ ) rekombinasyonun baskılanması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan klonları (benekleri) içermektedir. Transheterozigot bireylerin kanatları kesilerek Faure çözeltilisinin damlatıldığı lamlar üzerine yerleştirilerek preparatlar hazırlandı [72]. Kanat preparatlarının hazırlanmasında kullanılan Faure çözeltilisinin içeriği Çizelge 3.3 de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Faure çözeltilisi için gerekli sarf malzemeler ve miktarları

Sarf Malzeme	Miktar
Gum arabik	30 g
Gliserol	20 ml
Kloral hidrat	50 g
Distile su	50 ml

Lam üzerine yeterince kanat çifti yerleştirildikten sonra preparatların kuruması için tozsuz bir ortamda bir gün bekletildi. Kuruyan preparatlardaki kanatların dorsal ve ventral yüzeyleri tekli beneklerin ve ikili beneklerin varlığını araştırmak için ışık mikroskopunda 10 x 40 büyütme ile tarandı ve beneklerin sayıları ve büyüklükleri kayıt edildi.

Sayımda kayıtları tutulan benekler aşağıdaki gibi sınıflandırıldı

- Küçük tekli benek ( 1-2  $mwh$  veya  $flr$  hücre)
- Büyük tekli benek ( $3 \leq mwh$  veya  $flr$  hücre grubu)
- İkili benek ( $mwh$  ve  $flr$  hücrelerin ikisini de içeren hücre grubu yan yana aynı benekte)

$mwh$  benekler nokta mutasyon, delesyon ve  $mwh$  ve  $flr$  geni arasındaki rekombinasyon sonucu oluşmaktadır.  $flr$  benekler nokta mutasyon ve delesyon ile



oluşurken, ikili benekler ise flare geni ile sentromer arasında gerçekleşen rekombinasyon ile ortaya çıkmaktadır [72].

### 3.6.2. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analiz için benekler küçük tekli benekler, büyük tekli benekler ve ikili benekler olmak üzere üç gruba ayrılarak ayrı ayrı değerlendirildi. Kaydedilen genotoksik etkilerin değerlendirilmesi için deney gruplarının kanat başına düşen benek sayıları negatif kontrol gruplarının değerleri ile karşılaştırıldı. Flavonoidlerin antigenotoksik aktiviteleri ile ilgili değerlendirmeler mutajenlerin genotoksik etkileriyle karşılaştırılarak yapıldı.

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilirken orijinal (null) hipotez ( $H_0$ )’de uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayıldı. Alternatif hipotez ( $H_a$ ) de ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan  $m$  defa daha fazla olduğu varsayıldı. Orijinal ve alternatif hipotezlerin Binomial Şartlı Test kullanılarak hesaplanmasıyla sonuçlar; pozitif (+), kısmen pozitif (z), belirsiz (i) ve negatif (-) olarak gösterildi [159].

Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesine karar verilirken Kastenbaum ve Bowman [160] çizelgesinden yararlanıldı. Hipotezlerin kurulması sırasında yapılan hesaplamalarda kullanılan parametreler aşağıda açıklamalarıyla birlikte gösterilmiştir.

$N_c$ = Kontrol grubunda incelenen kanat sayısı

$N_t$ = Uygulama grubunda incelenen kanat sayısı

$n_c$ = Kontrol grubunda gözlenen mutant klon sayısı

$n_t$ = uygulama grubunda gözlenen mutant klon sayısı

$n = n_t + n_c$ = toplam mutant klonların sayısı

$P_o$ = Kontrol grubunda beklenen mutant klon frekansı, orijinal hipotez ( $H_0$ ) için

$$P_o = N_c / (N_c + N_t)$$

$q_o$ = Uygulama grubunda beklenen mutant klon frekansı, Orijinalhipotez ( $H_0$ ) için

$$q_o = N_t / (N_c + N_t)$$

$P_A$ = Kontrol grubunda beklenen mutant klon frekansı, Alternatif hipotez ( $H_a$ ) için

$$P_A = N_c / (N_c + mN_t)$$

$q_A$ = Uygulama grubunda beklenen mutant klon frekansı, Alternatif hipotez ( $H_a$ ) için

$$q_A = mN_C + mN_t$$

$P_{0n}$  = Kontrol grubunda beklenen mutant klon sayısı, Orijinal hipotez ( $H_0$ ) için

$q_{0n}$  = Uygulama grubunda beklenen mutant klon sayısı, Orijinal hipotez ( $H_0$ ) için

$P_{An}$  = Kontrol grubunda beklenen mutant klon sayısı, Alternatif hipotez ( $H_a$ ) için

$q_{An}$  = Uygulama grubunda beklenen mutant klon sayısı, Alternatif hipotez ( $H_a$ ) için

$m$  = Çarpım sabiti

*Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için uygun olan bilgisayar programı Microsta ile öncelikle yukarıda verilen parametreler hesaplandı. Hesaplama sonucunda eğer uygulama grubundaki ( $n_t$ ) mutant klon sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse  $H_0$  red edildi. Aynı şekilde kontrol grubundaki ( $n_c$ ) mutant klon sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse ( $H_a$ ) red edildi.  $H_0$  ve  $H_a$ 'nın kabul veya red edilmesine göre Çizelge 3.4 kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir [159].

**Çizelge 3.4.** Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

Hipotezler		$H_A$	
		Kabul ( $1-\beta$ )	Ret ( $\beta$ )
$H_0$	Kabul ( $1-\alpha$ )	<b>Belirsiz</b> $P=(1-\alpha)(1-\beta)= 1-\alpha+ \beta+\alpha\beta$	<b>Negatif</b> $P=(1-\alpha)\beta=\beta+\alpha\beta$
	Ret ( $\alpha$ )	<b>Pozitif</b> $P=\alpha(1-\beta)= \alpha-\alpha\beta$	<b>Zayıf Pozitif</b> $P=\alpha\beta$

Antigenotoksite çalışmalarında % inhibisyon değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı [161].

Her 100.000 hücre başına oluşan düzeltilmiş kontrol klon frekansı temel alınarak, flavonoidin göstermiş olduğu inhibisyon= $((A-B)/A) \times 100$
---

A: Uygulanan genotoksik maddenin hesaplanan düzeltilmiş kontrol klon frekansı

B: Birlikte uygulama sonucu genotoksik madde + flavonoid için hesaplanan düzeltilmiş kontrol klon frekansı

Kontrol için gözlenen klon frekansı= $(\text{Distile su grubu için toplam benek sayısı/kanat sayısı}/24\ 400) \times 100.000$
---

Mutajen uygulama grupları için gözlenen klon frekansı= $(\text{Mutajen uygulama grupları için toplam benek sayısı/kanat sayısı}/24\ 400) \times 100\ 000$
---

Mutajen+Flavonoid uygulama grupları için gözlenen klon frekansı=  
(Mutajen+Flavonoid uygulama grupları için toplam benek sayısı/kanat sayısı/24 400)  
x100 000

Düzeltilmiş kontrol klon frekansı= Uygulama grupları için gözlenen klon frekansı-  
Kontrol (distile su) grubu için gözlenen klon frekansı

24 400: Bir kanatta bulunan ortalama hücre sayısıdır.

### **3.7. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar**

#### **3.7.1. Homojenizasyon ve Santrifügasyon**

Enzim çalışmaları flavonoid grupları için yapıldı. Her flavonoidin antigenotoksik aktivitesini araştırmak amacıyla kullanılan dozlardan üç tanesi belirlendi ve standart çaprazdan elde edilen 72±4 saatlik larvaların flavonoidlerin farklı dozlarını içeren besi yerlerinde ergine gelişmeleri beklendi. Her flavonoidin uygulanan dozlarında ergine gelişebilen erkek bireyler pupadan çıktıkları ilk 2-3 saat içerisinde toplanarak enzim çalışmalarında kullanılmak üzere derin dondurucuda -80°C' de saklandı.

Enzim aktivitelerinin belirlenmesi için -80°C de saklanan bu ergin bireyler tartıldı. Tartılan bireyler 1/4 oranında PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.8834 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g, NaCl 8.2 g, pH: 7) tamponuyla karıştırılarak, buz kabı içinde cam- teflon homojenizatörde 2000 rpm devirde 10-15 vuruş ile, 30 sn. aralıklarla 2 kez homojenize edildi. Homojenat eppendorf tüplerine alınarak, 0°C' de 20 000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Dich Instrument markers, Microcentrifuge) edildi. Elde edilen süpernatant mikropipet yardımı ile temiz eppendorf tüplerine alındıktan sonra -80°C' de enzim aktiviteleri ölçülene kadar saklandı.

#### **3.7.2. Enzim Aktivite Tayini**

Çalışmalarımızda enzim kaynağı olarak Bölüm 3.8.1' de anlatıldığı gibi hazırlanan süpernatant kullanılmış olup enzim aktiviteleri UV-VIS spektrofotometre veya mikropipet sistemi kullanılarak ölçülmüştür.

### 3.7.2.1. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması

Süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev alan SOD enziminin ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikalleri tarafından sitokrom C'nin indirgemesi inhibe etmesi temeline dayanan enzim aktivite tayini McCord ve Fridovich 1969 yöntemine göre yapıldı [162].

Enzim aktivite tayini için pH 7,8 de 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponu), 0.2 U/ml ksantin oksidaz, 10 mM ksantin ve 1 mM sitokrom-c çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak A ve B çözeltileri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

A Çözeltisi: 0.76 mg (5 mol) ksantin'in 10 ml 0,001 N NaOH' daki çözeltisi ve 24.8 mg (2 mol) sitokrom c'nin 100 ml 50 mM pH: 7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırıldı. Bu çözelti +4 °C' de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi: Taze olarak hazırlanan ksantin oksidazın (0.2 u/ml) 0.1 mM EDTA'daki çözeltisi hazırlandı.

Enzim aktivite tayini ise, 3 ml' lik spektrofotometre küvetine 2.9 ml A çözeltisi konulup 50 µl örnek ilave edildi. Tepkime 50 µl B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı. Hızlı bir şekilde karıştırıldıktan sonra 550 nm'deki absorbans değişimi okundu. Kör okuması yapılırken örnek yerine 50 µl distile su kullanıldı. Kalibrasyon grafiği çizmek için belli bir konsantrasyondaki (5x10<sup>-7</sup> M) SOD çözeltisinin 5 µl, 10 µl ve 15 µl' deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem saf SOD enzimiyle yapıldı. % inhibisyon aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \text{OD}(\text{örnek}) / \text{OD}(\text{kör}) \times 100$$

### 3.7.2.2. Katalaz Aktivitesinin Tayini ve Hesaplanması

Katalaz enziminin aktivite tayini Luck (1963) yöntemine göre yapıldı [163]. Katalaz aktivite tayini için pH 7 de 1/15 M' lık Sodyum-Potasyum (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) tamponu hazırlanarak 100 mililitresinde 160 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olacak şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendi. Enzim aktivite tayininde kullanılacak kör için sadece hazırlanan tampon- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karışımı kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümü için ise hazırlanan tampon ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisine uygun miktarda süpernatant eklendi ve 240 nm'de 1 dakika boyunca absorbans değişimi Shimadzu-UV-1601 model UV-VIS spektrofotometre ile belirlenerek mililitredeki enzim ünite sayısı Luck 1963 yöntemine göre hesaplandı. Elde edilen değerler,

süpernatanın mililitresindeki miligram protein miktarına göre spesifik aktivitenin hesaplanmasında kullanıldı.

$$C = OD \times \text{toplam hacim (ml)} \times 1000 / 0.036 \text{ mM} \times \mu\text{l süpernatant}$$

### 3.7.2.3. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivite Tayini ve Hesaplaması

GR aktivitesi Cribb vd. [164] tarafından kullanılan mikropilaka sistemi yöntemine göre ölçüldü. Reaksiyon solüsyonu 0.1 mM, 150 µl 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), 12 mM, 20 µl NADPH ve 20 µl örnek içermektedir. 20 µl, 3.25 mM GSSG'nin ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Bütün çözeltiler, 1mM EDTA içeren, 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) hazırlandı. Reaksiyon esnasında GSSG'den GSH oluşumu nedeniyle DTNB miktarı azalmıştır. DTNB azalışı oda sıcaklığında 405 nm'de izlendi ve elde edilen absorpsiyon değerlerinde GR aktivitesi hesaplandı (DTNB için  $\epsilon=14.151 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

$$\text{Spesifik aktivite} = \text{Ünit aktivite} / \text{Bradford}(\mu\text{mol} / \text{mg total protein}) \times \text{SF (Sulandırım Faktörü)}$$

### 3.7.2.4. Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması

GST aktivitesi substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanılarak belirlendi. Çalışmada Habig vd. [165] nin geliştirdiği yöntem, bazı modifikasyonlar yapılarak kullanıldı.

Enzim aktivitesinin ölçümü sırasında potasyum fosfat tamponu ( pH:6.5; 0.1 M) ve kofaktör olarak redükte glutasyon (0,002 M) kullanıldı. Enzim aktivitesinin saptanması için mikropilaka çukurlarına sırasıyla 10 µl süpernatant, 100 µl fosfat tamponu ve 100 µl GSH karışımı pipetlenerek 25 °C de 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, çukurlara 10 µl CDNB pipetlenerek, karışım 15 sn süre ile mikropilaka okuyucuda karıştırıldı. Absorpsiyon değışimi 344 nm'de 1 dakika süresince okunarak kaydedildi. Aktivite aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$C = OD \times \text{toplam hacim (220 } \mu\text{l)} \times 1000 / 9,6. 10^3 \text{ M} \times \text{örnek hacim} / 10 \mu\text{l} \times 0.552 / \text{bradford} \times \text{SF}$$

### 3.7.2.5. Redükte Glutasyon Miktar Tayini ve Hesaplanması

Glutasyon miktar tayini Akerboom ve Sies (1981) yöntemine göre yapılmıştır [166]. Bunun için, 6.3 mM EDTA içeren 125 mM'lık sodyum difosfat tamponu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) pH: 7,5 olacak şekilde hazırlandı. Ayrıca total glutasyon tayininden hemen önce taze olarak tamponla mililitresinde 0.248 mg NADPH olacak şekilde yeni bir çözelti hazırlandı. 5 ml tamponda 11.89 mg DTNB olacak şekilde DTNB çözeltisinde taze olarak hazırlandı. Yöntemde belirtilen miktarda taze olarak hazırlanan NADPH'lı tampondan deney tüplerine 700 µl ve DTNB' den 100 µl konuldu. Kör tüp için 200 µl, örnek tüpleri için 180 µl distile su deney tüplerine eklenip vortex ile karışması sağlandıktan sonra 10 dakika 30°C' deki sıcak su banyosunda bekletildi. Kör tüpe 5 µl (20 u/ml) GSH-redüktaz eklendikten sonra absorbansı 412 nm'de sıfırlandı. Örneklerin okunması şu şekilde yapıldı. Deney tüplerindeki karışım 1 ml'lik spektrofotometre küvetine alındıktan sonra, küvetin bir kenarına 5 µl (20 u/ml) glutasyon redüktaz, diğer tarafına da 10 µl süpernatant eklenerek karıştırıldı ve 412 nm' de absorbans okundu. Daha sonra total glutasyon tayini yapmak amacıyla bir standart grafik çizildi ve 412 nm'de okunan absorbans değerine karşılık gelen değerler süpernatanın milimetresindeki miligram proteine bölündü.

### 3.7.2.6. Total Protein Tayini

Ergin birey sitozolündeki toplam protein miktarları Bradford [167] tarafından geliştirilen yöntemle göre, mikropilaka okuyucu sistemi kullanılarak tespit edildi. Süpernatant örnekleri 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µl mikropilaka çukurlarına pipetlendi ve üzerine 250 µl Bradford çözeltisi (Sigma B6916) eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika süreyle inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak, 595 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen değerler BSA (Bovine Serum Albumin) standart eğrisi değerleri ile karşılaştırılarak, sulandırma faktörüne de bağlı olarak örnekteki toplam protein miktarları saptandı. Tüm örneklerden elde edilen toplam protein değerleri, elde edilen enzim aktivite değerleri ile birlikte, spesifik enzim aktivitesi değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı.

### **3.7.2.7. Enzim Aktivitesi Çalışmalarında İstatistiksel Analiz**

Enzim aktivitelerinin uygulama gruplarına bağlı olarak test edilmesi amacıyla varyans analizi (ANOVA) yöntemi uygulandı. Gruplar arası farklılık düzeyi en az % 95 olasılık ile ( $p < 0.05$  için) önemli olarak değerlendirildi. Buna bağlı olarak, gruplar arası farklılığın önemli olup olmadığı  $p < 0.05$  düzeyinde önemlilik derecesine göre saptandı. Gruplar arası farklılığın önemli olduğu saptandığında, örnekler ikili karşılaştırma ile Mann Whitney-U testine göre kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada yeşil bitkilerde ve bunların ürünlerinde değişen oranlarda bulunan ve beslenme ile alınan flavonoidlerden galangin, mirisetin, luteolin ve resveratrolün öncelikle genotoksik aktiviteleri, daha sonra genotoksik olmayan dozlarının N-metil-N-nitrozoüre (MNU), siklofosfamid (SF) ve mitomisin C (MMC) mutajenlerine karşı antigenotoksik aktiviteleri *Drosophila* kanat benek testi ile araştırılmıştır. Ayrıca bu flavonoidlerin *Drosophila* antioksidan sistemi üzerine etkileri de araştırılmıştır. Çalışmalarda standart çapraz (ST) kullanılmış ve Bölüm 3'te açıklanan deney sistemleri kurulmuştur. Çalışmalarda negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılırken, etanolde çözünen flavonoidler dikkate alınarak etanol kontrol grubu da çalışmalara eklenmiştir. Tüm gruplarda  $72 \pm 4$  saatlik larvalardan ergine gelişebilen bireyler sayılarak gruplar için hayatta kalış oranları hesaplanmış ve trans-heterezigot bireylerin kanatları beneklerin varlığını araştırmak için ışık mikroskopunda 400X büyütmeyle incelenmiştir. İncelemeler sırasında kanat benekleri istatistik analizlerde kullanılmak üzere tekli benekler (*mwh* veya *flr* fenotipinde) ve ikili benekler (*mwh* ve *flr* fenotipinde) olmak üzere sınıflandırılarak kaydedilmiştir [72]. Ayrıca tekli benekler de kendi aralarında küçük tekli benek (1-2 hücreli) ve büyük tekli benek ( $3 \leq$  hücreli) olmak üzere ayrılmıştır [75].

### 4.1. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular

#### 4.1.1. N-metil-N-nitrozoüre, Siklofosfamid ve Mitomisin C'nin Genotoksik Etkilerinin Araştırılması

Çalışmamızda ilk olarak alkilleyici bir ajan olan N-metil-N-nitrozoüre (MNU), kanser kemoterapi ilaçlarından siklofosfamid (SF) ve mitomisin C'nin (MMC) toksik etkileri (larvadan ergine gelişebilen birey sayısını belirten hayatta kalış oranı) ve genotoksik dozlarını belirlemek amaçlanmıştır.

Besin kaynaklı mutajenlerden olan MNU'nun genotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla 0.5 mM ile 1.6 mM arasında değişen beş farklı konsantrasyonda gruplar oluşturulmuş ve elde edilen sonuçlar ile istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.1 de verilmiştir.



**Çizelge 4.1.** *Drosophila* kanat benek testi ile N-metil-N-nitrozoüre (MNU) uygulama gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler

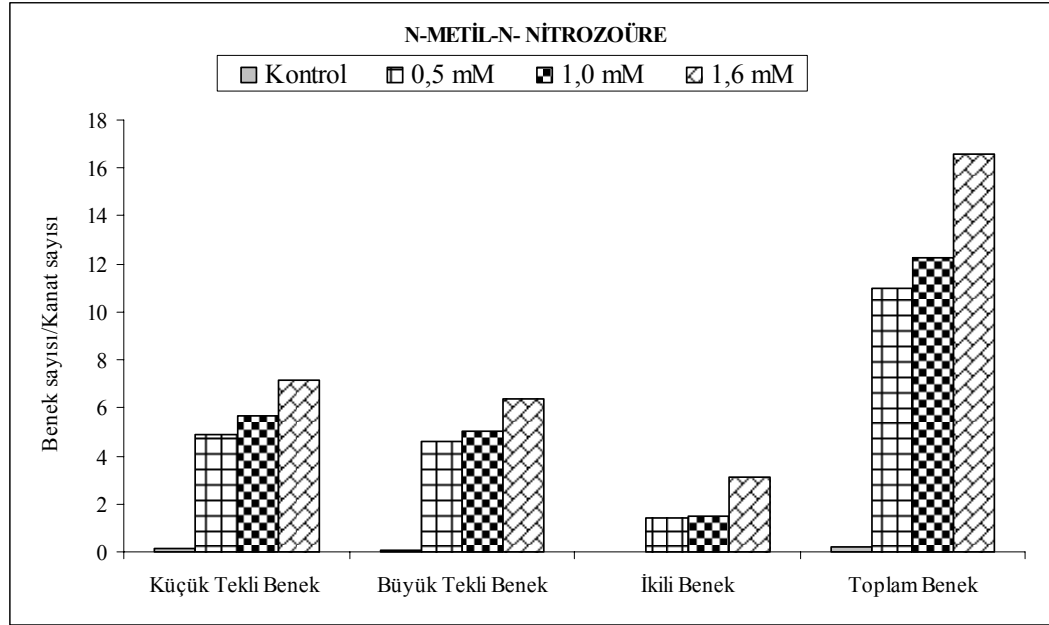
Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*			Toplam benek sayısı (m =2)
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m =2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m =5)	İkili benekler (m =5)	
<b>Kontrol</b>	98	100	0.14 (14)	0.04 (4)	0.02 (2)	0.20 (20)
<b>MNU (mM)</b>						
0.5	96	100	4.90 (490) +	4.61 (461) +	1.45 (145) +	10.96 (1096) +
0.8	96	115	5.67 (652) +	5.03 (578) +	1.50 (172) +	12.20 (1402) +
1.0	95	100	5.70 (570) +	5.05 (505) +	1.50 (150) +	12.25 (1225) +
1.2	96	120	5.95 (714) +	5.15 (618) +	1.65 (198) +	12.80 (1530) +
1.6	88	110	7.14 (785) +	6.35 (698) +	3.15 (347) +	16.60 (1830) +

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

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

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda hayatta kalış oranı % 98 iken, MNU gruplarının en düşük (0.5 mM) dozunda % 96 ve en yüksek (1.6 mM) dozunda ise % 88 olarak bulunmuştur. MNU dozunun artışına bağlı olarak hayatta kalış oranının azaldığı gözlenmiştir.

Tüm MNU (0.5 mM, 1 mM ve 1.6 mM) gruplarında gözlenen benek sıklıklarının kontrol grubuyla karşılaştırılması Şekil 4.1 de görülmektedir



**Şekil 4.1.** MNU uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması

Elde edilen sonuçlara göre, MNU gruplarında doz artışına paralel olarak kanat başına düşen benek sıklığı tüm benek tiplerinde kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Tüm MNU gruplarında, büyük ve küçük tekli beneklerin benzer oranlarda olduğu bulunmuştur. Ancak ikili benekler, diğer benek tiplerine oranla daha az sayıda gözlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). Toplam benek sıklığı kontrol grubunda 0.20 iken, en düşük (0.5 mM) ve en yüksek (1.6 mM) MNU dozlarında sırasıyla 10.96 ve 16.60 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla MNU gruplarında tüm benek tiplerininin sıklığındaki artış istatistiksel açıdan önemli bulunmuş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada kullanılan bir diğer mutajen ise kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarından siklofosfamiddir. Siklofosfamidin (SF) genotoksik etkisini belirlemek amacıyla 0.5 mM, 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarda olmak üzere besiyerine eklenmiş ve üç farklı grup oluşturulmuştur. Oluşturulan bu gruplardan elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirmeleri Çizelge 4.2 de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** *Drosophila* kanat benek testi ile Siklofosfamid (SF) uygulama gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler

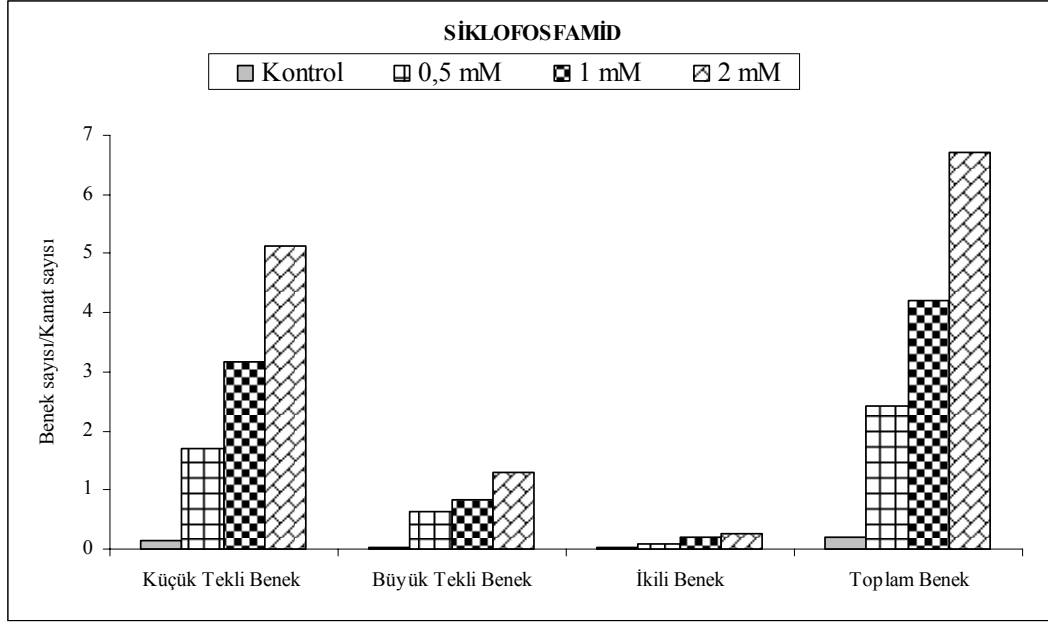
Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*		İstatistiksel bulgular**		
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)	
<b>Kontrol</b>	98	100	0.14 (14)	0.04 (4)	0.02 (2)	0.20 (20)	
<b>Siklofosfamid (mM)</b>							
0.5	72	66	1.70 (112) +	0.64 (42) +	0.09 (6) +	2.42 (160) +	
1	67	75	3.16 (237) +	0.84 (63) +	0.20 (15) +	4.20 (315) +	
2	41	65	5.14 (334) +	1.31 (85) +	0.26 (17) +	6.70 (436) +	

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

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

SF gruplarında hayatta kalış oranının doz artışına bağlı olarak azaldığı görülmüştür. Kontrol grubunda hayatta kalış oranı % 98 iken, SF'nin 0.5 mM ve 2 mM dozlarında sırasıyla % 72 ve % 41 olarak bulunmuştur. Larvaların hayatta kalış oranı SF'nin en yüksek dozunun (2 mM) uygulandığı grupta oldukça azalmıştır (Çizelge 4.2).

Tüm SF gruplarında doz artışına paralel olarak tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklıkları artmıştır (Şekil 4.2). SF uygulaması en çok küçük tekli benek sıklığını arttırmıştır. Kontrol grubunda 0.14 olan küçük tekli benek sıklığı, en düşük (0.5 mM) SF dozunda 1.70 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Büyük tekli benek sıklığı ise kontrol grubunda 0.04 iken SF'nin 0.5 mM dozunda 0.64 olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.2.** SF uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması

İkili ve toplam benek sıklıkları kontrol grubunda sırasıyla 0.02 ve 0.20 iken, en düşük (0.5 mM) SF dozunda 0.09 ve 2.42 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla SF gruplarında, tüm benek tiplerinin sıklığındaki artışlar istatistiksel açıdan önemlidir ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

SF grupları ile MNU gruplarından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında ise; 0.5 mM ve 1mM dozlarında MNU'nun indüklediği benek sıklığı SF grubunda indüklenen benek sıklığından daha fazla bulunmuştur. En yüksek SF dozunda (1 mM) küçük ve büyük tekli benek sıklıkları sırasıyla 3.16 ve 0.84 iken, aynı dozdaki MNU grubunda ise 5.75 ve 5.05 olarak bulunmuştur.

Çalışmada son mutajen olarak yine bir kemoterapi ilacı olan mitomisin c (MMC) kullanılmıştır. MMC'nin genotoksik aktivitesini araştırmak amacıyla 0.025 mM, 0.05 mM ve 0.1 mM konsantrasyonlarda gruplar oluşturulmuş ve bu gruplardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3 de gösterilmiştir.

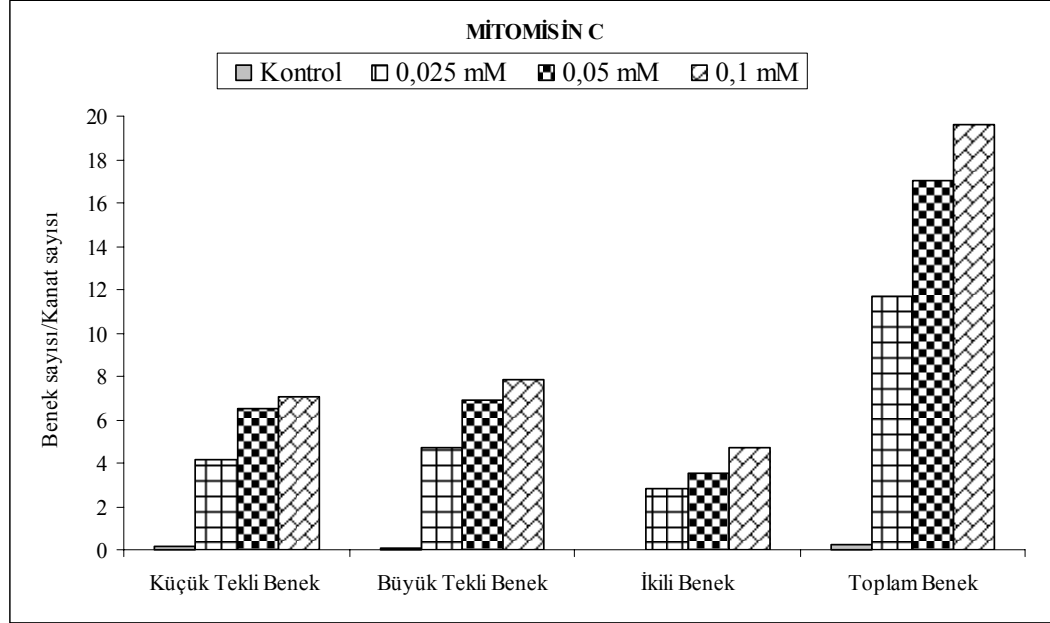
**Çizelge 4.3.** *Drosophila* kanat benek testi ile Mitomisin C (MMC) gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*			Toplam benek sayısı (m =2)
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m =2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m =5)	İkili benekler (m =5)	
<b>Kontrol</b>	98	100	0.14 (14)	0.04 (4)	0.02 (2)	0.20 (20)
<b>Mitomisin C (mM)</b>						
0.025	64	80	4.15 (332) +	4.73 (379) +	2.80 (224) +	11.69 (935) +
0.05	60	72	6.53 (471) +	6.91 (498) +	3.53 (254) +	16.98 (1223) +
0.1	46	70	7.01 (491) +	7.81 (547) +	4.74 (332) +	19.57 (1370) +

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

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

MMC gruplarında larvaların hayatta kalış oranları doz artışına paralel olarak azalmıştır. Kontrol grubunda hayatta kalış oranı % 98 iken, 0.025 ve 0.1 mM MMC uygulanan gruplarda sırasıyla % 64 ve % 46 olarak bulunmuştur. MMC'nin kontrol grubuna kıyasla tüm benek tiplerini doz artışına paralel olarak önemli ölçüde arttırdığı Şekil 4.3. de görülmektedir.



**Şekil 4.3.** MMC uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması

Kontrol grubunda küçük tekli benek ve büyük tekli benek sıklıkları sırasıyla 0.14 ve 0.04 iken, en düşük MMC dozunda (0.025 mM) küçük tekli benek sıklığı 4.15,

büyük tekli benek sıklığı 4.73 olarak bulunmuştur. Tüm MMC gruplarında küçük ve büyük tekli benek sıklıkları benzer oranlarda gözlenmiştir (Şekil 4.3). Kontrol grubunda ikili benek sıklığı ve toplam benek sıklığı sırasıyla 0.02 ve 0.20 iken, en düşük (0.025 mM) MMC dozunda ise 2.80 ve 11.69 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Tüm MMC gruplarında, ikili benekler tekli beneklere göre daha az sayıda kaydedilmiştir (Şekil 4.3). Kontrol grubuna göre, MMC gruplarında tüm benek tiplerinin sıklığındaki artış istatistiksel açıdan önemli olduğundan pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

MMC mutajeninden elde edilen bulgular diğer mutajenlerden elde edilen bulgularla karşılaştırıldığında; uygulanan MMC dozlarının MNU ve SF dozlarından oldukça düşük olmasına rağmen büyük tekli benekleri ve ikili benekleri daha fazla indüklediği bulunmuştur. Küçük tekli benekleri ise MNU gruplarıyla benzer oranlarda indüklemiştir.

Larvaların hayatta kalış oranları en yüksek mutajen dozlarının uygulandığı gruplarda karşılaştırıldığında, MMC (0.1 mM) grubunda % 46, SF (2 mM) grubunda % 41 ve MNU (1.6 mM) grubunda ise % 88 olarak bulunmuştur.

#### **4.1.2. Flavonoidlerin Genotoksik Etkisinin Araştırılması**

Çalışmamızın bu bölümünde resveratrol, galangin, luteolin ve mirisetinin genotoksik etkileri *Drosophila* kanat benek testiyle araştırılmıştır. Çalışılan dozlar literatür taraması ve yapılan ön çalışmalarla belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan flavonoidlerden mirisetin suda kolaylıkla çözünürken resveratrol, galangin ve luteolin suda çözünmemiştir. Bu nedenle söz konusu flavonoidleri çözmek amacı ile etanol kullanılmış ve böylece çalışma gruplarımıza etanol kontrol grubu da eklenmiştir.

##### **4.1.2.1. Etanolün Genotoksik Etkisinin Araştırılması**

Flavonoidlerden resveratrol, galangin ve luteolinin uygulama gruplarını hazırlamak için söz konusu flavonoidlerin öncelikle yüksek saflık derecesindeki (% 99) etanolde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Ancak uygulama grupları hazırlanırken bu stok çözeltiden hesaplanan miktarda alınarak, uygun konsantrasyonlara ulaşmak amacı ile distile su eklenmiştir. Çalışmalar sırasında kullanılan en yüksek etanol konsantrasyonu olan % 6.4 lük etanol, kontrol grubu olarak kullanılmıştır. % 6.4 lük etanol çözeltilisinin

genotoksik etkisini belirlemek amacı ile yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ise Çizelge 4.4 de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** *Drosophila* kanat benek testi ile etanol gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*			İstatistiksel bulgular**	
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m =2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m =5)	İkili benekler (m =5)	Toplam benek sayısı (m =2)	
<b>Kontrol</b>	98	100	0.14 (14)	0.04 (4)	0.02 (2)	0.20 (20)	
<b>Etanol (% 6.4)</b>	90	65	0.17 (11) i	0.09 (6) i	0.03 (2) i	0.29 (19) i	

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

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

Kontrol grubunda hayatta kalış oranı % 98 iken etanol grubunda % 90 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.14, büyük tekli benek sıklığı 0.04 ve ikili benek sıklığı 0.02 iken, etanol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.17, büyük tekli benek sıklığı 0.09 ve ikili benek sıklığı 0.03 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla etanol grubunda tüm benek tiplerinin sıklığı artmış, ancak kontrol ve etanol grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır. Dolayısıyla, etanol benek sıklıklarını önemli düzeyde azaltmış veya artırmış şeklinde yorumlanmadığından, % 6.4 lük etanol uygulaması, genotoksik etkiye neden olmamıştır.

#### 4.1.2.2. Resveratrolün Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Resveratrolün genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla 0.1 ile 1 mM arasında değişen beş farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu. Elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirmeler Çizelge 4.5 de verilmiştir. Etanol kontrol grubunda % 90 olarak bulunan larvaların hayatta kalış oranı, resveratrol gruplarının en düşük (0.1 mM) ve en yüksek (1 mM) dozlarında sırasıyla % 90 ve % 75 olarak bulunmuştur. Resveratrol gruplarında doz artışına bağlı olarak hayatta kalış oranı azalmıştır.

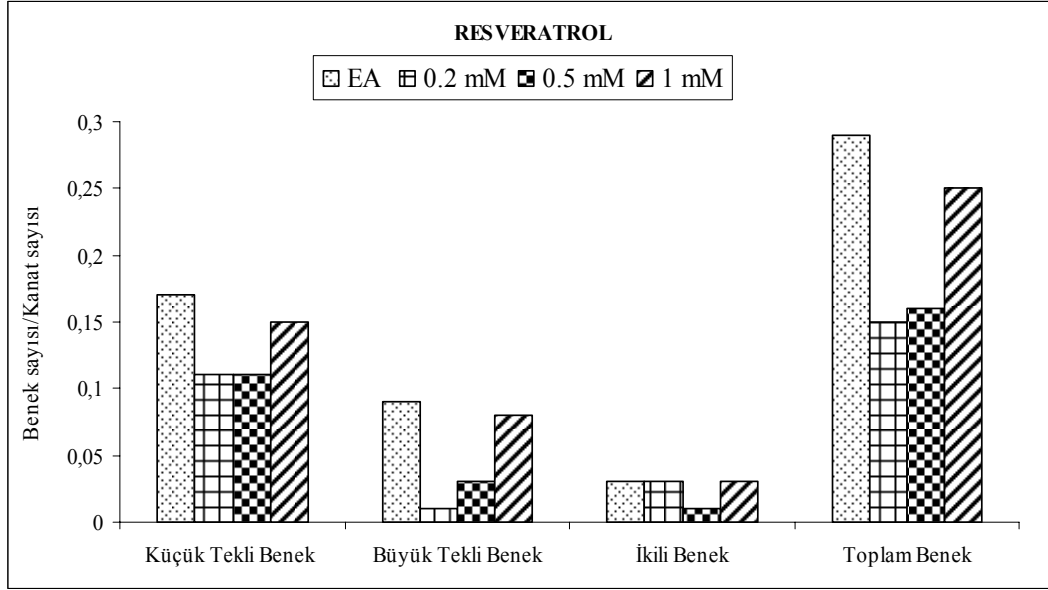
**Çizelge 4.5** *Drosophila* kanat benek testi ile resveratrol gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*		İstatistiksel bulgular**			Toplam benek sayısı (m =2)
			Küçük benekler (1-2 hücre) (m =2)	tekli	Büyük benekler (>2 hücre) (m =5)	tekli	İkili benekler (m =5)	
<b>Etanol</b> (% 6.4)	90	65	0.17 (11)		0.09 (6)		0.03 (2)	0.29 (19)
<b>Resveratrol (mM)</b>								
0.1	90	70	0.09 (6) -		0.03 (2) -		0.00 (0) i	0.11 (8) -
0.2	88	75	0.11 (8) -		0.01 (1) -		0.03 (2) i	0.15 (11) -
0.5	81	75	0.11 (9) -		0.03 (2) -		0.01 (1) i	0.16 (12) -
0.75	79	66	0.14 (9) -		0.05 (3) -		0.03 (2) i	0.21 (14) -
1	75	40	0.15 (6) i		0.08 (3) i		0.03 (1) i	0.25 (10) i

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

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

Resveratrol gruplarında doz artışına bağlı olarak küçük tekli ve toplam benek sıklıkları artmıştır. Ancak etanol grubuyla karşılaştırıldığında, resveratrol gruplarında her iki benek tipinin sıklığının azaldığı çizelge 4.5 de ve Şekil 4.4 de görülmektedir. Etanol grubunda küçük tekli benek ve toplam benek sıklıkları 0.17 ve 0.29 iken en yüksek dozun (1 mM) kullanıldığı resveratrol grubunda ise sırasıyla 0.15 ve 0.25 olarak bulunmuştur. Tüm resveratrol gruplarında büyük tekli benek sıklığı etanol grubuna kıyasla daha az sayıda gözlenmiştir. En yüksek resveratrol dozu (1 mM) hariç diğer resveratrol gruplarında küçük tekli benek, büyük tekli benek ve toplam benek sıklıklarında istatistiksel açıdan negatif sonuçlar elde edilmiştir. Resveratrol gruplarında ikili benek sıklığı etanol grubu ile aynı sayıda veya etanol grubundan daha az sayıda bulunmuştur. İkili benek sıklıklarındaki bu sonuçlar etanol ve resveratrol grupları arasında istatistiksel açıdan belirli bir farkın olmadığını göstermektedir. Bazı resveratrol (0.2 mM, 0.5 mM ve 1 mM) gruplarında gözlenen benek sıklıkları Şekil 4.4 de karşılaştırılmıştır.



**Şekil 4.4.** Resveratrol uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması (EA : Etanol)

Resveratrol gruplarında en fazla tekli beneklerin oluştuğu, büyük tekli beneklerin ve ikili beneklerin ise dozlara bağlı olarak farklı oranlarda oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.4). Ancak ikili benekler hariç, etanol grubuna kıyasla diğer benek tipleri tüm resveratrol gruplarında daha az sayıda kaydedilmiştir.

#### 4.1.2.3. Galanginin Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Galanginin genotoksik etkisini belirlemek amacıyla 0.075 mM, 0.10 mM ve 0.25 mM konsantrasyonlarının kullanıldığı üç grup oluşturulmuştur. Galangin uygulanan gruplardan elde edilen sonuçlar ve etanol kontrol grubuna göre yapılan istatistik değerlendirmeler Çizelge 4.6 da verilmiştir. Galangin gruplarında doz artışına paralel olarak larvaların hayatta kalış oranları azalmıştır. Etanol grubunda hayatta kalış oranı % 90 iken, en düşük (0.075 mM) ve en yüksek (0.25 mM) dozun kullanıldığı galangin gruplarında sırasıyla % 96 ve % 90 olarak bulunmuştur. Etanol grubuna kıyasla galanginin 0.10 mM ve 0.25 mM dozlarında ise hayatta kalış oranı artmıştır.



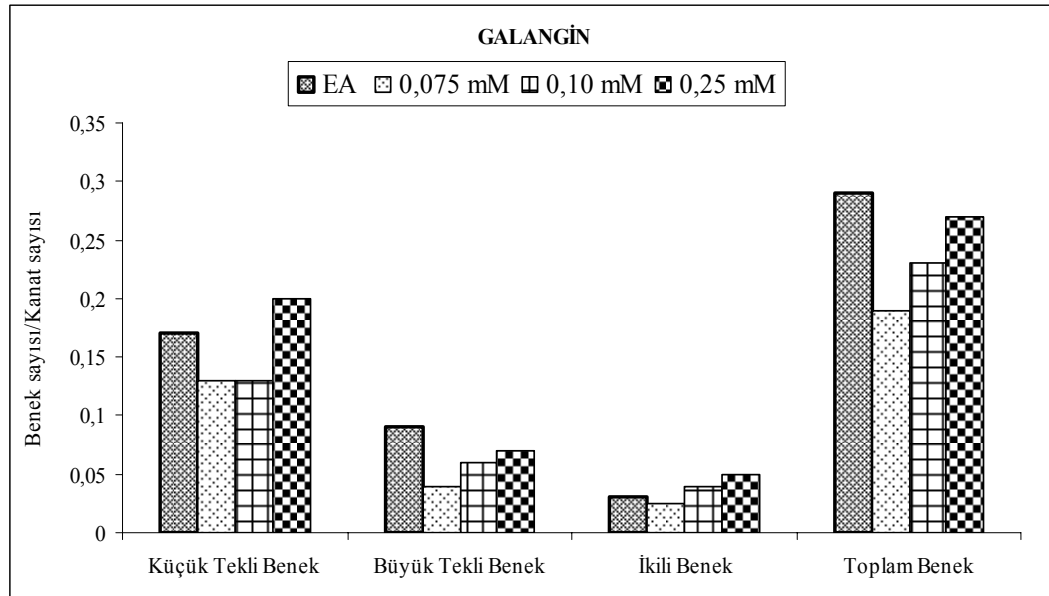
**Çizelge 4.6.** *Drosophila* kanat benek testi ile galangin gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*		İstatistiksel bulgular**		
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m =2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m =5)	İkili benekler (m =5)	Toplam benek sayısı (m =2)	
<b>Etanol (% 6.4)</b>	90	65	0.17 (11)	0.09 (6)	0.03 (2)	0.29 (19)	
<b>Galangin (mM)</b>							
0.075	96	80	0.13 (10) -	0.04 (3) -	0.03 (2) i	0.19 (15) -	
0.10	94	82	0.13 (11) -	0.06 (5) -	0.04 (3) i	0.23 (19) -	
0.25	90	75	0.20 (15) i	0.07 (3) -	0.05 (2) i	0.27 (20) i	

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

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

Etanol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.17 iken, 0.075 mM ve 0.10 mM galangin gruplarının her ikisi için de 0.13 olarak bulunmuştur. Etanol grubuna kıyasla galangin gruplarındaki küçük tekli benek sıklığındaki bu azalma önemli olduğundan istatistiksel açıdan negatif olarak değerlendirilmiştir. Ancak en yüksek galangin dozunda (0.25 mM) gözlenen küçük tekli benek sıklığı, etanol grubunda gözlenen benek sıklığından daha fazla bulunmasına (Şekil 4.5) karşın istatistiksel açıdan önemli bir farklılık elde edilememiştir.



**Şekil 4.5.** Galangin uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması (EA: Etanol)

Galangin gruplarında büyük tekli benek sıklığı ve toplam benek sıklığı doz artışına paralel olarak artmış ancak etanol grubuna kıyasla daha az sayıda gözlenmiştir (Şekil 4.5). Etanol grubunda büyük tekli benek ve toplam benek sıklıkları sırasıyla 0.09 ve 0.29 iken en yüksek (0.25 mM) galangin dozunda ise 0.07 ve 0.27 olarak bulunmuştur. Etanol grubuna kıyasla her iki benek tipi de tüm galangin gruplarında azalmış ve büyük tekli beneklerdeki bu azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir. Toplam beneklerde ise en yüksek galangin dozu (0.25 mM) hariç diğer dozlarda negatif sonuçlar elde edilmiştir. İkili benekler, artan galangin dozlarına paralel olarak artmış, ancak en düşük galangin dozu (0.075) hariç diğer dozlarda etanol grubuna göre daha fazla olarak kaydedilmişlerdir (Şekil 4.5). Tüm galangin gruplarında ikili benekler için istatistiksel açıdan önemli bir farklılık elde edilememiştir.

#### 4.1.2.4. Luteolinin Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Luteolinin genotoksik etkisini belirlemek amacıyla 0.075, 0.10 ve 0.25 mM konsantrasyonlarda uygulama grupları oluşturulmuştur. Bu uygulama gruplarından elde edilen kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeleri Çizelge 4.7 de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** *Drosophila* kanat benek testi ile luteolin gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler

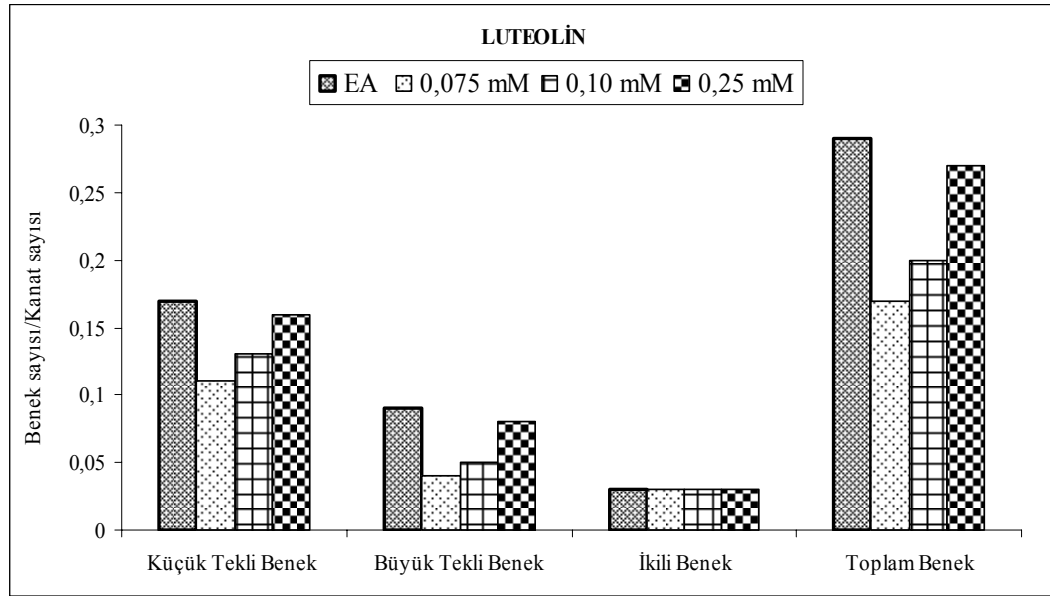
Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*		İstatistiksel bulgular**		
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)	
<b>Etanol</b> (% 6.4)	90	65	0.17 (11)	0.09 (6)	0.03 (2)	0.29 (19)	
<b>Luteolin</b> (mM)							
0.075	88	80	0.11 (9) -	0.04 (3) -	0.03 (2) i	0.17 (14) -	
0.10	83	80	0.13 (10) -	0.05 (4) -	0.03 (2) i	0.20 (16) -	
0.25	76	80	0.16 (13) -	0.08 (6) -	0.03 (3) i	0.27 (22) i	

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

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

Etanol grubunda % 90 olarak bulunan hayatta kalış oranı en düşük (0.075 mM) luteolin dozunda % 88 iken, en yüksek (0.25 mM) luteolin dozunda % 78 olarak

bulunmuş ve doz artışıyla hayatta kalış oranının azaldığı gözlenmiştir. Luteolin gruplarında doz artışına paralel olarak tekli beneklerin ve toplam benek sıklıkları artarken, ikili benek sıklığı değişmemiştir (Şekil 4.6). Etanol grubunda küçük tekli benek ve büyük tekli benek sıklıkları sırasıyla 0.17 ve 0.09 iken, en yüksek (0.25 mM) luteolin dozunda 0.16 ve 0.08 olarak bulunmuştur. Tüm luteolin gruplarında, tekli beneklerin her ikisinin de etanol grubuna kıyasla azaldığı gözlenmiştir. Tekli benek sıklıklarındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan tüm luteolin gruplarında negatif sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.7).



**Şekil 4.6.** Luteolin uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması (EA :Etanol)

İkili benek sıklığı ise etanol ve luteolin gruplarında 0.3 olarak bulunmuş ve bu sonuca göre istatistiksel açıdan önemli bir farklılık elde edilememiştir. Toplam benek sıklığı, etanol grubunda 0.29 iken en yüksek (0.25 mM) luteolin dozunda 0.27 olarak bulunmuş ve tüm luteolin gruplarında etanole kıyasla azalmıştır. Toplam benekler için, luteolinin 0.25 mM dozunda istatistiksel açıdan önemli bir farklılık elde edilmezken, diğer luteolin dozlarında negatif sonuçlar elde edilmiştir.

#### 4.1.2.5. Mirisetinin Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Mirisetinin genotoksik etkisini belirlemek amacıyla mirisetinin 0.5 mM, 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarının kullanıldığı gruplar oluşturulmuştur. Bu grupları

oluşturulurken mirisetin, distile su içerisinde hazırlandığından istatistiksel değerlendirmeler negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Bu grupların kanat benek testinden elde edilen bulguları ve istatistik değerlendirmeleri Çizelge 4.8 de verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** *Drosophila* kanat benek testi ile mirisetin gruplarından elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeler

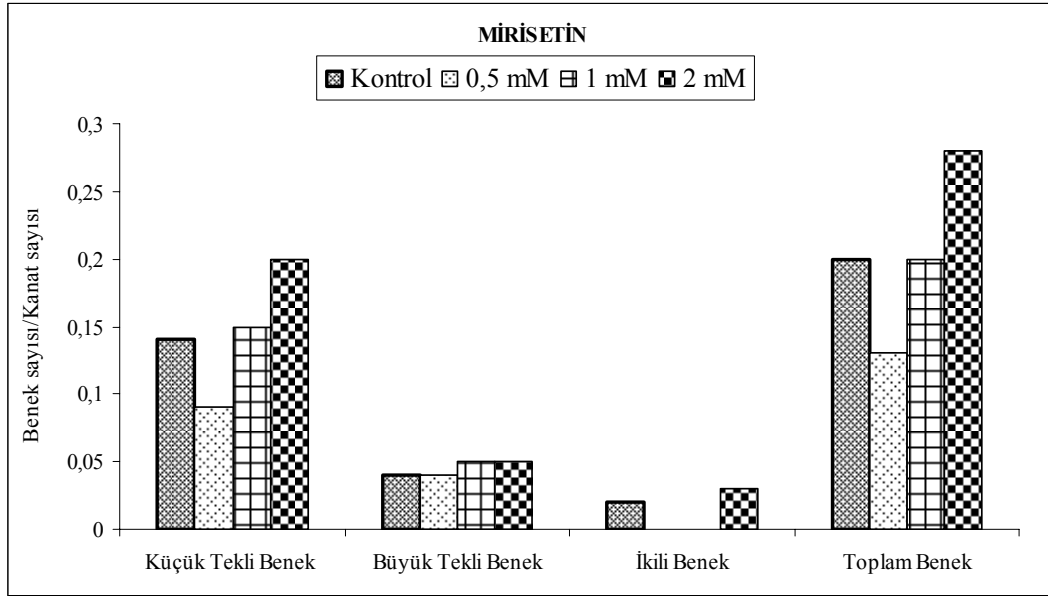
Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*		İstatistiksel bulgular**			
			Küçük benekler (1-2 hücre) (m=2)	tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	Büyük benekler (m=5)	tekli benekler (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
<b>Kontrol</b>	98	100	0.14 (14)		0.04 (4)		0.02 (2)	0.20 (20)
<b>Mirisetin (mM)</b>								
0.5	100	80	0.09 (7)	-	0.04 (3)	-	0.00 (0) i	0.13 (10) -
1	100	60	0.15 (9)	-	0.05 (3)	-	0.00 (0) i	0.20 (12) -
2	71	65	0.20 (13)	i	0.05 (3)	-	0.03 (2) i	0.28 (18) i

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

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

Kontrol grubunda larvaların hayatta kalış oranı % 98 iken, mirisetinin 0.5 ve 1 mM dozlarının her ikisinde de % 100 ve en yüksek (2 mM) mirisetin dozunda ise % 71 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Mirisetin gruplarında küçük tekli benekler doz artışına paralel olarak artmıştır. Kontrol grubunda 0.14 olan küçük tekli benek sıklığı en düşük (0.5 mM) ve en yüksek (2mM) mirisetin dozlarında sırasıyla 0.09 ve 0.20 olarak bulunmuştur. Küçük tekli benekler için uygulanan en yüksek (2 mM) mirisetin dozunda istatistiksel açıdan önemli bir fark elde edilememiş ancak diğer dozlarda negatif sonuçlar elde edilmiştir. Büyük tekli beneklerin sıklığı, kontrol grubunda ve en düşük mirisetin dozunda 0.04 iken, diğer mirisetin dozlarında 0.05 olarak bulunmuş ve tüm mirisetin gruplarında istatistiksel açıdan negatif sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubunda 0.02 olan ikili benek sıklığı ise, en yüksek (2 mM) mirisetin dozunda 0.03 olarak bulunmuştur. Ancak diğer mirisetin grupları ikili benekleri hiç indüklememiştir (Şekil 4.7). Tüm mirisetin gruplarında, ikili benek sıklığı bakımından istatistiksel açıdan önemli bir farklılık elde edilememiştir.



**Şekil 4.7.** Mirisetin uygulanan gruplarda kanat başına düşen benek tiplerinin karşılaştırılması (0:Distile su)

Toplam benek sıklığı ise doz artışına paralel olarak artmıştır. En yüksek mirisetin dozunda (2mM), toplam benek sıklığı kontrol grubundan daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.7). Toplam benekler bakımından en yüksek mirisetin dozu (2 mM) hariç diğer dozlarda istatistiksel açıdan negatif sonuçlar elde edilmiştir.

#### 4.1.3. Flavonoidlerin Antigenotoksik Etkilerinin Araştırılması

Son yıllarda flavonoidlere artan ilgi nedeniyle flavonoidlerin farklı mutajenlere karşı çeşitli test sistemlerinde antigenotoksik aktivitelerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır [29,52,136]. Çalışmamızın bu bölümünde daha önce genotoksik etkilerini araştırdığımız ve genotoksik etkilerinin olmadığını belirlediğimiz resveratrol, galangin, luteolin ve mirisetin flavonoidlerinin MNU, SF ve MMC mutajenlerine karşı antigenotoksik aktiviteleri kanat benek testi ile araştırılmıştır. Bu amaçla mutajenlerin farklı dozları literatür taraması ve genotoksisite çalışmaları sonucuna göre belirlenmiştir. Flavonoidlerin ise genotoksisite çalışmalarında kullanılan ve belirlenen dozları antigenotoksite çalışmalarında mutajenlerle birlikte Bölüm 3 te anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Galangin ve luteolin genotoksite çalışmalarında resveratrole ve mirisetine göre oldukça düşük dozlarda uygulandığından, bu iki flavonoidin

antigenotoksik aktivitelerini araştırmak amacıyla genotoksisite çalışmalarında uygulanmış olan en düşük mutajen dozları seçilmiştir. Resveratrol ve mirisetinin ise daha yüksek mutajen dozlarına karşı antigenotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak distile su uygulaması yapılmıştır. Antigenotoksite çalışmasında bu mutajenlerle aynı zamanda pozitif kontrol grupları da oluşturulmuştur. Ayrıca flavonoidlerin farklı konsantrasyonlarının mutajenlerin indüklediği beneklerin oluşumunu ne oranda baskıladığını belirlemek amacıyla % inhibisyon değerleri Abraham'a göre [161] hesaplanmıştır.

#### **4.1.3.1. Resveratrolün Antigenotoksik Etkisinin Araştırılması**

Resveratrolün (RES) antigenotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla MNU (1 mM), SF (1mM) veya MMC (0.05 mM) ile birlikte uygulanan resveratrolün farklı konsantrasyonları için ayrı ayrı uygulama grupları oluşturulmuştur. Bu gruplarda her mutajenin tek dozu ile resveratrolün üç farklı dozu (0.2 mM, 0.5 mM ve 1 mM) birlikte uygulanmıştır. Uygulama gruplarından elde edilen kanat benek testi sonuçları ve istatistik değerlendirmeleri izelge 4.9 da verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre larvaların hayatta kalış oranları karşılaştırıldığında; MNU (1 mM) grubunda hayatta kalış oranı % 95 olarak bulunurken, aynı MNU konsantrasyonu ile birlikte uygulanan resveratrolün üç farklı dozunda hayatta kalış oranları azalmıştır (izelge 4.9). Bu sonuçlar, resveratrolün genetoksite çalışmalarında belirlenen hayatta kalış oranlarına benzer bulunmuştur (izelge 4.5). SF (1 mM) grubunda hayatta kalış oranı % 67 iken, SF ile birlikte uygulanan resveratrolün 0.2 ve 1 mM dozlarında sırasıyla % 79 ve % 74 olarak bulunmuştur. Hayatta kalış oranı resveratrolün doz artışına bağlı olarak azalmış ancak SF grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde MMC (0.05 mM) grubunda oldukça düşük (% 46) olan hayatta kalış oranının, MMC ile birlikte uygulanan resveratrol gruplarında yüksek oranlarda arttığı (% 76-85) grlmştir (izelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** Resveratrolün farklı dozlarının MMC, SF ve MNU ile birlikte uygulanması sonucunda *D.melanogaster* kanat benek testinde elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler

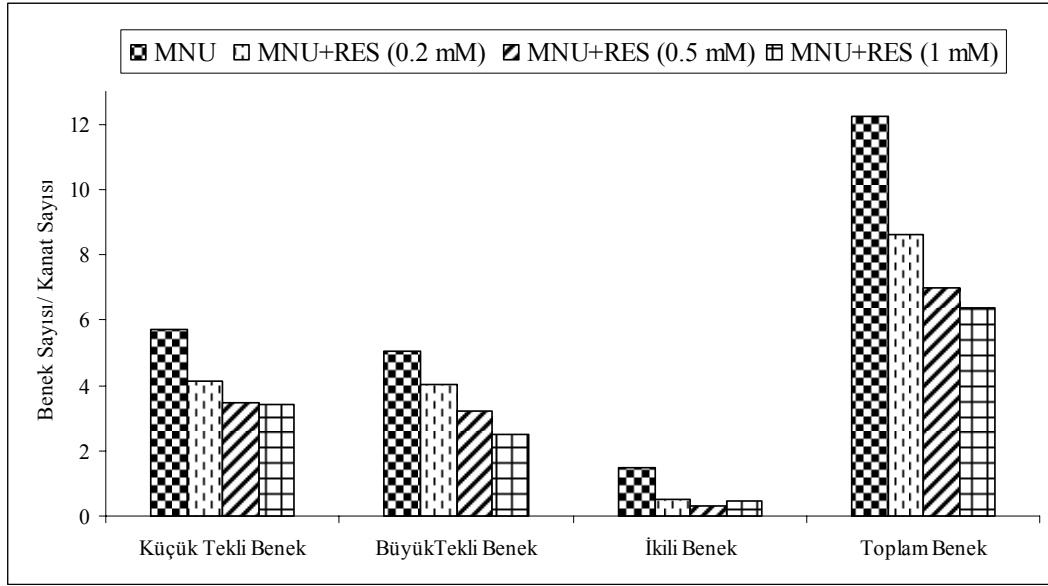
Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*		İstatistiksel bulgular**			% İnhb <sup>a</sup>
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m =2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m =5)	İkili benekler (m =5)	Toplam benek sayısı (m =2)		
<b>MNU (mM)</b>								
1	95	100	5.70 (570)	5.05 (505)	1.50 (150)	12.25 (1225)		
<b>MNU (1mM) + Resveratrol (mM)</b>								
0.2	84	80	4.13 (330) -	4.01 (321) -	0.49 (39) -	8.63 (690) -	30.08	
0.5	85	80	3.46 (277) -	3.21 (257) -	0.32 (26) -	7.00 (560) -	43.57	
1	82	80	3.40 (272) -	2.51 (201) -	0.45 (36) -	6.36 (509) -	48.86	
<b>SF (mM)</b>								
1	67	75	3.16 (237)	0.84 (63)	0.20 (15)	4.20 (315)		
<b>SF (1 mM) + Resveratrol (mM)</b>								
0.2	79	80	2.83 (226) -	0.60 (48) -	0.12 (10) -	3.55 (284) -	16.25	
0.5	75	80	2.03 (162) -	0.32 (26) -	0.10 (8) -	2.45 (196) -	43.75	
1	74	80	2.12 (170) -	0.23 (18) -	0.14 (11) -	2.49 (199) -	39.60	
<b>MMC (mM)</b>								
0.05	60	72	6.53 (471)	6.91 (498)	3.53 (254)	16.98 (1223)		
<b>MMC (0.05 mM)+ Resveratrol (mM)</b>								
0.2	80	80	5.21 (417) -	4.92 (394) -	2.46 (197) -	12.60 (1008) -	26.13	
0.5	76	80	4.07 (326) -	4.11 (329) -	2.07 (166) -	10.26 (821) -	40.05	
1	85	80	3.04 (243) -	2.95 (236) -	1.72 (138) -	7.71 (617) -	55.25	

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

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

<sup>a</sup>% inhibisyon hesaplanması, Abraham [161]

MNU grubu ve MNU ile resveratrolün farklı dozlarının birlikte uygulandığı gruplarda benek tiplerinin sıklığı karşılaştırıldığında, resveratrol dozunun artmasına bağlı olarak MNU'nun indüklediği küçük ve büyük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklıklarının azaldığı Çizelge 4.9 ve Şekil 4.8 de görülmektedir.

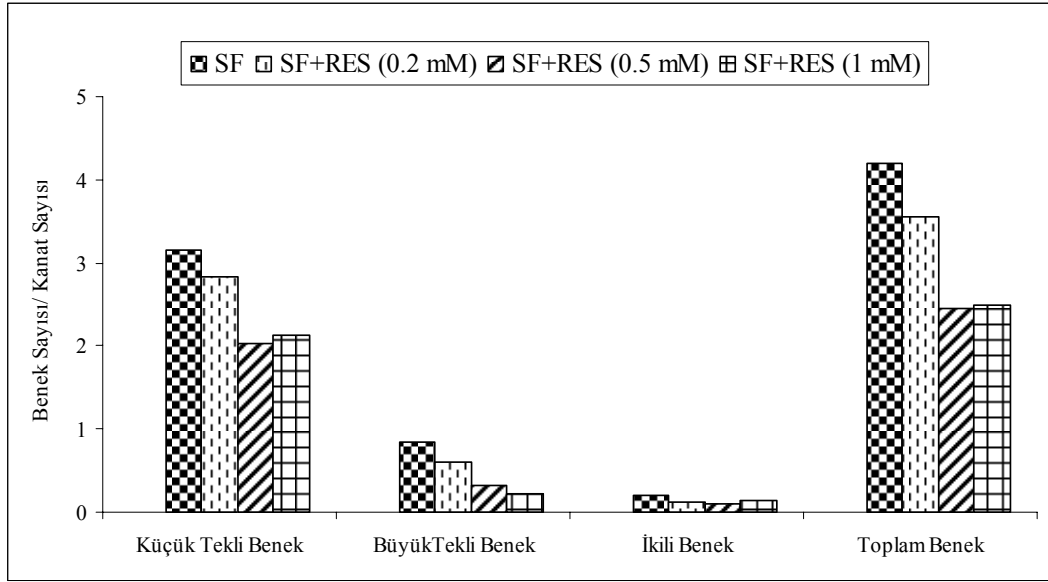


**Şekil 4.8.** MNU (1mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MNU ile birlikte uygulanan resveratrolün farklı dozlarının etkisi

MNU ile birlikte uygulanan resveratrol gruplarında ikili benek sıklığındaki azalma, resveratrol dozuna bağlı olarak değişen oranlarda gözlenmiştir. İkili benek sıklığını en fazla resveratrolün 0.5 mM dozu azaltmıştır (Şekil 4.8). MNU grubunda küçük tekli benek sıklığı 5.70 ve büyük tekli benek sıklığı 5.05 iken, MNU ile birlikte uygulanan resveratrolün 0.2 mM dozunda küçük ve büyük tekli benek sıklıkları sırasıyla 4.13 ve 3.40 olarak bulunmuştur. MNU grubunda toplam benek sıklığı 12.25 iken, MNU ile birlikte uygulanan resveratrolün 0.2 mM dozunda 8.63 olarak bulunmuştur. Birlikte uygulama gruplarında, MNU grubuna kıyasla tüm benek tiplerinin sıklıklarındaki azalma istatistiksel olarak önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir.

SF (1 mM) grubundan ve aynı SF dozu ile birlikte uygulanan resveratrol gruplarından (SF+RES) elde edilen kanat benek testi sonuçları Çizelge 4.9 da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre SF ile birlikte uygulanan resveratrol gruplarında, SF'nin neden olduğu tüm benek tiplerinin sıklıkları değişen oranlarda azalmıştır. Küçük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklıklarındaki azalma en fazla SF ile birlikte uygulanan resveratrolün 0.5 mM dozunda gözlenmiştir (Şekil 4.9).

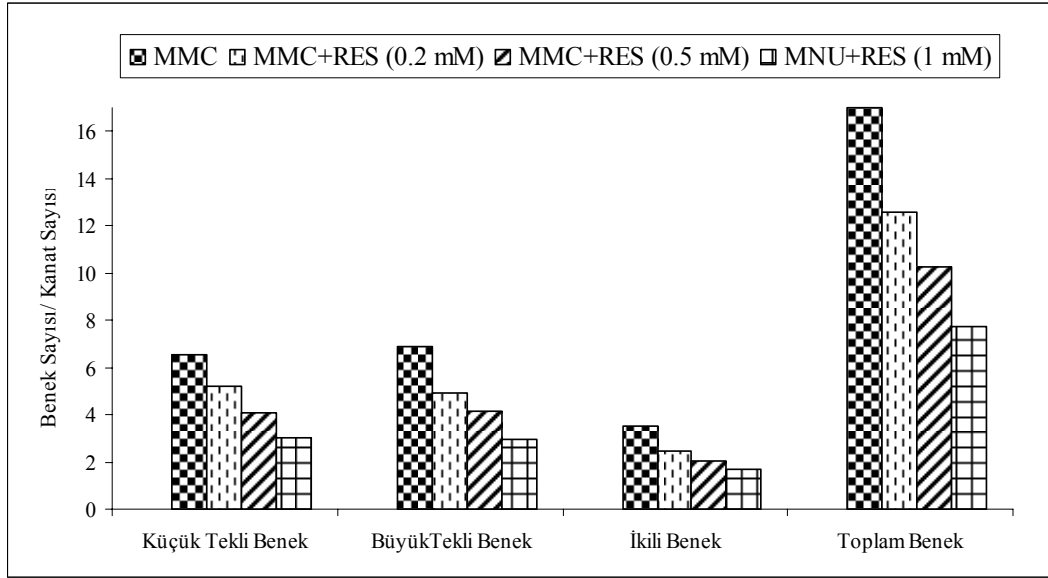




**Şekil 4.9.** SF (1 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine SF ile birlikte uygulanan resveratrolün farklı dozlarının etkisi

SF grubuna kıyasla SF ile birlikte uygulanan tüm resveratrol gruplarında, resveratrolün doz artışına paralel olarak büyük tekli beneklerin sıklığının azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 4.9). SF ile resveratrolün farklı dozlarının birlikte uygulanmasıyla oluşturulan tüm gruplarda küçük ve büyük tekli benekler, ikili benekler ve toplama beneklerin sıklıklarındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir.

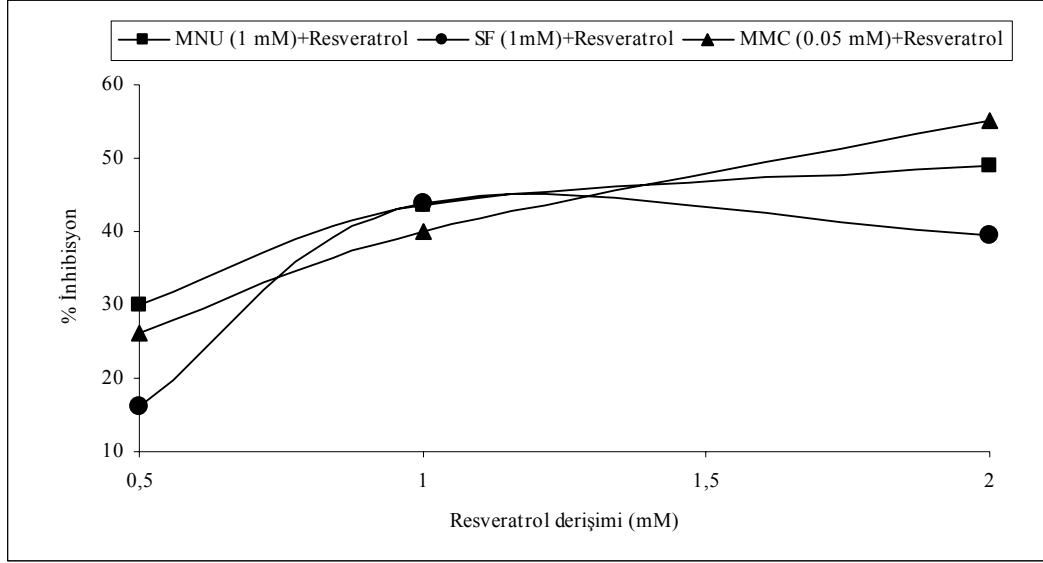
Son olarak resveratrolün antijenotoksik aktivitesi MMC'nin 0.05 mM dozuna karşı araştırılmıştır. MMC (0.05 mM) ve resveratrolün farklı dozlarının (MMC+RES) birlikte uygulanmasıyla oluşturulan gruplardan elde edilen kanat benek testi sonuçları Çizelge 4.9 da verilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre MMC ile birlikte uygulanan resveratrol gruplarında, MMC'nin indüklediği tüm benek tiplerinin sıklığının resveratrol dozunun artışına paralel olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.10). MMC grubunda küçük ve büyük tekli benek sıklıkları sırasıyla 6.53 ve 6.91 iken, MMC ile birlikte uygulanan resveratrolün 0.2 mM dozunda 5.21 ve 4.92 olarak bulunmuştur. Birlikte uygulama gruplarında kullanılan resveratrolün tüm dozları, MMC'nin indüklediği büyük tekli beneklerin oluşumunu küçük tekli beneklere kıyasla daha fazla engellemiştir.



**Şekil 4.10.** MMC (0.05 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MMC ile birlikte uygulanan resveratrolün farklı dozlarının etkisi

MMC grubunda ikili benek ve toplam benek sıklığı sırasıyla 3.35 ve 16,98 iken MMC ile birlikte uygulanan resveratrolün 0.2 mM dozunda 2.46 ve 16.60 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9). MMC ile birlikte uygulanan tüm resveratrol gruplarında tüm benek tiplerinin sıklıklarındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir.

Mutajenlerle birlikte uygulanan tüm resveratrol dozları MNU (1 mM), SF (1 mM) ve MMC (0.05 mM) mutajenlerinin indüklediği benek tiplerini değişen oranlarda inhibe etmiştir (Şekil 4.11). Hesaplanan inhibisyon değerleri Çizelge 4.9 da verilmiştir. MNU veya MMC ile birlikte uygulanan resveratrol gruplarında % inhibisyon değerleri resveratrol dozunun artışına paralel olarak artmıştır (Şekil 4.11). Resveratrolün 0.2 mM ve 0.5 mM dozları, MNU'nun indüklediği benekleri MMC'nin indüklediği beneklere göre daha fazla inhibe ederken, en yüksek resveratrol dozunda (1 mM) ise tam tersi bir durum gözlenmiştir. SF ile birlikte uygulanan resveratrol konsantrasyonları karşılaştırıldığında, SF tarafından indüklenen benekleri en fazla 0.5 mM resveratrol dozunun inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** MNU, SF ve MMC'nin *D. melanogaster*'de indüklediği somatik mutasyonlara karşı resveratrolün farklı dozlarının inhibisyon etkisi

#### 4.1.3.2. Galanginin Antigenotoksik Etkisinin Araştırılması

Galanginin (GAL) antigenotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla MNU (0.5 mM), SF (0.5 mM) veya MMC (0.025 mM) ile birlikte uygulanan galangin (mutajen + galangin) grupları oluşturuldu. Bu gruplarda her mutajenin tek dozu ile galanginin üç farklı dozu (0.075 mM, 0.10 mM ve 0.25 mM) birlikte uygulandı. Uygulama gruplarından elde edilen kanat benek testi sonuçları ve istatistik değerlendirmeleri Çizelge 4.10 da verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre larvaların hayatta kalış oranları karşılaştırıldığında; MNU (0.5 mM) grubunda hayatta kalış oranı % 96 iken aynı MNU dozu ile birlikte uygulanan en yüksek (0.25 mM) galangin dozunda ise % 71 olarak bulunmuştur. MNU grubuna kıyasla birlikte uygulama gruplarında, galangin dozunun artışına paralel olarak hayatta kalış oranı azalmıştır (Çizelge 4.10). SF (0.5 mM) grubunda hayatta kalış oranı % 72 iken aynı SF dozu ile birlikte uygulanan galanginin 0.075 ve 0.25 mM dozlarında ise sırasıyla % 81 ve % 85 olarak bulunmuştur. SF ile birlikte uygulanan galangin gruplarında hayatta kalış oranı galanginin doz artışına paralel olarak artmıştır. Benzer şekilde MMC (0.025 mM) grubunda % 64 olan hayatta kalış oranı, MMC ile birlikte uygulanan galangin gruplarında doz artışına bağlı olarak yüksek oranda (% 92-85) artmıştır (Çizelge 4.10). MMC'nin neden olduğu toksik etkiyi en fazla 0.10 mM

galangin dozu azaltmış ve bu dozun kullanıldığı birlikte uygulama grubunda hayatta kalış oranı % 92 olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.10.** Galanginin farklı dozlarının MMC, SF ve MNU ile birlikte uygulanması sonucunda *D.melanogaster* kanat benek testinde elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler

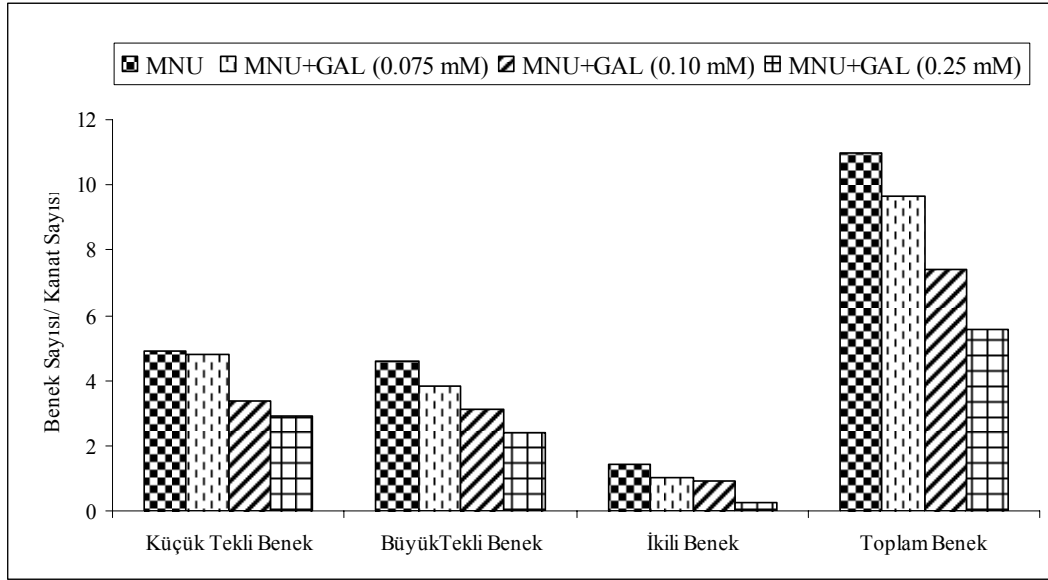
Uygulama grupları	Hayatta kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*		İstatistiksel bulgular**			% İnhb <sup>a</sup>
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)		
<b>MNU (mM)</b>								
0.5	96	100	4.90 (490)	4.61 (461)	1.45 (145)	10.96 (1096)		
<b>MNU (0.5 mM) + Galangin (mM)</b>								
0.075	76	80	4.80 (384) -	3.84 (307) -	1.01 (81) -	9.65 (772) -	12.17	
0.10	74	80	3.35 (268) -	3.12 (250) -	0.92 (74) -	7.40 (592) -	33.09	
0.25	71	80	2.90 (232) -	2.42 (194) -	0.25 (20) -	5.58 (446) -	50.05	
<b>SF (mM)</b>								
0.5	72	66	1.70 (112)	0.64 (42)	0.09 (6)	2.42 (160)		
<b>SF (0.5 mM) + Galangin (mM)</b>								
0.075	81	80	1.45 (116) -	0.70 (56) i	0.07 (6) -	2.23 (178) -	8.958	
0.10	83	80	1.01 (81) -	0.61 (49) -	0.05 (4) -	1.68 (134) -	33.69	
0.25	85	80	0.58 (46) -	0.23 (18) -	0.01 (1) -	0.81 (65) -	72.46	
<b>MMC (mM)</b>								
0.025	64	80	4.15 (332)	4.73 (379)	2.80 (224)	11.69 (935)		
<b>MMC (0.025 mM) + Galangin (mM)</b>								
0.075	90	80	4.00 (320) -	4.12 (330) -	2.40 (192) -	10.52 (842) -	10.12	
0.10	92	80	3.02 (242) -	3.50 (280) -	2.03 (162) -	8.55 (684) -	27.31	
0.25	85	80	2.10 (168) -	2.01 (161) -	1.76 (141) -	5.88 (470) -	50.60	

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

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

<sup>a</sup> % inhibisyon hesaplanması, Abraham [161]

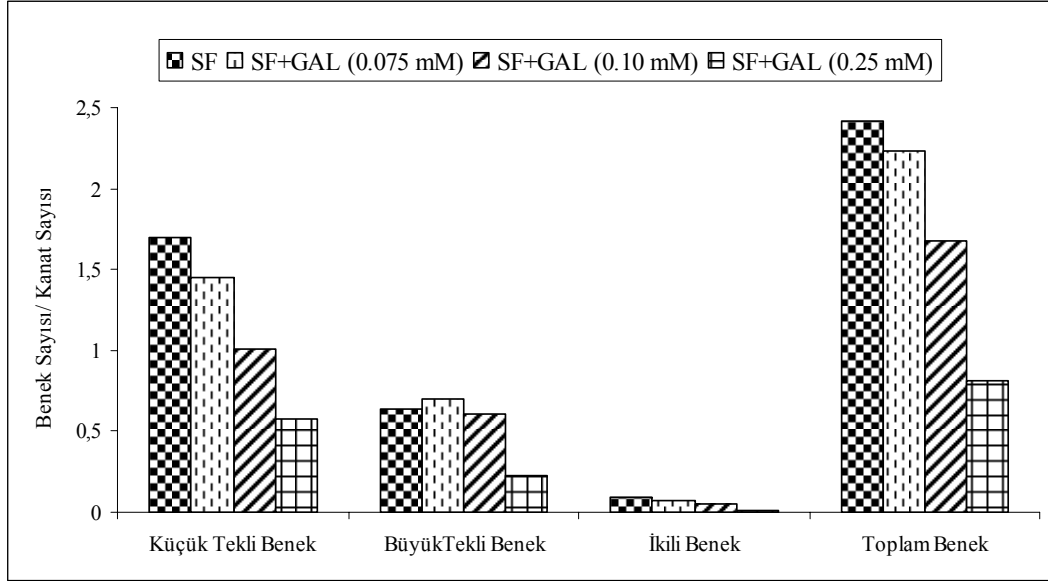
MNU ile birlikte uygulanan galangin gruplarında, galangin dozunun artışına bağlı olarak MNU tarafından oluşturulan küçük ve büyük tekli beneklerin, ikili beneklerin ve toplam beneklerin sıklıkları azalmıştır (Şekil 4.12). MNU ile birlikte uygulanan en düşük galangin dozunda (0.075 mM), MNU'nun oluşturduğu büyük tekli benekler küçük tekli beneklerden daha fazla baskılanırken, kullanılan diğer galangin dozlarında ise benzer oranlarda baskılanmıştır (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** MNU (0.5 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MNU ile birlikte uygulanan galanginin farklı dozlarının etkisi

İkili benekler ise en fazla MNU ile birlikte uygulanan en yüksek galangin dozunda (0.25 mM) azalmıştır. Toplam benek sıklığı MNU grubunda 10.96 iken, MNU ile birlikte uygulanan galanginin en düşük (0.075 mM) ve en yüksek (0.25 mM) dozlarından sırasıyla 9.65 ve 5.58 olarak bulunmuştur. MNU grubuna kıyasla, aynı MNU dozuyla birlikte uygulanan tüm galangin gruplarında, benek tiplerinin sıklıklarındaki azalma istatistiksel olarak önemli bulunduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir.

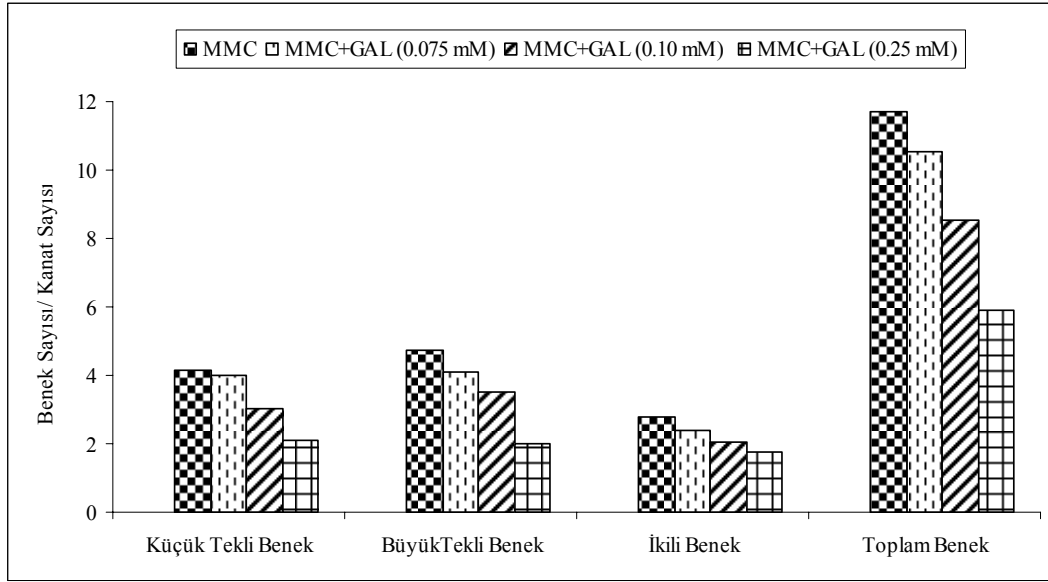
SF (0.5 mM) grubu ve aynı SF dozuyla birlikte uygulanan galangin gruplarında elde edilen kanat benek testi sonuçları Çizelge 4.10 da verilmiştir. Bu sonuçlara göre, SF ile birlikte uygulanan tüm galangin gruplarında, SF'nin indüklediği küçük tekli benek, ikili benek ve toplam beneklerin sıklığının galangin dozunun artışına paralel olarak azaldığı görülmektedir (Şekil 4.13). SF grubunda küçük tekli benek sıklığı 1.70 iken, SF ile birlikte uygulanan galanginin 0.075 mM dozunda 1.45 olarak bulunmuştur. SF grubunda ikili benek ve toplam benek sıklığı sırasıyla 0.09 ve 2.42 iken, SF ile birlikte uygulanan en düşük (0.075 mM) galangin dozunda sırasıyla 0.07 ve 2.23 olarak gözlenmiştir. Tüm birlikte uygulama gruplarında, her üç benek tipinin sıklığındaki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve negatif sonuçlar elde edilmiştir. Büyük tekli beneklerde ise değişen sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** SF'nin (0.5 mM) neden olduğu benek tipleri üzerine SF ile birlikte uygulanan galanginin farklı dozlarının etkisi

SF grubunda 0.64 olan büyük tekli benek sıklığı, SF ile birlikte uygulanan en düşük galangin dozunda (0.075 mM) çok az bir artış göstererek 0.70 olarak bulunmuş ve bu artışa karşın istatistiksel olarak önemli bir sonuç elde edilememiştir. SF ile birlikte uygulanan diğer galangin gruplarında, SF'nin neden olduğu büyük tekli benekler galangin dozunun artışına paralel olarak azalmıştır (Şekil 4.13). Büyük tekli benek sıklığındaki bu azalma istatistiksel açıdan önemli bulunduğu için negatif olarak değerlendirilmiştir.

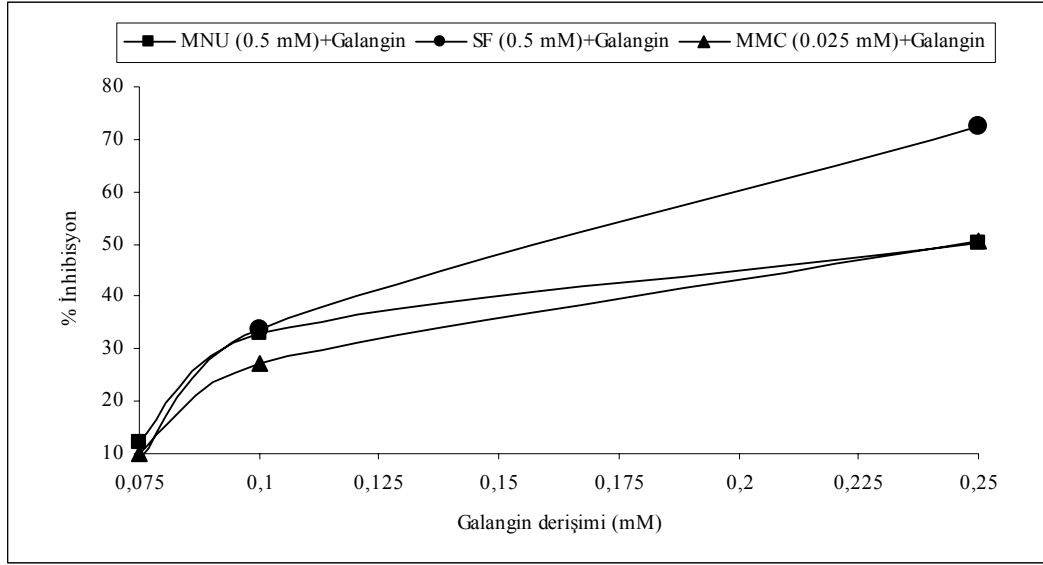
Son olarak galanginin antijenotoksik aktivitesi MMC (0.025 mM) mutajenine karşı araştırılmıştır. MMC (0.025 mM) ile galanginin farklı dozlarının (MMC+GAL) birlikte uygulanmasıyla oluşturulan gruplardan elde edilen kanat benek testi sonuçları Çizelge 4.10 da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MMC ile birlikte uygulanan tüm galangin gruplarında, artan galangin dozuna bağlı olarak MMC tarafından indüklenen küçük ve büyük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklığının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** MMC (0.025 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MMC ile birlikte uygulanan galanginin farklı dozlarının etkisi

MMC grubunda küçük tekli benek ve büyük tekli benek sıklığı sırasıyla 4.15 ve 4.73 iken, MMC ile birlikte uygulanan en yüksek (0.25 mM) galangin dozunda 4.00 ve 4.12 olarak bulunmuştur. MMC grubunda ikili benek ve toplam benek sıklığı sırasıyla 2.80 ve 11.69 iken, en yüksek (0.25 mM) galangin dozunda 1.76 ve 5.88 olarak bulunmuştur. MMC ile birlikte uygulanan tüm galangin gruplarında, benek tiplerinin sıklığındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.10).

Galangin, birlikte uygulama yapılan tüm gruplarda MNU (0.5 mM), SF (0.5 mM) veya MMC (0.025 mM) mutajenlerinin oluşturduğu toplam benekleri değişen oranlarda azaltmıştır (Şekil 4.15). Mutajenler ile birlikte uygulanan farklı galangin dozlarının, mutajenlerin indüklediği benekleri ne oranda engellediğini belirlemek amacıyla % inhibisyon değerleri hesaplanarak Çizelge 4.10 da verilmiştir. MNU, SF veya MMC ile birlikte uygulanan galangin gruplarında, % inhibisyon değerleri galanginin doz artışına paralel olarak artmıştır. Birlikte uygulama gruplarında kullanılan en düşük (0.075) galangin dozu, mutajenlerin indüklediği benekleri benzer oranlarda (% 8.96-12.17) inhibe etmiştir. Ancak en yüksek (0.25 mM) galangin dozu, en fazla SF nin oluşturduğu benekleri (% 72.46) baskımlarken, MNU ve MMC'nin indüklediği benekleri benzer oranda (% 50.05 ve 50.60) baskılamıştır.



**Sekil 4.15.** MNU, SF ve MMC'nin *D. melanogaster*'de indüklediği somatik mutasyonlara karşı galanginin farklı dozlarının inhibisyon etkisi

#### 4.1.3.3. Luteolinin Antigenotoksik Etkisinin Araştırılması

Luteolinin antigenotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla MNU (0.5 mM), SF (0.5 mM) veya MMC (0.025 mM) ile birlikte uygulanan luteolinin farklı konsantrasyonları için gruplar oluşturuldu. Bu gruplarda mutajenlerin sabit dozu ile luteolinin farklı dozları (0.075 mM, 0.10 mM ve 0.25 mM) birlikte uygulandı. Uygulama gruplarından elde edilen kanat benek testi sonuçları ve istatistik değerlendirmeleri Çizelge 4.11 da verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, larvaların hayatta kalış oranı MNU (0.5 mM) grubuna kıyasla aynı MNU dozu ile birlikte uygulanan luteolin gruplarında azalmıştır. MNU grubunda % 96 olan hayatta kalış oranı, MNU ile birlikte uygulanan luteolinin 0.1 mM dozunda % 76 olarak bulunmuştur.



**Çizelge 4.11.** Luteolinin farklı dozlarının MMC, SF ve MNU ile birlikte uygulanması sonucunda *D.melanogaster* kanat benek testinde elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler

Uygulama grupları	Hayatta Kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*		İstatistiksel bulgular**			% İnhb <sup>a</sup>
			Küçük benekler (1-2 hücre) (m=2)	tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	Büyük benekler (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)	
<b>MNU (mM)</b>								
0.5	96	100	4.90 (490) +	4.61(461) +	1.45 (145) +	10.96 (1096)+		
<b>MNU (0.5 mM) + Luteolin (mM)</b>								
0.075	81	80	4.21 (337) -	3.91 (313) -	1.15 (92) -	9.28 (742) -	15.66	
0.10	76	80	3.54 (283) -	3.04 (243) -	0.98 (78) -	7.55 (604) -	31.69	
0.25	84	80	2.74 (219) -	2.45 (196) -	0.42 (34) -	5.61 (449) -	49.7	
<b>SF (mM)</b>								
0.5	72	66	1.70 (112) +	0.64 (42) +	0.09 (6)+	2.42 (160) +		
<b>SF (0.5 mM)+ Luteolin (mM)</b>								
0.075	80	80	1.21 (97) -	0.54 (43) -	0.09 (7) -	1.84 (147) -	26.38	
0.10	75	80	1.02 (82) -	0.34 (27) -	0.04 (3) -	1.40 (112) -	46.05	
0.25	74	80	0.90 (72) -	0.22 (18) -	0.06 (4) -	1.18 (94) -	56.16	
<b>MMC (mM)</b>								
0.025	64	80	4.15 (332) +	4.73 (379) +	2.80 (224) +	11.69 (935)+		
<b>MMC ( 0.025 mM)+ Luteolin (mM)</b>								
0.075	80	80	3.90 (312) -	4.21 (337) -	2.70 (216) -	10.81 (865) -	7.617	
0.10	75	80	3.05 (244) -	3.23 (258) -	2.06 (165) -	8.34 (667) -	29.16	
0.25	70	80	1.87 (150) -	1.54 (123) -	1.42 (114) -	4.84 (387) -	59.63	

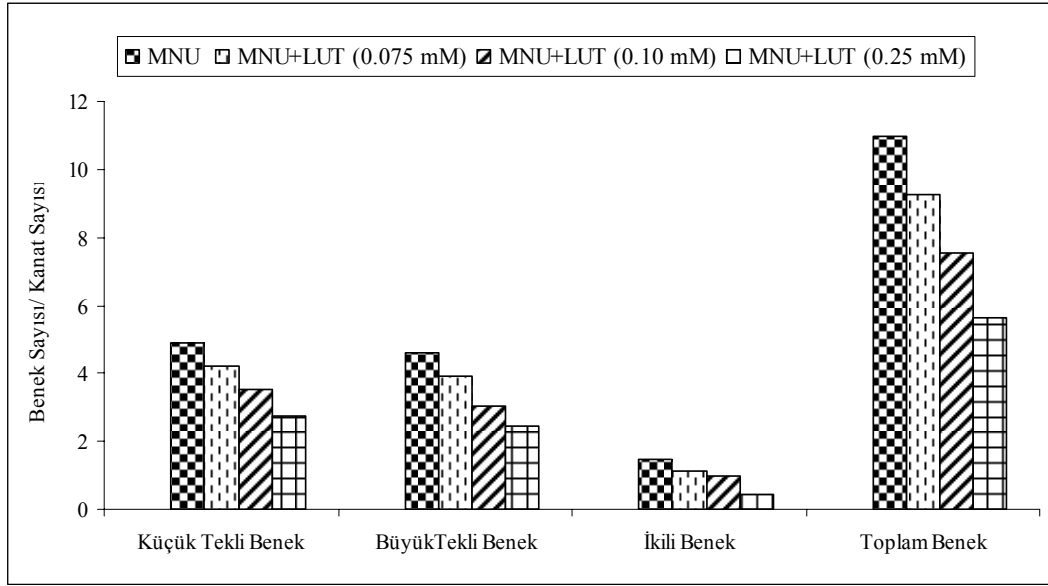
\*Kanat başına düşen benek sayısı, Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.

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

<sup>a</sup> % inhibisyon hesaplanması, Abraham [161]

SF (0.5 mM) grubunda hayatta kalış oranı % 72 iken, SF ile birlikte uygulanan en yüksek (0.25 mM) luteolin dozunda % 74 olarak bulunmuştur. Hayatta kalış oranı, SF grubuna kıyasla SF ile birlikte uygulanan luteolin gruplarında artmıştır. Benzer şekilde MMC (0.025 mM) ile birlikte uygulanan luteolin gruplarında da MMC grubuna kıyasla hayatta kalış oranı artmıştır. MMC grubunda % 64 olan hayatta kalış oranı, luteolinin 0.075 mM ve 0.25 mM dozlarında sırasıyla % 80 ve % 70 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.11).

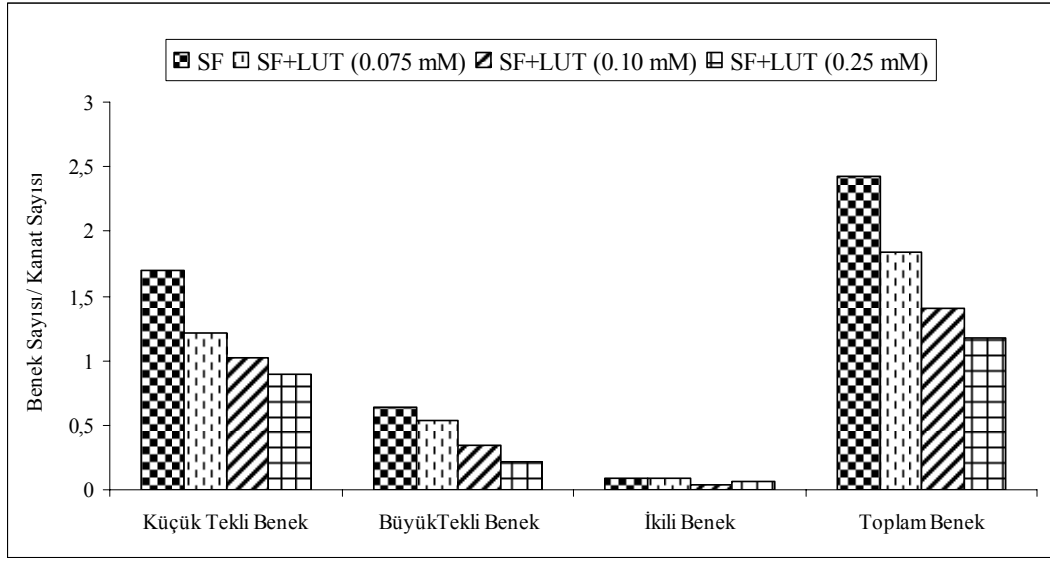
MNU (0.5 mM) ile birlikte uygulanan luteolin gruplarında MNU'nun indüklediği büyük ve küçük tekli benekler, ikili benekler ve toplam benekler luteolin dozunun artışına bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.16).



**Sekil 4.16.** MNU (0.5 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MNU ile birlikte uygulanan luteolinin farklı dozlarının etkisi

MNU grubunda küçük ve büyük tekli benek sıklığı sırasıyla 4.90 ve 4.61 iken MNU ile birlikte uygulanan en düşük (0.075 mM) luteolin dozunda 4.21 ve 3.91 olarak bulunmuştur. MNU grubunda ikili ve toplam benek sıklığı sırasıyla 1.45 ve 10.96 olarak bulunurken, MNU ile birlikte uygulanan en düşük luteolin dozunda ise 1.15 ve 9.28 olarak gözlenmiştir. MNU grubuna kıyasla MNU ile birlikte uygulanan tüm luteolin gruplarında gözlenen tüm benek tiplerinin sıklıklarındaki azalma istatistiksel açıdan önemli bulunmuş ve negatif sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.11)

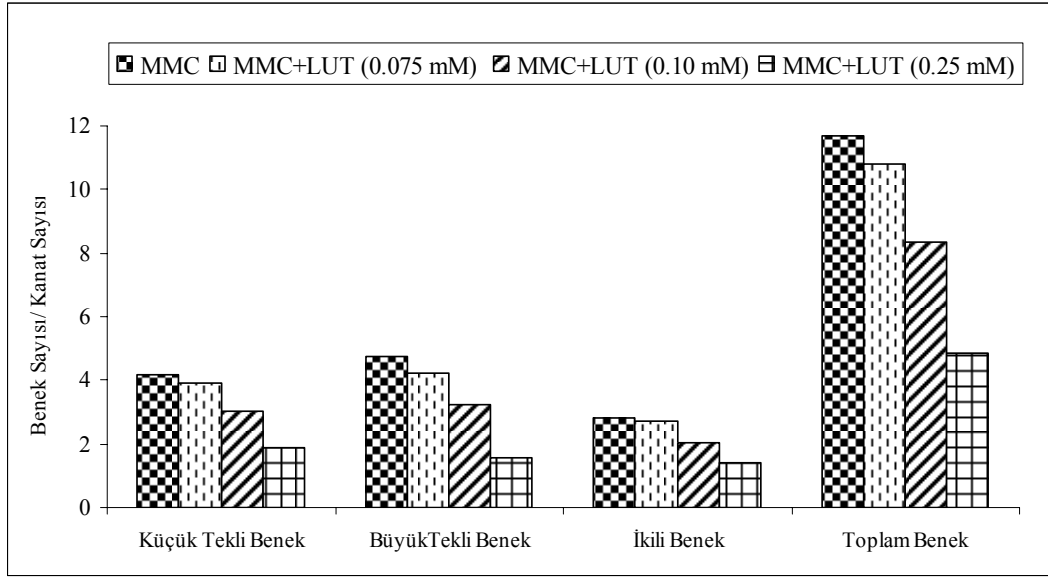
SF (0.5 mM) ile luteolinin farklı dozlarının (SF+LUT) birlikte uygulamasıyla oluşturulan gruplardan elde edilen kanat benek testi sonuçları Çizelge 4.11 de verilmiştir. SF ile birlikte uygulanan tüm luteolin gruplarında artan luteolin dozuna paralel olarak küçük ve büyük tekli benek ile toplam benek sıklığı azalmıştır (Şekil 4.17). SF grubunda küçük tekli benek ve büyük tekli benek sıklığı sırasıyla 1.70 ve 0.64 iken en yüksek luteolin dozunun (0.25 mM) kullanıldığı grupta 0.90 ve 0.22 olarak bulunmuştur. SF ile birlikte uygulanan tüm luteolin gruplarında tekli beneklerin her ikisinde de gözlenen azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir.



**Şekil 4.17.** SF (0.5 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine SF ile birlikte uygulanan luteolinin farklı dozlarının etkisi

İkili beneklerde ise SF ile birlikte uygulanan luteolinin dozlarına bağlı olarak değişen sonuçlar elde edilmiştir. En düşük (0.075) luteolin dozunun kullanıldığı birlikte uygulama grubu ile SF grubunda ikili benek sıklığı 0.09 iken, SF ile birlikte uygulanan luteolinin 0.10 mM ve 0.25 mM dozlarında sırasıyla 0.04 ve 0.06 olarak bulunmuştur. Toplam benek sıklığı luteolin dozunun artışına paralel olarak azalmıştır. İkili benekler ve toplam benekler bakımından SF ile birlikte uygulanan tüm luteolin gruplarında istatistiksel açıdan negatif sonuçlar elde edilmiştir.

Son olarak luteolinin antijenotoksik aktivitesi MMC (0.025 mM) mutajenine karşı araştırılmıştır. MMC (0.025 mM) ve luteolinin farklı dozlarının (MMC+LUT) birlikte uygulanmasıyla oluşturulan gruplardan elde edilen kanat benek testi sonuçları Çizelge 4.11 de verilmiştir. MMC ile birlikte uygulanan luteolin gruplarında MMC'nin indüklediği tüm benek tiplerinin sıklığının luteolin dozunun artışına bağlı olarak azaldığı Şekil 4.18 de görülmektedir. MMC grubunda küçük ve büyük tekli benek sıklığı sırasıyla 4.15 ve 4.73 iken, MMC ile birlikte uygulanan luteolinin 0.25 mM dozunda 1.87 ve 1.44 olarak bulunmuştur.

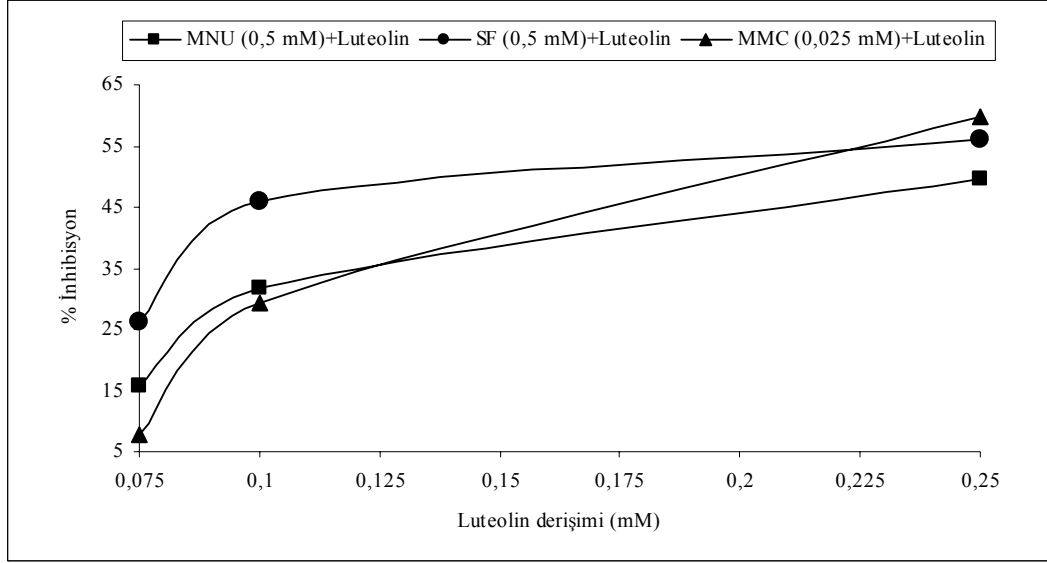


**Şekil 4.18.** MMC (0.025)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MMC ile birlikte uygulanan luteolinin farklı dozlarının etkisi

MMC grubunda ikili benek ve toplam benek sıklığı sırasıyla 2.80 ve 11.69 iken, MMC ile birlikte uygulanan luteolinin 0.25 mM dozunda ise 1.42 ve 4.84 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.11). MMC grubuna kıyasla MMC ile luteolin birlikte uygulama gruplarında küçük ve büyük tekli benek, ikili benek ile toplam benek sıklığındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir.

Luteolin, birlikte uygulama gruplarında mutajenlerin indüklediği tüm benek tiplerinin sıklığını azaltmıştır. Bu sonuçlara göre luteolinin farklı dozları, kanat benek testinde MNU (0.5 mM), SF (0.5 mM) ve MMC (0.025 mM) mutajenlerinin genotoksik aktivitelerini değişen oranlarda baskılamıştır. Hesaplanan % inhibisyon değerleri ise Çizelge 4.11 de verilmiştir.

Luteolinin farklı dozlarının MNU, SF ve MMC ye karşı göstermiş olduğu inhibisyon etkileri Şekil 4.19 da görülmektedir. Mutajenlerle birlikte uygulanan luteolin gruplarında luteolinin doz artışına paralel olarak % inhibisyon değerleri artmıştır. En yüksek luteolin dozunun (0.25 mM) kullanıldığı birlikte uygulama gruplarında, luteolin en fazla MMC'nin indüklediği benekleri inhibe etmiştir. En düşük luteolin dozunun (0.075 mM) kullanıldığı birlikte uygulama gruplarında ise luteolin en fazla SF'nin indüklediği benekleri inhibe etmiştir.



**Sekil 4.19.** MNU, SF ve MMC'nin *D. melanogaster*'de indüklediği somatik mutasyonlara karşı luteolinin farklı dozlarının inhibisyon etkisi

#### 4.1.3.4. Mirisetinin Antigenotoksik Etkisinin Araştırılması

Mirisetin (MRS) antigenotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla MNU (1 mM), SF (1 mM) ve MMC (0.05 mM) mutajenlerinin kullanıldığı mutajen ve mirisetin birlikte uygulama grupları oluşturuldu. Bu gruplarda her mutajenin sabit dozu ile mirisetinin üç farklı dozu (0.5 mM, 1 mM ve 2 mM) birlikte uygulandı. Uygulama gruplarından elde edilen kanat benek testi sonuçları ve istatistik değerlendirmeler Çizelge 4.12 de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, MNU (1 mM) ile birlikte uygulanan mirisetin gruplarında hayatta kalış oranları, mirisetinin doz artışına paralel olarak artmış ancak MNU grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur. MNU grubunda % 95 olan hayatta kalış oranı, MNU ile birlikte uygulanan mirisetinin 2 mM dozunda % 85 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.12). SF (1 mM) ile birlikte uygulanan mirisetin gruplarında ise, mirisetin dozunun artışına bağlı olarak hayatta kalış oranları azalmış ancak SF grubunda gözlenen düşük hayatta kalış oranı artmıştır. SF grubunda hayatta kalış oranı % 67 iken, mirisetinin 0.5 mM dozunda % 79 olarak bulunmuştur. MMC (0.05 mM) grubundaki düşük hayatta kalış oranı (% 60), MMC ile birlikte uygulanan mirisetin gruplarında % 80-85 seviyelerine yükselmiştir (Çizelge 4.12).

**Çizelge 4.12.** Mirisetinin farklı dozlarının MMC, SF ve MNU ile birlikte uygulanması sonucunda *D.melanogaster* kanat benek testinde elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler

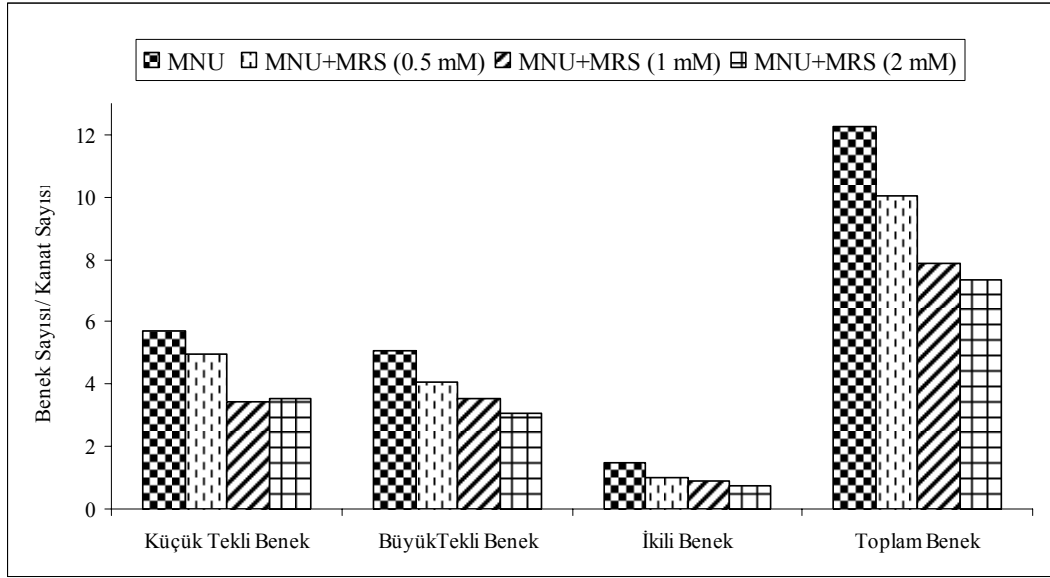
Uygulama grupları	Hayatta Kalış (%)	Kanat sayısı	Benek/kanat*		İstatistiksel bulgular**			% İnhb <sup>a</sup>
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m =2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m =5)	İkili benekler (m =5)	Toplam benek sayısı (m =2)		
<b>MNU (mM)</b>								
1	95	100	5.70 (570) +	5.05 (505) +	1.50 (150) +	12.25 (1225) +		
<b>MNU (1 mM) + Mirisetin (mM)</b>								
0.5	82	80	4.97 (398) -	4.07 (326) -	1.00 (80) -	10.05 (804) -	18.26	
1	83	80	3.41 (273) -	3.56 (285) -	0.89 (71) -	7.86 (629) -	36.41	
2	85	80	3.54 (283) -	3.08 (246) -	0.75 (60) -	7.36 (589) -	40.56	
<b>SF (mM)</b>								
1	67	75	3.16 (237) +	0.84 (63) +	0.20 (15) +	4.20 (315) +		
<b>SF (1mM) + Mirisetin (mM)</b>								
0.5	79	80	3.00 (240) -	0.60 (48) -	0.15 (12) -	3.75 (300) -	11.25	
1	75	80	2.14 (171) -	0.37 (30) -	0.09 (7) -	2.60 (208) -	40.00	
2	71	80	1.52 (122) -	0.14 (11) -	0.11 (9) -	1.78 (142) -	60.63	
<b>MMC (mM)</b>								
0.05	60	72	6.53 (471) +	6.91 (498) +	3.53 (254) +	16.98 (1223) +		
<b>MMC (0.05 mM) + Mirisetin (mM)</b>								
0.5	85	80	4.01 (321) -	4.32 (346) -	3.02 (242) -	11.36 (909) -	33.5	
1	85	80	3.10 (248) -	3.12 (250) -	1.65 (132) -	7.88 (630) -	54.2	
2	80	80	2.50 (200) -	2.10 (168) -	1.04 (83) -	5.64 (451) -	67.61	

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

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

<sup>a</sup> % inhibisyon hesaplanması, Abraham [161]

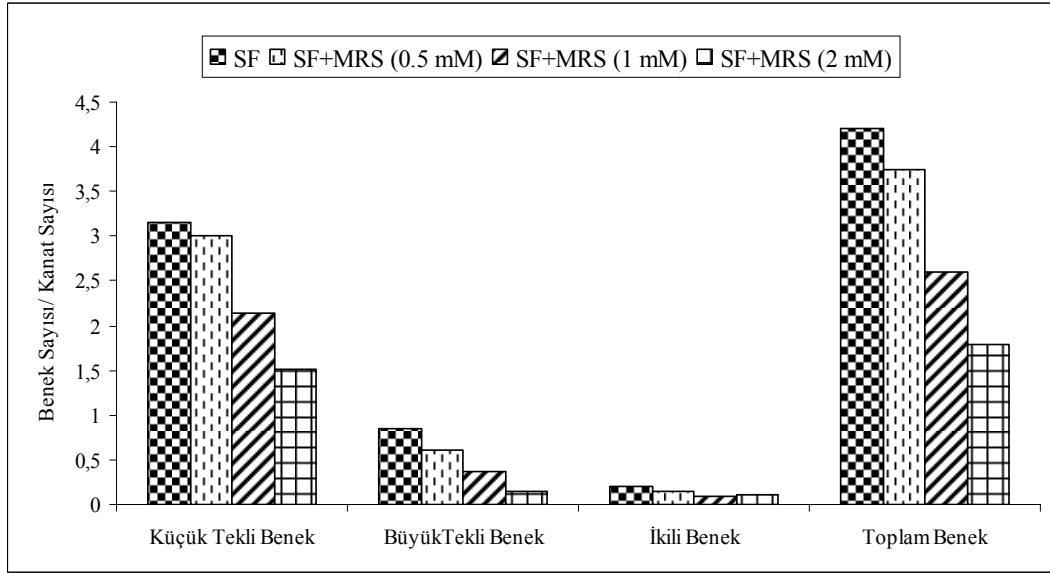
MNU (1 mM) ve mirisetinin farklı dozlarının birlikte uygulanmasıyla oluşturulan gruplarda, MNU'nun indüklediği tüm benek tiplerinin sıklığı, mirisetinin doz artışına paralel olarak azalmıştır (Şekil 4.20). MNU grubunda küçük tekli benek ve büyük tekli benek sıklığı sırasıyla 5.70 ve 5.05 iken, MNU ile birlikte uygulanan mirisetinin 0.5 mM dozunda ise 4.97 ve 4.07 olarak bulunmuştur. Küçük tekli benekleri en fazla mirisetinin 1 mM dozu baskılamıştır (Şekil 4.20). MNU ile birlikte uygulanan tüm mirisetin gruplarında, küçük tekli ve büyük tekli beneklerin sıklığındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir.



**Şekil 4.20.** MNU (1 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MNU ile birlikte uygulanan mirisetinin farklı dozlarının etkisi

MNU grubunda ikili benek ve toplam benek sıklıkları sırasıyla 1.50 ve 12.25 iken, MNU ile birlikte uygulanan mirisetinin 0.5 mM dozunda ise 1.00 ve 10.05 olarak bulunmuştur. MNU ile birlikte uygulanan tüm mirisetin gruplarında, her iki benek tipinin sıklığındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir.

SF (1 mM) ile mirisetinin farklı dozlarının (SF+MRS) birlikte uygulamasıyla oluşturulan gruplardan elde edilen kanat benek testi sonuçları Çizelge 4.12 de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, SF (1 mM) grubuna kıyasla, SF ve mirisetin birlikte uygulama gruplarında mirisetin dozunun artışına paralel olarak tüm benek tiplerinin sıklığının azaldığı görülmektedir (Şekil 4.21). SF grubunda küçük ve büyük tekli benek sıklığı sırasıyla 3.16 ve 0.84 iken, SF ile birlikte uygulanan en düşük (0.5 mM) mirisetin dozunda ise 3.00 ve 0.60 olarak bulunmuştur. İkili benek sıklığı SF grubunda 0.29 iken, SF ile birlikte uygulanan mirisetinin 1 mM dozunda en fazla baskılanmış ve 0.09 olarak bulunmuştur.

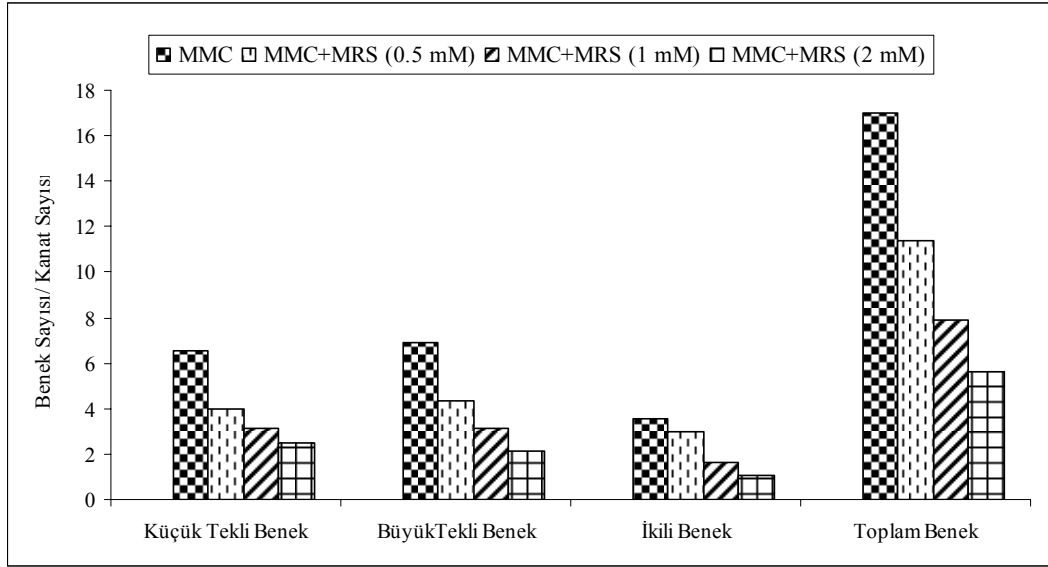


**Sekil 4.21.** SF (1 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine SF ile birlikte uygulanan mirisetinin farklı dozlarının etkisi

SF grubunda 4.20 olan toplam benek sıklığı, SF ile birlikte uygulanan en düşük (0.5 mM) mirisetin grubunda 3.75 olarak gözlenmiştir. SF ile birlikte uygulanan tüm mirisetin gruplarında, benek tiplerininin sıklığındaki azalma istatistiksel açıdan önemli bulunmuş ve negatif sonuçlar elde edilmiştir.

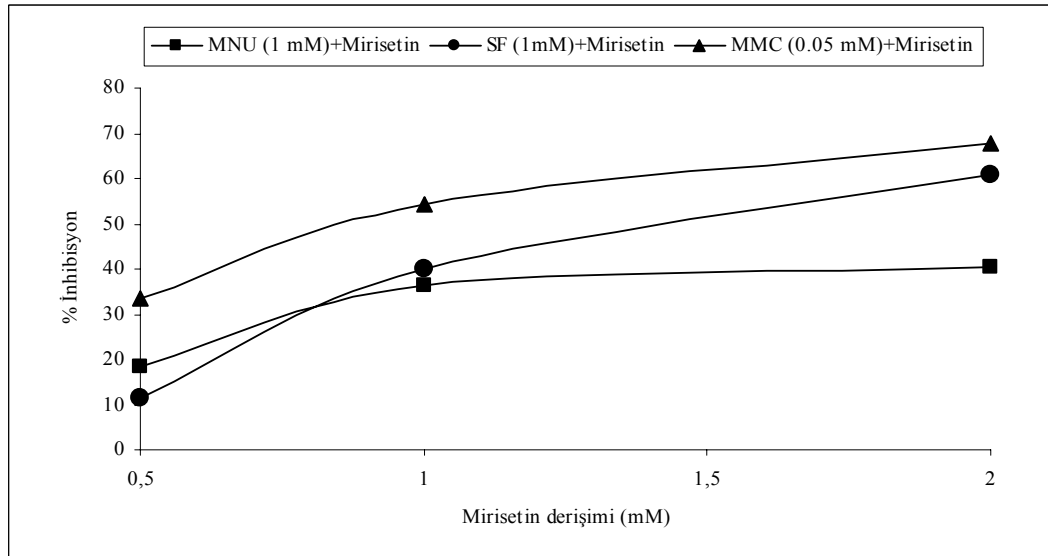
Mirisetinin antigenotoksik aktivitesi son olarak MMC (0.05 mM) mutajenine karşı araştırılmıştır. MMC (0.05 mM) ile mirisetinin farklı dozlarının birlikte uygulanmasıyla oluşturulan gruplardan elde edilen kanat benek testi sonuçları Çizelge 4.12 de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, birlikte uygulama gruplarında artan mirisetin dozuna paralel olarak MMC'nin oluşturduğu küçük ve büyük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklıkları azalmıştır (Şekil 4.22). MMC grubunda küçük ve büyük tekli benek sıklığı sırasıyla 6.53 ve 6.91 olarak bulunurken, MMC ile birlikte uygulanan en düşük (0.5 mM) mirisetin dozunda ise 4.01 ve 4.32 olarak bulunmuştur. MMC grubunda ikili benek ve toplam benek sıklığı sırasıyla 3.53 ve 16,92 iken, MMC ile birlikte uygulanan mirisetinin 0.5 mM dozunda 3.02 ve 11.36 olarak bulunmuştur. MMC grubuna kıyasla MMC ile birlikte uygulanan tüm mirisetin gruplarında küçük ve büyük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklığındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir.





**Şekil 4.22.** MMC (0.05 mM)'nin neden olduğu benek tipleri üzerine MMC ile birlikte uygulanan mirisetinin farklı dozlarının etkisi

Mutajenlerle birlikte uygulanan tüm mirisetin gruplarında MNU (1 mM), MMC (0.05 mM) veya SF (1 mM) mutajenlerinin indüklediği tüm benek tipleri değişen oranlarda inhibe edilmiştir. Mirisetin dozlarının, mutajenlerin indüklediği benekleri ne oranda inhibe ettiğini belirlemek amacıyla % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.12). Mirisetinin inhibisyon etkisi doz artışına paralel olarak artmıştır (Şekil 4.23).



**Şekil 4.23.** MNU, SF ve MMC'nin *D. melanogaster*'de indüklediği somatik mutasyonlara karşı mirisetinin farklı dozlarının inhibisyon etkisi

Mutajenlerle birlikte uygulanan mirisetin gruplarında, kullanılan tüm mirisetin dozları en fazla MMC'nin indüklediği benekleri baskılamıştır (Şekil 4.23).

#### **4.2. Resveratrol, Galangin, Luteolin ve Mirisetinin *Drosophila melanogaster* Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

Çalışmaların bu bölümünde öncelikle Bölüm 3.5.5 de açıklandığı gibi resveratrol, galangin, luteolin ve mirisetinin belirlenen konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Ayrıca mirisetin hariç diğer flavonoidler etanolde çözünerek hazırlandığından, etanol kontrol grubu da çalışmalara eklenmiştir. Hazırlanan bu flavonoid çözeltileri *Drosophila* hazır besiyerine eklenerek çalışma grupları oluşturulmuştur. Bu çözeltilerin bulunduğu besiyerlerinde standart çaprazdan elde edilen larvalardan ergine gelişen erkek bireylerde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S transferaz (GST) aktiviteleri ile redükte glutatyon miktarı belirlenmeye çalışıldı. Etanol ve flavonoidlerin dozları, çalışılan enzimlerin aktiviteleri ve redükte glutatyon miktarları ile ilgili elde edilen tüm bulgular Çizelge 4.13, 4.14 ve 4.15 de verilmiştir.

Etanol grubu, kontrole (distile su) göre SOD, katalaz, GR ve GST enzimlerinin aktivitelerini ve redükte glutatyon düzeyini bir miktar arttırmış fakat bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.13).

Tüm mirisetin gruplarında (0.5, 1 ve 2 mM), kontrol grubuna göre GST aktivitesi artmıştır (Çizelge 4.14). Ancak bu artış, sadece en düşük doz olan 0.5 mM mirisetin grubunda kontrole karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). GR ve SOD aktiviteleri de GST'ye benzer şekilde kontrole kıyasla mirisetin gruplarında artmıştır. SOD aktivitesi 1 ve 2 mM mirisetin gruplarında, GR aktivitesi ise yalnızca 2 mM mirisetin grubunda istatistiksel olarak önemli düzeyde artış göstermiştir ( $p<0.05$ ). Ayrıca, tüm mirisetin gruplarında CAT aktivitesinde doza paralel olmamakla birlikte önemli düzeyde artış belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). En yüksek redükte glutatyon miktarı ( $0.036\pm 0.002$   $\mu\text{mol/mg}$  protein) ise mirisetinin 1 mM dozunda elde edilmiştir (Çizelge 4.14).

Resveratrol, galangin ve luteolin gruplarının GST, GR ve CAT enzim aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir farklılık belirlenmemiştir (Çizelge 4.15). Diğer yandan, her üç flavonoidin farklı gruplarında gözlenen SOD aktivitelerinde, kontrole karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli

azalmalar olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Resveratrol ve luteolin gruplarında doz artışı ile birlikte SOD aktivitesi azalmıştır. Ancak bu azalış, doz artışı ile paralellik göstermemektedir. En dūřuk SOD aktivitesi, 0.25 mM luteolin grubunda  $1.4\pm 0.06$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlenmiştir. SOD aktivitesine benzer şekilde redükte glutasyon miktarı da her üç flavonoid grubunda doz artışına bağlı olmaksızın azalmıştır (Çizelge 4.15). Redükte glutasyon miktarında gözlenen bu azalmalar, 0.075 mM galangin ve 0.075 mM ile 0.25 mM luteolin gruplarında kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

**Çizelge 4.13.** *D. melanogaster*'de uygulanan etanolün süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyi üzerine etkileri

Gruplar	n	SOD±SH nmol/dk/ mg protein	CAT± SH µmol/ dk/ mg protein	GR± SH µmol/ dk/ mg protein	GST± SH µmol/ dk/ mg protein	Red.Glut.± SH µmol/ dk/ mg protein
<b>Kontrol</b>	7	1.692±0.104	10.897±0.484	2.546±0.169	62.517±1.994	0.029±0.0009
<b>Etanol (% 6.4)</b>	5	2.186±0.201	12.852±0.437	2.551±0.144	70.897±3.215	0.034±0.0025

\*Kontrolle karşılaştırıldığında önemli (p<0.05) n: Her dozun tekrar sayısı SH: Standart Hata

**Çizelge 4.14.** *D. melanogaster*'de uygulanan mirisetin dozlarının süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyi üzerine etkileri

Gruplar	n	SOD±SH nmol/dk/ mg protein	CAT± SH µmol/ dk/ mg protein	GR± SH µmol/ dk/ mg protein	GST± SH µmol/dk/ mg protein	Red.Glut.± SH µmol/ dk/ mg protein
<b>Kontrol</b>	7	1.692±0.104	10.897±0.484	2.546±0.169	62.517±1.994	0.029±0.0009
<b>Mirisetin (mM)</b>						
0.5	5	2.025±0.143	<b>13.778±0.291*</b>	2.727±0.155	<b>77.519±2.278*</b>	0.029±0.0012
1	5	<b>3.138±0.342*</b>	<b>13.807±0.301*</b>	3.220±0.382	74.039±5.189	<b>0.036±0.0019*</b>
2	5	<b>2.281±0.247*</b>	<b>13.541±0.411*</b>	<b>3.144±0.167*</b>	66.846±4.230	0.032±0.0010

\*Kontrolle karşılaştırıldığında önemli (p<0.05) n: Her dozun tekrar sayısı SH: Standart Hata

**Çizelge 4.15.** *D. melanogaster*'de uygulanan resveratrol, galangin ve luteolin dozlarının süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyi üzerine etkileri

Gruplar	n	SOD±SH nmol/dk/ mg protein	CAT± SH µmol/ dk/ mg protein	GR± SH µmol/ dk/ mg protein	GST± SH µmol/ dk/ mg protein	Red.Glut.± SH µmol/ dk/ mg protein
<b>Etanol (% 6.4)</b>	5	2.186±0.201	12.852±0.437	2.551±0.144	70.897±3.215	0.034±0.0025
<b>Resveratrol (mM)</b>						
0.2	5	1.732±0.225	13.626±0.311	2.105±0.296	66.032±1.645	0.029±0.0006
0.5	5	<b>1.495±0.098*</b>	13.548±0.547	1.478±0.342	68.159±2.961	0.028±0.0015
0.75	5	<b>1.489±0.229*</b>	13.580±0.565	1.986±0.286	68.185±1.397	0.029±0.0009
<b>Galangin (mM)</b>						
0.075	5	<b>1.345±0.151*</b>	13.454±0.110	2.204±0.198	70.094±1.287	<b>0.027±0.0013*</b>
0.10	5	2.237±0.239	13.473±0.323	2.707±0.133	67.876±2.742	0.029±0.0015
0.25	5	1.780±0.162	13.115±0.857	2.819±0.176	69.874±4.560	0.029±0.0023
<b>Luteolin (mM)</b>						
0.075	5	1.673±0.143	12.780±0.338	3.166±0.061	70.205±1.889	<b>0.027±0.0005*</b>
0.10	5	<b>1.507±0.249*</b>	12.855±0.124	2.623±0.116	74.061±0.942	0.027±0.0009
0.25	5	<b>1.403±0.067*</b>	11.556±0.460	2.862±0.836	73.462±0.888	<b>0.027±0.0008*</b>

\*Etanolla karşılaştırıldığında önemli (p<0.05) n: Her dozun tekrar sayısı SH: Standart Hata

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sebze ve meyvelerde yüksek oranda bulunan ve flavonoid adı verilen bazı bileşiklerin hastalıklardan korunmada ve daha sağlıklı bir yaşam sürmede katkı sağladıklarının düşünülmesi, bu maddelere karşı olan ilgiyi arttırmış ve birçok araştırmaya konu olmalarına yol açmıştır [1,3]. Bu maddelerin antigenotoksik ve antioksidan etkilerinin rapor edildiği çok sayıda *in vitro* çalışma bulunmasına rağmen *in vivo* çalışmaların yetersiz olduğu görülmüştür. Diğer yandan, bir maddenin antioksidan ya da antigenotoksik etkiye sahip olduğunun ileri sürülebilmesi için yapılacak *in vitro* çalışmaların yanında, özellikle yüksek yapılı organizmaları da temsil edebilecek model organizmalarla *in vivo* çalışmaların yapılmasının önemi büyüktür.

Genetik toksikolojide yaygın olarak kullanılan genotoksisite testlerinden biri de *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon (kanat benek testi) (SMART) testidir. Bu test, çeşitli avantajları nedeniyle tercih edilen standart bir testtir [74]. SMART ile çok sayıda bileşiğin genotoksik ve/veya antigenotoksik aktiviteleride araştırılmıştır [107, 108, 113, 114].

Bu çalışmada, genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin *in vivo* bir test olan *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile flavonoidlerden mirisetin, luteolin, galangin ve resveratrol'ün genotoksik etkileri ve üç farklı mutajene (N-metil-N-nitrozoüre (MNU), siklofosamid (SF) ve mitomisin C (MMC)) karşı antigenotoksik aktiviteleri ile antioksidan etkileri araştırılmıştır.

### 5.1. Resveratrol, Galangin, Luteolin ve Mirisetinin Genotoksik ve Antigenotoksik Etkisi

Çalışmada, belirlenen flavonoidlerin *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla negatif ve pozitif kontrol grupları ile birlikte flavonoid grupları (resveratrol, galangin, luteolin ve mirisetin) oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grupları olarak ise alkilleyici ajanlardan MNU, SF ve MMC nin değişik dozları kullanılmıştır. Ayrıca etanolde çözünen flavonoidlerin de olduğu dikkate alınarak etanol kontrol grubu da çalışmalara eklenmiştir.

Alkilleyici ajanlar, DNA gibi makromoleküllere doğrudan ya da metabolik aktivasyon yoluyla etki ederek onların yapılarını bozan çeşitli kimyasal türler üretirler

[62,76]. MNU, SF ve MMC'nin DNA'nın yapısına doğrudan etki edebilen etilleyici veya metilleyici türler üreterek nokta mutasyonlar, delesyonlar ve kromozom kırılmaları ile rekombinojenik aktivitelerin oluşmasına neden olduğuna yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [65,76]. Bu mutajenlerin pozitif kontrol grubu olarak ve çeşitli maddelerin antigenotoksik aktivitelerini test etmek amacıyla antigenotoksite çalışmalarında kullanıldıkları bir çok araştırma rapor edilmiştir [111,161,168].

Çalışmamızda; MNU, SF ve MMC bilinen genotoksik etkileri nedeniyle SMART'ın kendi koşullarımızda çalıştığını göstermek amacı ile pozitif kontrol grupları olarak seçilmelerinin yanında bu mutajenlere karşı flavonoidlerin antigenotoksik aktivitelerini araştırmak amacıyla kullanılmışlardır.

Çalışmada flavonoidlerin, mutajenlerin ve sabit mutajen konsantrasyonu ile birlikte uygulanan değişik flavonoid gruplarının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan standart çapraz larvalarının ergine gelişmeleri izlendi. Ergine gelişen bireyler ile larvaların hayatta kalış oranı (ergine gelişen larvaların oranı) belirlendi. Böylece uygulama gruplarının olası genotoksik etkilerinin yanında toksik etkileri de araştırıldı.

Herhangi bir etmenin olası toksik etkilerini gösteren *Drosophila*' da hayatta kalış oranı, çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır [169-171]. Bu çalışmada, kontrol grubuna kıyasla larvadan ergine gelişen birey sayısı etanol, mutajenler ve flavonoid gruplarında doz artışına paralel olarak azalmıştır. Negatif kontrol grubunda % 98 olan hayatta kalış oranı, etanol grubunda % 90 olarak bulunmuştur. *Drosophila*'da etanolün yüksek dozlarda (% 10 üzeri konsantrasyonlarda) toksik etkisinin arttığı ve bu nedenle hayatta kalış oranını azalttığı belirtilmektedir [172].

Çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullanılan mutajenlerin farklı dozları uygulanmış ve en yüksek dozlarının uygulandığı MNU (1.6 mM), SF (2 mM) ve MMC (0.1 mM) gruplarında sırasıyla % 12, % 59 ve % 54 oranında larva ölümleri gözlenmiştir (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3). MNU ve SF gruplarına göre oldukça düşük dozların kullanıldığı MMC gruplarında larvaların ölüm oranı daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, kullanılan mutajenler arasındaki en toksik ajan MMC'dir. Bu mutajenlerin değişik dozlarının toksik etkilerinin araştırıldığı çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışma bulunmaktadır. Niikawa ve ark. [173] 3µg/ml (0,002 mM) MMC dozunun *Drosophila*'da larvaların hayatta kalış oranını kontrol grubuna kıyasla önemli oranda azaltmadığını belirtmişlerdir. Diğer yandan yapılan bir *in vitro* çalışmada, MMC'nin toksik etkisinin doza bağlı olarak arttığı ve DNA çift zincir kırıklarına neden olarak sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir [174].

Promutajen SF'nin sitotoksik bir ilaç olduğu [65] ve metabolitlerinin çok daha toksik [175] ve sitotoksik etki gösterdiği belirtilmektedir [176]. *Drosophila* ile yapılan bir çalışmada, SF nin standart çaprazda ölüm oranını arttırdığı, özellikle 5 mM SF nin yüksek toksisite göstererek yüksek biyoaktivasyon çaprazında ölümcül etkiye neden olduğu belirtilmiştir [175]. Farelerle yapılan bir çalışmada ise, 10 mg/kg SF dozunun fetüs için toksik olduğu gösterilmiştir [177]. Çalışmada kullandığımız diğer bir mutajen olan MNU'nun toksik etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada, 7 mM MNU uygulamasıyla *E. coli*'de toksik etkinin ortaya çıktığı ve hayatta kalış oranının % 56 olduğu belirtilmiştir [178]. Diğer bir çalışmada ise, MNU dozunun artışına paralel olarak insan lenfositlerinde sitotoksik etkinin arttığı rapor edilmiştir [62].

Çalışmamızda flavonoid gruplarında doz artışına paralel olarak toksik etkilerin arttığı görülmüştür. En yüksek dozların kullanıldığı flavonoid gruplarından resveratrolün 1mM dozunda hayatta kalış oranı % 75, galanginin 0.25 mM dozunda % 90, luteolinin 0.25 mM dozunda % 70 ve mirisetinin 2 mM dozunda ise % 71 olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan flavonoidlerin yaşayabilirlik üzerine etkileri ile ilgili literatürde, herhangi bir *in vivo* araştırmaya rastlanmamış, ancak *in vitro* olarak çeşitli hücre kültürlerinde doz artışına paralel sitotoksik etkileri gösterilmiştir [179,180]. Öte yandan resveratrolün *Drosophila*'da ömür uzunluğu üzerine etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [181,182]. Bu çalışmalardan birinde 0.2 mM resveratrol konsantrasyonunun ömür uzunluğunu arttırdığı belirtilmektedir [182].

Çalışmada kullanılan *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi somatik hücrelerde heterozigotluğun kaybedilmesi ilkesine dayanan hızlı, ekonomik, çeşitli mutasyon ve rekombinasyonlara duyarlı *in vivo* bir testtir. Bu test olası mutajenlerin neden olduğu genotoksik etkileri mutant hücre klonları olarak belirlemeye olanak sağlar. Mutant hücre klonları, ergin sineğin kanatlarında delesyonlar, nokta mutasyonlar ve mitotik rekombinasyon sonucu ortaya çıkar ve tekli ve ikili benek olarak sınıflandırılır. Tekli benekler, indüksiyon zamanına bağlı olarak küçük ya da büyük tekli benek olarak gözlenir [75]. *mwh* veya *flr* genetik işaretleri taşıyan mutant hücre klonları, 1-2 hücrede bulunuyorsa küçük tekli benek, 3 ve daha fazla hücrede bulunuyorlarsa büyük tekli benek, *mwh* ve *flr* genetik işaretlerin her ikisini yan yana bulunduran mutant hücre klonları ise ikili benek olarak adlandırılır [76]. *flr* tekli benekleri nokta mutasyonlar veya delesyonlar sonucu, *mwh* tekli benekleri ise delesyonlar, nokta mutasyonlar ve *mwh* ve *flr* lokusları arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu, ikili benekler ise *flr* lokusu ve sentromer arasındaki mitotik



rekombinasyonla oluşurlar [74]. *mwh* ve *flr* lokusları arasındaki uzaklık, *flr* lokusu ve sentromer arasındaki uzaklıktan daha fazla olduğu için, mitotik rekombinasyon sonucu oluşan ve *mwh* taşıyan tekli beneklerin sayısı ikili beneklerin sayısından fazladır.

Çalışmamızda pozitif kontrol gruplarından elde ettiğimiz bulgulara göre; tüm MNU, SF ve MMC gruplarında kanat başına düşen benek sayısı, tüm benek çeşitlerinde kontrole göre önemli ölçüde artmıştır. Doz artışına paralel bulunan benek sıklıklarındaki bu artış istatistiksel olarak önemli olduğundan, tüm gruplarda pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir [111,183,175].

Çalışmamızda, MNU ve MMC gruplarında küçük ve büyük tekli benek sıklıklarının benzer oranlarda indüklendiği gözlenmiştir. SF grubunda ise, kanat başına düşen küçük tekli benek sayısı, büyük tekli benek sayısından fazla bulunmuştur. İkili benekler ise her üç mutajen grubunda da tekli beneklerden daha az sayıda bulunmuştur. MNU ile yapılan iki farklı çalışmada [111,184], bulgularımıza benzer sonuçlar elde edilmiş; tekli beneklerin benzer oranlarda indüklendiği, ikili beneklerin tekli beneklere oranla daha az indüklendiği ve tüm benek tiplerinin sıklığının doz artışına bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızla aynı MNU dozunun (0.5 mM) kullanıldığı bir başka çalışmada ise, tüm benek tipleri için pozitif sonuçların elde edildiği ve çalışmamızdan farklı olarak benek tiplerinin sıklıklarının oldukça yüksek olduğu (küçük tekli benek 18,10 iken büyük tekli benek 14.20 ve ikili benek 5.35 olarak) belirtilmiştir [185].

Çalışmamızda kullanılan 2 mM SF dozu, Spano vd [175] tarafından da uygulanmış ve bulgularımıza oldukça benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Ancak başka araştırmacılar kanat benek testinde 0.5 ve 1 mM SF gruplarında çalışmamızın aksine negatif ve belirsiz sonuçlar elde etmişlerdir [186]. SF'nin *Drosophila*'da kromozom kırıklarına neden olduğu ve genotoksik etki gösterdiği belirtilmektedir [187].

Yapılan bir araştırmada, elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde, MMC'nin kullanılan 0.03-0.3 mM dozlarının tüm benek tiplerinin sıklığını artırdığı belirtilirken, tekli beneklerin ikili beneklere göre daha fazla oluştuğu rapor edilmiştir [188]. MNU, SF ve MMC'nin çeşitli test sistemlerinde mikronukleus oluşumuna, kromozomal aberrasyonlara, DNA zincir kırıklarına, baz substitisyonlarına neden olarak genotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir [63,168,189].

Çalışmalarımızda etanol ve tüm flavonoid grupları, kanat başına düşen benek sayılarında istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmamıştır. Etanol grubunda, negatif kontrol grubuna göre tüm benek tiplerinin sıklıkları artmış, ancak bu artış

istatistiksel olarak önemli olmadığından anlamlı sonuçlar elde edilememiştir (Çizelge 4.4). Bu sonuç, kullanılan etanol konsantrasyonunun (% 6.4) genotoksik etkilere neden olmadığını göstermektedir. Kanat benek testi ile yapılan ve etanolün çözücü olarak kullanıldığı bir çalışmada, sonuçlarımıza benzer şekilde % 7 lik etanol konsantrasyonunun genotoksik olmadığı belirtilmiştir [190].

Çalışmamızda resveratrol, galangin ve luteolin gruplarında doz artışına bağlı olarak küçük ve büyük tekli benek ve toplam benek sıklıkları artmış fakat etanol grubuna kıyasla daha az sayıda kaydedilmiştir. Kullanılan en yüksek doz hariç (1 mM), diğer resveratrol gruplarında etanol grubuna göre küçük ve büyük tekli benekler ile toplam benek sıklıklarındaki azalma istatistiksel açıdan önemli bulunduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.5). En yüksek resveratrol dozunda (1 mM) ise, tüm benek tiplerinde istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. İkili benek sıklıkları bakımından tüm resveratrol gruplarında önemli bir artış ya da azalış gözlenmediğinden, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bu bulgular, çalışmada kullandığımız resveratrol dozlarının genotoksik etkiye neden olmadığını göstermektedir. Resveratrolün genotoksik etkilerinin, kullandığımız test sisteminden farklı test sistemleriyle araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Resveratrol, bu çalışmalardan bazılarında genotoksik bulunurken, bazılarında ise elde ettiğimiz sonuca benzer şekilde genotoksik bulunmamıştır. Matsuoka vd [191] tarafından Ames testi ile yapılan bir çalışmada, resveratrolün nokta mutasyonları ve çerçeve kayması mutasyonlarına neden olmadığı ancak kromozomal aberasyonları indüklediği rapor edilmiştir. Cadenas ve Barja [140] resveratrolün sıçanlarda oksidatif DNA hasarına neden olmadığını belirtirken, Breinholt vd [192] ise DNA kırıklarına neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamıza aldığımız tüm galangin gruplarında, büyük tekli benekler ve toplam benekler etanol grubuna kıyasla daha az sayıda kaydedilmiştir (Çizelge 4.6). Küçük tekli benekler, etanol grubuna kıyasla en yüksek galangin dozunun uygulandığı grupta daha fazla sayıda gözlenmiştir. En yüksek galangin dozunun kullanıldığı grup hariç diğer gruplarda küçük tekli benekler ve toplam benekler açısından negatif sonuçlar elde edilmiştir. Tüm galangin gruplarındaki büyük tekli beneklerin sıklıklarındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir. İkili benekler ise etanol grubuna kıyasla tüm galangin gruplarında daha fazla sayıda kaydedilmelerine karşın istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Sonuçlarımız, galanginin kullanılan tüm dozlarında genotoksik etkiye neden olmadığını

göstermektedir. Çalışmamıza benzer sonuçlar çeşitli test sistemlerinde yapılan çalışmalarda da rapor edilmektedir. Galanginin *Euglena gracilis*'de genotoksisiteye neden olmadığı [131] ve Chinese hamster V79 hücrelerinde mikronukleus oluşumunu indüklediği [193] belirtilmiştir. Sohn vd [69] tarafından farelerde mikronukleus testi ve *S. typhimurium* TA 100 ve TA 98 bakterileriyle yapılan çalışmada, galanginin klastojenik veya mutajenik olmadığı gösterilmiştir. Silva vd [194], galanginin Chinese hamster V79 hücrelerinde metabolik aktivasyon olsun ya da olmasın kromozom aberrasyonlarını indüklediğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan tüm luteolin gruplarında ise küçük ve büyük tekli benek ve toplam benek sıklıkları etanol grubuna kıyasla daha az sayıda kaydedilmiş ve benek sıklıklarındaki bu azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.7). İkili benekler ise tüm luteolin gruplarında etanol grubu ile aynı sıklıkta bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bu sonuçlara göre luteolin, uygulanan tüm konsantrasyonlarında genotoksik etkilere neden olmamıştır. Literatür araştırmalarımız sonunda *Drosophila melanogaster*'de luteolin ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak diğer test sistemleri ile yapılan çalışmalarda bulgularımıza benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Luteolinin, farelerle yapılan *in vivo* bir çalışmada, mikronükleus oluşumunu ve kromozomal aberrasyonları indüklediği belirtilmektedir [134]. Edenharder ve Tang [195] luteolinin *Salmonella* testinde genotoksik etkisinin olmadığını belirtirken, Horvathova vd [196] yaptıkları *in vitro* çalışmalarında luteolinin kromozomal aberrasyonları ve DNA kırıklarını indüklediğini ve hidrojen peroksite karşı koruyucu etkisi bulunduğunu göstermişlerdir. Diğer yandan, bulgularımızın aksine, mikronükleus testiyle yapılan başka bir çalışmada [193] luteolinin doz artışına bağlı olarak klastojenik olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bir diğer çalışmada, sıçan hepatoma (karaciğer tümörü) hücrelerinde DNA kırıklarına neden olduğu tek hücre jel elektroforezi yöntemiyle belirlenmiştir [197].

Çalışmamızda kullanılan mirisetin dozlarından (0.5, 1, ve 2 mM) en yüksek doz (2 mM) hariç diğer dozlarda küçük tekli benek ve toplam benek sıklıkları bakımından kontrol grubuna göre azalma gözlenmiş ve bu durum istatistiksel olarak negatif etki olarak yorumlanmıştır. Tüm mirisetin gruplarında, kontrol grubuna göre büyük tekli benek sıklıkları azalmış ve bu durum istatistiksel olarak negatif değerlendirilirken, ikili benek sıklıkları açısından anlamlı sonuçlar elde edilememiştir (Çizelge 4.8). Bulgularımız, uygulanan tüm mirisetinin dozlarının kanat benek testinde genotoksik

etkiye neden olmadığını göstermiştir. Bu sonuç, farklı test sistemleriyle yapılan çalışmaları desteklemektedir. Mirisetinin sıçan hepatosit kültüründe sitotoksik olmadığı [133], insan lenfositlerinde ise DNA zincir kırıklarına ve pirimidin bazlarının oksidasyonuna yol açmadığı [136] gösterilmiştir. Ancak bazı *Salmonella typhmuri* soylarında çerçeve kayması mutasyonlarına neden olduğu [198], bazı soylarda ise bu tip mutasyonları indüklediği [199] rapor edilmiştir.

Flavonoidlerin genotoksik etkilerinin araştırılmasından sonra yaptığımız antigenotoksisite çalışmalarında, her bir mutajenin iki farklı dozu kullanılarak pozitif kontrol grupları oluşturulmuştur. Her mutajenin belirlenen tek bir dozuna karşı her bir flavonoidin üç farklı dozunun kullanılmasıyla birlikte uygulama grupları oluşturulmuştur. Birlikte uygulama gruplarında, resveratrol ve mirisetinin antigenotoksik aktiviteleri 1 mM MNU, 1 mM SF veya 0.05 mM MMC nin; luteolin ve galanginin antigenotoksik aktiviteleri ise 0.5 mM MNU, 0.5 mM SF veya 0.025 mM MMC nin genotoksik etkilerine karşı araştırılmıştır.

MNU (1 mM), SF (1 mM) veya MMC (0.05 mM) ile birlikte uygulanan tüm resveratrol veya mirisetin gruplarında, mutajenlerin indüklediği küçük ve büyük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklıklarının yalnızca mutajen uygulanan gruplara kıyasla azaldığı bulunmuştur (Çizelge 4.9 ve 4.12). Mutajenlerle birlikte uygulanan tüm resveratrol ve mirisetin gruplarında, benek sıklıklarındaki azalma istatistiksel açıdan önemli olduğundan bu durum negatif etki olarak yorumlanmıştır. Her iki flavonoidin mutajenlerin indüklediği benekler üzerindeki inhibisyon etkilerinin doz artışına paralel olarak arttığı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, her iki flavonoidin MNU, SF veya MMC'nin neden olduğu nokta mutasyonları, delesyonları ve rekombinasyonları engelleyerek antigenotoksik aktivite gösterdikleri söylenebilir. Bulgularımıza benzer şekilde, resveratrol ve mirisetinin çeşitli test sistemlerinde farklı mutajenlere karşı antigenotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [200,201].

Resveratrolün Ames testiyle ve fare kemik iliği mikronukleus testiyle *in vivo* olarak MNU, promutajen IQ ve AFB<sub>1</sub>'e karşı metabolize edici enzimleri baskılayarak veya bu maddelerin DNA eddaktları oluşturmalarını engelleyerek antigenotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir [52]. Bir başka çalışmada, resveratrol ön uygulamasının, reaktif oksijen türlerinin birikmesini engelleyerek sigara bileşenlerinin indüklediği DNA kırıklarını önlediği gösterilmiştir [138]. Sıçanlarda 16 mg/kg resveratrol uygulamasının, KBrO<sub>3</sub>'ün neden olduğu oksidatif DNA hasarını tamamıyla önlediği belirtilmiştir [140]. Uenobe vd [200], promutajen Trp-P-1'in indüklediği mutasyonlara

karşı resveratrolün baskılayıcı etkisini Ames testiyle göstermişler ve bu durumu resveratrolün metabolize edici enzimleri baskılamasıyla ilişkilendirmişlerdir.

Mirisetin in insan lenfositlerinde besin mutajenlerinden Trp-P-2 ve IQ'nun indüklediği DNA hasarını azalttığı belirtilmiştir [201]. Yine mirisetinin lenfositlerde hidrojen peroksit kaynaklı DNA zincir kırıklarını ve okside olan pirimidin bazlarının düzeyini azalttığı tek hücre jel elektroforezi yöntemiyle gösterilmiştir [136]. Mirisetinin sıçan karaciğer hücrelerinde demir nitrilotriasetatın (Fe-NTA) indüklediği genotoksik etkiyi DNA tamir mekanizmalarını teşvik ederek engellediği [202], tersiyer-bütillhidroperoksit (BHP) ve kümen hidroperksitin (CHP)'in neden olduğu genotoksik etkileri ise radikal süpürme özelliğiyle etkili bir şekilde azalttığı belirtilmiştir [132]. Ong ve khoo [23], flavonoidlerin metal iyonları ile şelat oluşturma özellikleri nedeniyle mirisetinin yüksek konsantrasyonlarda demir bağlama yeteneğinden dolayı DNA hasarını azalttığını rapor etmişlerdir Mirisetinin farelerde benzopirinin genotoksik etkisini, sitokrom P450'ye bağlı monooksijenaz aktivitelerini ve benzopirin metabolizasyonunu inhibe ederek önlediği belirtilmiştir [203].

Çalışmamızda luteolin ve galanginin antigenotoksik aktiviteleri 0.5 mM MNU, 0.5 mM SF veya 0.025 mM MMC'ye karşı araştırılmıştır. MNU, SF veya MMC ile birlikte uygulanan tüm luteolin gruplarında ve MNU veya MMC ile birlikte uygulanan tüm galangin gruplarında küçük ve büyük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklıkları pozitif kontrol gruplarına kıyasla azalmıştır. Birlikte uygulama gruplarında gözlenen benek tiplerindeki bu azalma, istatistiksel açıdan önemli olduğundan negatif sonuçlar elde edilmiştir. SF (0.5 mM) ile birlikte uygulanan galangin gruplarında küçük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklıkları, SF grubuna kıyasla azalmış ve istatistiksel olarak negatif sonuçlar elde edilmiştir. SF ile birlikte uygulanan en düşük galangin dozunda (0.075 mM), büyük tekli benek sıklığı, SF grubuna kıyasla artmış ancak bu artış istatistiksel açıdan önemli olmadığından anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Büyük tekli benek sıklığı, SF grubuna kıyasla diğer galangin gruplarında azalmış ve istatistiksel açıdan negatif olarak değerlendirilmiştir. Mutajenlerle birlikte uygulanan galangin ve luteolin gruplarında, mutajenlerin indüklediği benek tiplerinin sıklıklarındaki azalmayı gösteren yüzde inhibisyon değerleri, flavonoid dozlarının artışına paralel olarak artmıştır (Çizelge 4.10 ve 4.11). Mutajenlerle birlikte uygulama gruplarında luteolin ve galangin; MNU, SF ve MMC'nin neden olduğu genotoksik etkileri değişen oranlarda baskılayarak antigenotoksik aktivite göstermişlerdir. Çalışma bulgularımıza benzer şekilde, her iki flavonoidin farklı test sistemlerinde çeşitli

mutajenlere karşı antijenotoksik aktiviteleri gösterilmiştir. Sohn vd [69], galanginin MNU'ya karşı antijenotoksik aktivitesini Ames ve mikronukleus testleriyle göstermişlerdir. Ancak çalışmamızın aksine, bu çalışmada galangin her iki test sisteminde de düşük dozlarda daha etkili antijenotoksik aktivite gösterdiği ve bu durumun galanginin yüksek dozlardaki toksik etkisiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir [69]. Başka bir çalışmada, MMC'ye karşı mikronukleus testinde ve farelerde bleomisinindüklediği kromozomal aberasyonları baskılamada oldukça etkili bir antijenotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Galanginin bu antiklastojenik etkileri, radikal süpürme yeteneği ile veya MMC'nin DNA'ya çapraz bağlanmasını engellemesiyle açıklanmıştır [130]. Galanginin besin mutajenlerinden TRP-P-2'nin *Salmonella typhimurium* TA98 soyunda mutajenik etkisini, DNA'ya bağlanmadan önce nötralize ederek baskıladığı belirtilmiştir [204]. Cai vd [205] ise, luteolinin ultraviyole ışının (UV) neden olduğu DNA hasarını önlediğini, peroksidasyon sonucu oksijen radikallerinin oluşumunu engellediğini ve hidrojenperoksiti süpürmede etkili olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, luteolinin radikal süpürücü etkisinden dolayı, insan melonom HMB-2 hücrelerinde melfalanın indüklediği kromozomal aberrasyonları ve hidrojen peroksitin neden olduğu DNA zincir kırıklarını önlediği belirtilmiştir [206]. Luteolinin *salmonellada* aflatoksin B<sub>1</sub>, Trp-P-1, MNNG ve ultraviyole ışınlar karşı antijenotoksik etkisi gösterilmiştir. Bu antijenotoksik etkiler, luteolinin sitokrom P450 enzim sistemini baskılaması sonucu promutajenlerin inaktive olması, radikal süpürücü yeteneği veya DNA tamir mekanizmalarının çalışmasını teşvik etmesiyle ilişkilendirilmiştir [207]. Taj ve Nagarajan [134], luteolinin farelerde, çok kızartılmış balık ve etin indüklediği mikronukleus oluşumunu ve kromozomal aberasyonları ortalama % 90 oranında azalttığını ve yüksek koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre; resveratrol, galangin, luteolin ve mirisetin alkileyici ajanlardan doğrudan mutajen MNU, promutajen SF ve MMC ye karşı antijenotoksik aktivite göstermişlerdir. Bu mutajenlerin neden olduğu delesyonlar, nokta mutasyonlar ve rekombinasyonlar kullanılan flavonoidlerin doz artışına paralel olarak artan oranda önlenmiştir. Flavonoidler bu antijenotoksik aktivitelerini; Faz I enzimlerini baskılayarak, mutajenlerin DNA'ya bağlanmalarını engelleyerek, mutajenlerin metabolizasyonu sonucu oluşan radikalleri süpürerek veya DNA tamir mekanizmalarını teşvik ederek göstermiş olabilirler.

## 5.2. Resveratrol, Galangin, Luteolin ve Mirisetinin Değişik Konsantrasyonlarının *Drosophila* Erginlerinde SOD, Katalaz, GR ve GST Aktiviteleri ile Redükte Glutasyon Düzeyine Etkisi

Antioksidanlar, yapılarına göre enzimler ve enzim olmayan moleküller olarak sınıflandırılmaktadır. *Drosophila melanogaster*, enzimatik antioksidan savunma mekanizmalarından radikal süpürücü enzimler olarak bilinen süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon redüktaz'a (GR) sahipken, glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi bulunmamaktadır [208,209]. Bu enzimlerden SOD, süperoksit radikallerini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüştürürken CAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi su moleküllerine dönüştürür. GR ise glutasyonu okside formundan redükte formuna dönüştürür.

Normal koşullarda organizmada radikal aktivitelerle antioksidanların hücre içi düzeyleri arasında kurulu olan denge korunur. Ancak oksidatif stres varlığında veya birçok başka nedenden dolayı bu enzimlerin aktivitelerinde azalmalar veya yükselmeler olabildiği çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir [210-212].

Birçok araştırmada yararlı etkileri gösterilen resveratrol, galangin, luteolin ve mirisetinin *D. melanogaster*'de genotoksik ve antigenotoksik etkileri yanında antioksidan etkilerini belirlemek amacı ile çalışmamızın bu bölümü düzenlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, antioksidan enzim aktiviteleri ve redükte glutasyon düzeylerinin etanol grubunda kontrol grubuna göre biraz yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 4.13). Bu durumun, oksidatif stres yaratıcı etkisi bilinen etanolün [213] antioksidan savunma mekanizmalarını uyarılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda etanol içerisinde çözünen resveratrol, galangin ve luteolinin değişik dozları organizmada SOD aktivitesini azaltırken, distile suda çözülerek hazırlanan mirisetinin yüksek dozları (1 mM ve 2 mM) SOD aktivitesini arttırmıştır. Bu bulgular, etanolün çözücü olarak kullanıldığı flavonoid gruplarında kullanılan flavonoidlerin değişik dozlarının, etanolün oksidatif stres yaratıcı etkisini baskılayarak SOD enzim düzeylerinin göreceli olarak azalmasına yol açmış olmalarından kayanabilir. Diğer yandan, mirisetin yüksek konsantrasyonlarda (1 mM ve 2 mM) kullanıldığında SOD enzim düzeyini arttırmış olması (Çizelge 4.14), antioksidan enzim düzeyinin kendiliğinden oksidasyon ile artmış olma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Canada vd [214], mirisetinin sulu tampon çözeltilerde pH ye bağlı olarak kendiliğinden oksidasyona uğradığını ve bunun sonucunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve süperoksit radikalleri meydana

geldiğini belirtmişlerdir. Hodnick vd [215] ise, mirisetinin kendiliğinden oksidasyonun sodyum azid, süperoksit dismutaz ve katalaz tarafından inhibe edildiğini belirtmişlerdir. Bu durumda mirisetinin neden olduğu radikaller, çalışmamızda olduğu gibi SOD enzim aktivitesinin yükselmesine neden olmuş olabilir.

Yapılan bir çalışmada *Drosophila*'da katalazın artan aktivitesinin hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu ancak bu durumun ömür uzunluğunu etkilemediği belirtilmiştir [216]. Çalışmamızda ise resveratrol, galangin ve luteolin gruplarında katalaz aktivitesinde etanol kontrolüne kıyasla kısmi bir artış olmasına rağmen, bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $p>0.05$ ) görülmüştür (Çizelge 4.15). Mirisetin kullanılan gruplarda katalazın aktivitesinde kontrole göre gözlenen artışın, kullanılan tüm mirisetin dozlarında istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Ortamda oksidatif etki yaratacak bir ajan olmamasına karşın katalaz aktivitesinde meydana gelen bu artış, enzim düzeyinin mirisetinin kendiliğinden oksidasyonu nedeniyle artmış olmasıyla açıklanabilir.

Çalışmamızda resveratrol, galangin ve luteolin gruplarının organizmanın GST ve GR aktivitelerinde kontrole kıyasla istatistiksel açıdan önemli düzeyde bir değişime neden olmadıkları ( $p>0.05$ ); mirisetinin ise kullanılan en yüksek dozunda GR, en düşük dozunda ise GST aktivitesini kontrole kıyasla istatistiksel açıdan önemli düzeyde arttırdığı bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Mirisetinin, kullanılan en düşük dozunda GST düzeyini etkilemesi, yüksek dozlarında ise etkilememesi önemli bir sonuç olarak değerlendirilmemiştir. Resveratrol, galangin ve luteolin'in organizmanın GR ve GST aktivitesinde önemli bir değişime neden olmaması, bu maddelerin kullanılan tüm dozlarında oksidatif strese neden olmadıkları şeklinde değerlendirilebilir. Ancak, 28 gün boyunca yüksek dozda (0.3, 1.0 ve 3.0 g/kg/gün) resveratrole maruz bırakılan sıçanlarda karaciğer GST aktivitesinin arttığı belirlenmiştir [217].

Anti-oksidant/pro-oksidant aktivitenin indikatörü olarak toplam glutatyon düzeyi ve enzim aktivite düzeyleri birçok çalışmada gösterilmiştir. Bir flavonoid olan kuersetin ile ilgili kapsamlı bir derleme çalışmasında, kuersetine maruz bırakılan farelerde hepatik GST aktivitesinin arttığı belirtilmiştir [218]. Başka bir çalışmada ise aynı flavanoidin sıçan karaciğer GSH düzeyinde azalmaya neden olduğu, hepatik GPx ve GR aktivitelerinin ise etkilenmediği gösterilmiştir [219]. Çalışmamızda bu çalışmaya benzer şekilde, resveratrol, luteolin ve galangin gruplarında *D. melanogaster*'in GSH miktarında azalmaya neden olmuştur.



Genel bir değerlendirme ile çalışmada kullanılan flavonoidler (resveratrol, galangin, luteolin ve mirisetin) doz artışına bağlı olarak larvadan ergine gelişen birey sayısını azaltmış, ancak genotoksik etkiye neden olmamışlardır. Bu flavonoidler MNU, SF ve MMC nin neden olduğu somatik mutasyonları ve rekombinasyonları değişen oranlarda baskılayarak antigenotoksik aktivite göstermişlerdir. *Drosophila*'nın antioksidan sistemi üzerinde yapılan çalışmalarda mirisetin, enzim aktivitelerini ve redükte glutasyon miktarını farklı dozlarda kontrole göre önemli düzeyde arttırmıştır. Diğer flavonoidler ise sadece SOD aktivitesini ve redükte glutasyon miktarını kontrole göre önemli düzeyde arttırmışlardır. Bu durum, bize flavonoidlerin redükte glutasyon miktarının artışını ve bazı antioksidan enzimleri indüklediğini göstermektedir.

Sonuç olarak besinlerle değişen oranlarda alınan ve insanlar için çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin olduğu belirtilen flavonoidlerin olası toksik, genotoksik ve antigenotoksik etkilerini ortaya koymak için *in vitro* alışmaların yanında *in vivo* test sistemleri ile de ayrıntılı araştırmaların yapılması önemlidir. Sahip olduğu enzim sistemleri ve genetik mekanizmaları nedeniyle çok tercih edilen model organizmalardan biri olan *D. melanogaster* ile yapılan bu *in vivo* alışmanın resveratrol, mirisetin, galangin ve luteolinin genotoksik ve antigenotoksik aktiviteleri ile antioksidan etkilerinin ortaya çıkarılması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] M. L. Neuhouser, *Flavonoids and Cancer Prevention: What Is the Evidence in Humans?* **Pharmaceutical Biology**, 42 (2004) 36-45.
- [2] A. Bub, B. Watzl, M. Blockhaus, K. Briviba, U. Liegibel, H. Muller, B.L. Pool-Zobel & G. Rechkemmer, *Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage*, **Journal of Nutritional Biochemistry** 14 (2003) 90–98.
- [3] T. Coşkun, *Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri*, **Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi**, 48 (2005) 69-84.
- [4] M. S. Meskin, W. R. Bidlack, R. K. Randolph, **Phytochemicals**, CRC pres, 2006.
- [5] S. Hougeea, A. Sanders, J. Faber, Y.M.F. Graus, W.B. van den Berg, J. Garssen, H.F. Smit and M.A. Hoijer, *Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes macrophages*, **Biochemical Pharmacology**, 69 (2005) 241–248.
- [6] G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Lzzo and F. Capasso, *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*, **Life Sciences**, 65:4 (1999) 337-353.
- [7] J. Tieppo, R. Vercelino, A.S. Dias, M.F. Silva Vaz, T.R. Silveira, C.A. Marroni, N.P. Marroni, J.A.P. Henriques and J.N. Picada, *Evaluation of the protective effects of Quercetin in the hepatopulmonary syndrome*, **Food and Chemical Toxicology**, 45 (2007) 1140–1146.
- [8] L. Le Marchand, *Cancer preventive effects of flavonoids—a review*, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 56 (2002) 296–301.
- [9] A.L. Simons, “Structure-degradation relationships of flavonoids and their correlation to human bioavailability”, PhD Thesis, Iowa State University, 2005 p.6.
- [10] L. Bravo, *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance*, **Nutrition Reviews**, 56 (1998) 317-333.
- [11] R. J. Nijveldt, E. Nood, D. Hoorn, P. Boelens, K. Norren, and P. Leeuwen, *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*, **American Journal of Clinical Nutrition**, 74 (2001) 418–25.
- [12] Y. Moon, X. Wang, M. E. Morris, *Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism*, **Toxicology in Vitro**, 20 (2006) 187–210.
- [13] M. Serafini, G. Maiani, ve A. F.Luzzi, *Alcohol-Free Red Wine Enhances Plasma Antioxidant Capacity in Humans*, **The Journal of Nutrition**, 128:6 (1998) 1003-1007.
- [14] E. Wollenweber Flavones and flavonols. In *The Flavonoids: Advances in Research*. (Edited by Harborne J. B. and Mabry T. J.), **Chapman and Hall**, London, 1982, pp. 189-259.
- [15] B. Sultana ve F. Anwar, *Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants*, **Food Chemistry**, 108:3 (2008) 879-884.
- [16] Ø.M. Andersen ve K. R. Markham (Editors), **FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications**, **CRC press**, London, 2006.
- [17] T. Fotsis, M. Pepper, E. Aktas, S. Breit, S. Rasku, H. Adlercreutz, K. Wähälä, R. Montesano and L. Schweigerer, *Flavonoids, Dietary-derived Inhibitors of Cell*

- Proliferation and in Vitro Angiogenesis*, **Cancer Research**, 57 (1997) 2916-2921.
- [18] G. E. Smith and L. A. Griffiths, *Metabolism of myricetin, myricitrin and 3,4,5-trihydroxyphenylacetic acid*, **Biochemistry Journal**, 118 (1970) 53-54.
- [19] J. Robak and R. J. Gryglewski, *Flavonoids are scavengers of superoxide anions* **Biochemical Pharmacology**, 37 (1988) 837-841.
- [20] J. Robak, F. Shridi, M. Wolbis and M. Krolikowska, *Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation*, **Poland Journal of Pharmacy & Pharmacology**, 40 (1988b) 451-458.
- [21] M.J. Loughton, P.J. Evans, M.A. Moroney, J. R. Hoult and B. Halliwell, *Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability*. **Biochemical Pharmacology**, 42 ( 1991 ) 1673-1681
- [22] H. Mukhtar, M. Das, W. A. Khan, Z. Y Wang., D. P. Bik and D. R Bickers. *Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)-pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice*. **Cancer Research**, 48 (1988) 2361-2365.
- [23] K.C. Ong and H. Khoo, *Biological Effects of Myricetin*, **General Pharmacology**, 29: 2 (1997) 121-126.
- [24] J.L.M. Kamendutis and G. B. Corcoran, *DNA as a critical target in toxic cell death: enhancement of dimethylnitrosamine cytotoxicity by DNA repair inhibitors*, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 271(1994) 1695-1698.
- [25] K.Ono, H.Nakane, M. Fukushima, J. C. Chermann and F.B. Sinoussi, *Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases*, **European Journal of Biochemistry**, 190 (1990) 469-476.
- [26] M. Y. Heo, S. J. Sohn, W. W. Au, *Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate*, **Mutation Research**, 488 (2001) 135–150.
- [27] M. Dambros, R. Jongh, G. A. Van Koeveringe A Bast & P.E. van Kerrebroeck, *Galangin protects pig detrusor nerves from repetitive field stimulation and anoxia / glucopenia*, **Urology**, 66 (2005) 1327–1331.
- [28] S.J. Sohn, J.H. Kim, Y.J. Kim, I.H. Huh, M.Y. Heo, *Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced sisterchromatid exchange and DNA methylation by galangin*, **Yakhak Hoeji**, 39 (1995) 94–101
- [29] M.Y. Heo, J.H. Lee, S.J. Sohn, W.W. Au, *Anticlastogenic effects of galangin against mitomycin C-induced micronuclei in reticulocytes of mice*, **Mutation Research**, 360 (1992) 37–41.
- [30] F.V. So, N. Guthrie, A.F. Chambers, K.K. Carroll, *Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen*, **Cancer Letters**, 112 (1997) 127–133
- [31] F.P. Guengerich, *Roles of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy*, **Cancer Research**, 48 (1988) 2946–2954.
- [32] I. Myara, I. Pico, B. Védie, N. Moatti, *A method to screen for the antioxidant effect of compounds on low-density lipoprotein (LDL):illustration with flavonoids*, **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 30 (1993) 69–73.

- [33] Y. Imamura, T. Migita, Y. Uriu, M. Otagiri, T. Okawara, *Inhibitory effects of flavonoids on rabbit heart carbonyl reductase*, **Journal of Biochemistry**, 127 (2000) 653–658.
- [34] A. Cheng, T. Huang, C. Laic, M. Pan, *Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells*, **European Journal of Pharmacology** 509 (2005) 1–10.
- [35] S. Karakaya, S.N. EL, *Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods*, **Food Chemistry** 66 (1999) 289-292.
- [36] G. Michelsa, W. Watjena, P. Nieringa, *Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells*, **Toxicology** 206 (2005) 337–348.
- [37] J.E Brown, C.A Rice-Evans, *Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro*. **Free Radical Research**, 3 (1998) 247–255.
- [38] A. R. Chowdhury, S. Sharma, S. Mandal, *Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I*, **Biochemical Journal**, 366 (2002), 653-661.
- [39] A. Matsuoka, K. Takeshita, A. Furuta, M. Ozaki, K. Fukuhara & N. Miyata, *The 4-hydroxy group is responsible for the in vitro cytogenetic activity of resveratrol*, **Mutation Research**, 521 (2002) 29–35.
- [40] M. Athar, J. Back, X. Tang, K. Ho Kim, L. Kopelovich, D.R. Bickers and A.L. Kim, *Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention*, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 224 (2007) 274–283.
- [41] P. Langcake and R.J. Pryce, *The production of resveratrol by Vitis vinifera and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury*, **Physiology & Plant Pathology**, 9 (1976) 77–86.
- [42] M.S. Baliga, S. Meleth, S.K. Katiyar, *Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems*. **Clinical Cancer Research**, 11 (2005) 1918–1927.
- [43] S. Söylemez, “Dişi ve erkek sıçanlarda uzun süreli resveratrol tedavisinin endotel hücre reaktivitesi ve eNOS, iNOS ekspresyonları üzerindeki etkilerinin araştırılması”, Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2007.
- [44] T. Walle, F. Hsieh, M.H DeLegge, J.E Oatis, U.K Walle, *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*, **Drug Metabolism and Disposition**, 32 (2004) 1377–1382.
- [45] S. Renaud & M. Lorgeil, *Wine alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*, **Lancet**, 339 (1992) 1523–1526.
- [46] E.N. Frankel, A.L. Waterhouse, J.E. Kinsella, *Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol*, **Lancet**, 341 (1993) 1103.
- [47] L. Corre, N. Chalabi, L. Delort, Y.J. Bignon and D.J Bernard-Gallon, *Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms*, **Molecular Nutrition and Food Research**, 49 (2005) 462-471.
- [48] S. Meeran, S. K. Katiyar, *Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents*, **Frontiers in Bioscience**, 13 (2008) 2191-2202.
- [49] J. Gusman, H. Malonne and G. Atassi, *A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol*, **Carcinogenesis**, 22 (2001) 8, 1111-1117.
- [50] S. Masten, “trans-Resveratrol” Review of Toxicological Literature, **National Institute of Environmental Health Sciences**, Caroline, 2002.

- [51] A. Boyce, J. Oehmer, N.J. Gooderham, *Phytoalexin resveratrol attenuates the mutagenicity of the heterocyclic amines 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4.5-b]pyridine and 2-amino-3.8-dimethylimidazo[4.5-f]quinoxaline*, **Journal of chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 802 (2004) 217–223.
- [52] M. Langova, Z. Polivkova, P. Šmerak, J. Bartova and I. Barta, *Antimutagenic Effect of Resveratrol*, **Czech Journal of Food Science**, 23 (2005) 202-208.
- [53] Z. D. Fu, Y. Cao, K. F. Wang, S. F. Xu, R. Han, *Chemopreventive effect of resveratrol to cancer*, **Chinese Journal of Cancer Research**, 23 (2004) 869–873.
- [54] L. Belguendouz, L. Fremont & A. Linard, *Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins*. **Biochemical Pharmacology**, 53: 9 (1997) 1347-55.
- [55] A. P. Spier, C. S. Bavaresco, A.T.S. Wyse, *Effects of resveratrol and purple grape juice on nucleotide hydrolysis by adult rat serum*, **Food Chemistry** 103:2 (2006) 565-571.
- [56] C. Alarco' n de la Lastra and I. Villegas, *Resveratrol as an antioxidant and prooxidant agent: mechanisms and clinical implications*, **Biochemical Society Transactions**, 35: 5 (2007) 1156-1160.
- [57] V. Filipa, M. Plockova, J. Smidrkala, Z. Spickova, K. Melzochb, S. Schmidte, *Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness*, **Food Chemistry** 83 (2003) 585–593.
- [58] P.L. Williams, R.C. James, S.M. Roberts (Editors), *Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications*. **A Wiley-Interscience Publication**, 2000.
- [59] M. J. Derelanko & M. A. Hollinger (Editors), *Handbook of Toxicology*. **CRC Pres**, 2002.
- [60] G. Akbaba, *Genotoksikoloji*, **Bilim ve Teknik**, Eylül (2004) s.28.
- [61] R. Goldman and P. G. Shields, *Food Mutagens*, **The Journal of Nutrition**, 133 (2003) 965-973.
- [62] S. H. Doak, G.J.S. Jenkins, G. E. Johnson, E. Quick, E.M. Parry, and J.M. Parry, *Mechanistic Influences for Mutation Induction Curves after Exposure to DNA-Reactive Carcinogens*, **Cancer Research**, 67:8 (2007) 3904-11.
- [63] K.J. Schimenti, W.H. Hanneman, and J.C. Schimenti, *Evidence for Cyclophosphamide-Induced Gene Conversion and Mutation in Mouse Germ Cells*, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 147 (1997) 343–350.
- [64] R.U. Ayres, Y.K. Nakamura, K. Kawai, H. Furukawa, T. Matsuo, K. Shimoi, I. Tomita & Y Nakamura, *Suppressing effects of S-methyl methanethiosulfonate and diphenyl disulfide on mitomycin C-induced somatic mutation and recombination in Drosophila melanogaster and micronuclei in mice*, **Mutation Research**, 385 (1997) 41–46.
- [65] S. T. Matalon, A. Ornoy, M. Lishner, *Review of the potential effects of three commonly used antineoplastic and immunosuppressive drugs (cyclophosphamide, azathioprine, doxorubicin on the embryo and placenta)*, **Reproductive Toxicology**, 18 (2004) 219–230.
- [66] D. Anderson, J.B. Bishop, R.C. Garner, P. Ostrosky-Wegman, P.B. Selby, *Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks*, **Mutation Research**, 330 (1995) 115-181.

- [67] S. Miyamura, N. Shigeno, M. Matsui, S. Wakaki, K. Uzu, *The biological studies On mitomycin I. Antibacterial activities of mitomycin derivatives*, **Journal Antibiotics**, 20:2 (1967) 72-76.
- [68] T. Digby, "Effect of DT- Diaphorase induction on the Anti tumor activity of RH1 and Mitomycin C" Master of Science, Manitoba, Canada (2004) p.29
- [69] S. Sohn, I.H. Huh, W. Au , M.Y. Heo, *Antigenotoxicity of galangin against N-methyl-N-nitrosourea*, **Mutation Research**, 402 (1998) 231–236.
- [70] S.K. Abraham and U. Graf, *Protection by Coffee Against Somatic Genotoxicity in Drosophila: Role of Bioactivation Capacity*, **Food and Chemical Toxicology**, 34:1 (1996) 1-14.
- [71] A.A. Başaran, *Farmakogenezide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları*, 14. **Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı**, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002.
- [72] J.G. Rincon & U. Graf, *Drosophila melanogaster Somatic Mutation and Recombination Test As a Biomonitor.*, *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Edited by F.M.Butterworth et.al., **Plenum Press**, New York, 1995, p.169-179.
- [73] E. Yeşilada, *Genotoxicity Testing of Some Metals in the Drosophila Wing Somatic Mutation and Recombination Test*, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 66 (2001) 464-469.
- [74] U. Graf, F.E. Würzler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall, P.G. Kale, *Somatic Mutation and Recombination Test in Drosophila melanogaster*, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 6 (1984) 153-188
- [75] D.S.Henderson, *Drosophila Cytogenetic Protocols*, **Humana Press**, 2004, p 389.
- [76] R. Rodriguez-Arnaiz, P.O. Soto, J.C.G. Oyarzun and U. Graf, *Analysis of mitotic recombination induced by several mono-and bifunctional alkylating agents in the Drosophila wing spot test*, **Mutation Research**, 351 (1996) 133-145.
- [77] M. Erden, *Serbest Radikaller*, **Temel ve Kliniksel Tıp Bilimleri**, 12 (1992) 201-207.
- [78] A. Aydın, A.Setal & A. Işimer, *Oksijen radikalleri ve biyolojik sistemlerdeki rolü*, **GATA Bülteni**, 39 (1997) 270-274.
- [79] B. Halliwell, *Free radicals and Antioxidants: A Personal View*, **Nutrition Reviews**, 52 (1994) 253-265.
- [80] B. Halliwell, *Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease*, **American Journal of Medicine**, 91 (1991) 14-21.
- [81] Y-Z. Fang, S. Yang and G. Wu, *Free radicals, antioxidants, and nutrition*, **Nutrition**, 18:10 (2002) 872-879.
- [82] E. Özkök, "Karaciğer gaglioizid düzeylerindeki değişikliklerin yaşlanmaya bağlı olarak glutatyon ve lipid peroksidasyonu ile ilişkisi", Doktora Tezi, İstanbul, 1997.
- [83] N. Dönmez, "Origanum acudidens (had.-Mazz.) ietswaart" uçucu yağı uygulanan ratlarda karaciğer antioksidan enzim sistemi aktiviteleri ile malondialdehit düzeyleri", Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas, 2002.
- [84] K. Kılınç, *Oksijen radikalleri; üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri*, **Biyokimya Dergisi**, 2 (1985) 60-69.
- [85] H Sies, *Role of reactive oxigen species ib Biological Processes*, **Klin. Wochenschr**, 69 (1991) 965-968.
- [86] H Sies, *From Basic Research to Clinical Application*, **American Journal of Medicine**, 91 (1991) 31-38.

- [87] E. Cadenas, *Basic mechanisms of antioxidant activity*, **BioFactors**, 6:4 (1997) 391-397
- [88] D. Harman, *Role of Antioxidant Nutrients in Aging: Overview*, **Age**, 18 (1995) 51-62.
- [89] A.S. Yalçın, *Antioksidanlar*, **Journal of İstanbul Chamber of Medicine**, 11 (1998) 342-346.
- [90] M.Terpstra, P.-G Henry & R Gruetter, *Measurement of reduced glutathione (GSH) in human brain using LCModel analysis of difference-edited spectra*, **Magnetic Resonance in Medicine**, 50:1 (2003) 19-23.
- [91] F. Missirlis, S. Rahlfs, N. Dimopoulos, H. Bauer, K. Becker, A. Hilliker, J.P. Phillips & H. Jäckle, *A putative glutathione peroxidase of Drosophila encodes a thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity*, **Biological Chemistry**, 384:3 (2003) 463-472.
- [92] S. Özden, “Bazı pesititlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması” Doktora Tezi, İstanbul Üniveritesi S.B.E. 2006.
- [93] B. Halliwell, *Oxygen free radicals and iron in relation to biology and edicine:some problems and concepts*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 246 (1986) 501-514.
- [94] J.M. McCord & I Fridovich, *The biology and pathology of oxygen radicals*, **Annals of Internal Medicine**, 89 (1978) 122-127.
- [95] J.M. McCord, *Free radicals and inflammation:protection of synovial fluid by superoxide dismutase*, **Science**, 185 (1974) 529-531.
- [96] Y. Sun, L.W. Oberley, Y. Li, *A simple method for clinical assay of superoxide dismutase*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 34:3 (1998) 497-500.
- [97] V. M. Petrovi, B. Milić, M. Spasić & Zorica Saičić, *Copper-Zinc Containing and Manganese Containing Superoxide Dismutase in the Ground Squirrel/Citellus Citellus/—The Effect of Hibernation*, **Free Radical Research**, 1:5 (1986) 339-346.
- [98] J.M. McCord & I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function of eritrocuprein (hemocuprein)*, **The Journal of Biological Chemistry**, 244 (1969) 6049-6055.
- [99] R.E. Hekkila, F.S. Cabbat & G. Cohen, *In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocaramate*, **Journal of Biological Chemistry**, 251 (1976) 2182-2185.
- [100] B. Halliwell & J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in Biology and medicine*, 3rd ed. New York, 1999.
- [101] F.J. Yost & I Fridovich, *Iron containing superoxide dismutase from Escherichia coli*, **Journal of Biological Chemistry**, 248 (1973) 4905-4908.
- [102] O.M. Lardinnois, *Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide*, **Free Radical Research**, 22 (1995) 251-274.
- [103] H.V. Samis, B.J. Rubenstein, L.A. Zajac, S. M. Hargen. *Temporal organization and aging in Drosophila melanogaster*, **Experimental Gerontoloji**, 16 (1981) 109-117.
- [104] I. Carlberg & B. Mannervik, *Gluthathione reductase*, **Methods in Enzymology**, 113 (1985) 484-490.
- [105] S. Sayın, “Vanadyum ve antioksidan enzim sistemi arasındaki ilişkinin incelenmesi” Yüksek Lisans Tezi, GATA. S.B.E., 1998.

- [106] E.C. Carlini, "Function and evolution of glutathione-s transferase 2 from *Drosophila Melanogaster*". PhD. Thesis, Pennsylvania State University, 1998.
- [107] M. Idaomar, R. El Hamss, F. Bakkali, N. Mezzoug, A. Zhiri, D. Baudoux, A. Munoz-Serrano, A. Alonso-Moraga, *Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of Drosophila melanogaster*, **Mutation Research**, 513:1-2 (2002) 61-68.
- [108] E.J. Fragiorge, M.A. Spanó and L.M.G Antunes, *Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of Drosophila melanogaster*, **Genetics and Molecular Biology**, 30:2 (2007) 449-455.
- [109] S.K. Abraham & U. Graf, *Protection by coffee against somatic genotoxicity in drosophila: Role of bioactivation capacity*, **Food and Chemical Toxicology**, 34:1 (1996) 1-14.
- [110] W.F. Costa & J.C. Nepomuceno, *Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of Drosophila melanogaster*, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 47:1 (2006) 18-24.
- [111] O. Olvera, C. Arceo and S. Zimmering, *Chlorophyllin [CHLN] and the mutagenicity of monofunctional alkylating agents in Drosophila: The action of CHLN need not include an influence on metabolic activation*, **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 467.2 (2000) 113-117.
- [112] B. Kaya, *Anti-Genotoxic Effect of Ascorbic Acid on Mutagenic Dose of Three Alkylating Agents*, **Turkish Journal of Biology**, 27 (2003) 241-246.
- [113] B.L.B. Valadares, U. Graf & M.A. Spanó, *Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in Drosophila melanogaster*, **Food and Chemical Toxicology**, 46:3 (2008) 1103-1110.
- [114] U. Graf, S. K. Abraham, J. Guzmán-Rincón and F. E. Würigler, *Antigenotoxicity studies in Drosophila melanogaster*, **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 402:1-2 (1998) 203-209.
- [115] M. Romero-Jiménez, J. Campos-Sánchez, M. Analla, A. Muñoz-Serrano and Á. Alonso-Moraga *Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs*, **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 585:1-2 (2005) 147-155.
- [116] R. El Hamss, M. Idaomar, A. Alonso-Moraga and A. Muñoz Serrano *Antimutagenic properties of bell and black peppers*, **Food and Chemical Toxicology**, 41:1 (2003) 41-47.
- [117] P. Ramirez-Victoria, J. Guzman-Rincon, J. J. Espinosa-Aguirre and S. Murillo-Romero, *Antimutagenic effect of one variety of green pepper (Capsicum spp.) and its possible interference with the nitrosation process*, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 496:1-2 (2001) 39-45.
- [118] J. Hodgkin, *A view of Mount Drosophila*, **Nature**, 404:6777 (2000) 442-443.
- [119] F. Missirlis, "Functional characterization of novel thioredoxin reductase and thioredoxin peroxidase in *Drosophila*", PhD Thesis, University Guelph, 2001, p. 7
- [120] Y.M. Li, H.Y.E. Chan, Y. Huang and Z.Y. Chen, *Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies*, **Molecular Nutrition and Food Research**, 51:5 (2007) 546 – 554.



- [121] Y.M. Li, H.Y.E. Chan, X.Q. Yao, Y. Huang and Z.Y. Chen, *Green tea catechins and broccoli reduce fat-induced mortality in Drosophila melanogaster*, **Journal of Nutritional Biochemistry**, 19:6 (2008) 376-383.
- [122] É. Le Bourg, N. Minois, P. Bullens and P. Bearet, *A mild stress due to hypergravity exposure at young age increases longevity in Drosophila melanogaster males*, **Biogerontology**, 1:2 (2000) 145-155.
- [123] K. Fışkın, S. Kandemir, D. Hamamcı, E. Yesilada and A.N. Bozcuk, *Age-related changes in catalase, glutathione reductase activities, the amount of glutathione in total body of Oregon and vestigial Drosophila melanogaster*, **Archives of Gerontology and Geriatrics**, 4 (1994) 85-90.
- [124] W.C. Orr, L.A. Arnold and R. S. Sohal, *Relationship between catalase activity, life span and some parameters associated with antioxidant defenses in Drosophila melanogaster*, **Mechanisms of Ageing and Development**, 63:3 (1992) 287-296.
- [125] M. Durusoy, N. Diril and A.N. Bozcuk, *Age-related activity of catalase in different genotypes of drosophila melanogaster*, **Experimental Gerontology**, 30:1 (1995) 77-86.
- [126] S. Shen, Y. Chien & C. Chien, *Induction of glutathione S-transferases activities in Drosophila melanogaster exposed to phenol*, **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 53:2 (2003) 80-91.
- [127] Y.M. Li, H.Y.E. Chan, Y. Huang and Z.Y. Chen, *Broccoli (Brassica oleracea var. botrytis L.) improves the survival and up-regulates endogenous antioxidant enzymes in Drosophila melanogaster challenged with reactive oxygen species*, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 88:3 (2008) 499-506.
- [128] K.F. Pirker, K. Stolze, T.G. Reichenauer, H. Nohl & B.A. Goodman, *Are the biological properties of kaempferol determined by its oxidation products?* **Free Radical Research**, 40:5 (2006) 513-521
- [129] K. Horváthová, I. Chalupa, L. Šebová, D. Tóthová and A.Vachálková, *Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells*, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 565:2.3 (2005) 105-112.
- [130] M.Y. Heo, L.H. Jae, S.S. Jung and W.W. Au, *Anticlastogenic effects of galangin against mitomycin C-induced micronuclei in reticulocytes of mice*, **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 360:1 (1996) 37-41.
- [131] L. Kriková, M. Nagy, J. Polónyi and L. Ebringe, *The effect of flavonoids on ofloxacin-induced mutagenicity in Euglena gracilis*, **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 416:1-2 (1998) 85-92.
- [132] R. Edenharder and D. Grünhage, *Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102*, **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 540:1 (2003) 1-18.
- [133] V. Abalea, J. Cillard, M.-Pierre Dubos, O. Sergent, P. Cillard and I. Morel, *Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures*, **Free Radical Biology and Medicine**, 26:11-12 (1999) 1457-1466.
- [134] S. Taj & B. Nagarajan, *Inhibition by quercetin and luteolin of chromosomal alterations induced by salted, deep-fried fish and mutton in rats*, **Mutation research**, 369:1-2 (1996) 97-106.

- [135] M.Y. Heo, S.J. Lee, C.H. Kwon, S.W. Kim, D.H. Sohn and W.W. Au *Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes*, **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 311 (2), 1994. 225-229.
- [136] S.J. Duthie, A.R. Collins, G.G. Duthie and V.L. Dobson, *Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes*, **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 393:3 (1997) 223-231.
- [137] G. Şener, Ö. Şehirli, A. Tozan, A. Veliöğlü-Övünç, N. Gedik and G. Z. Omurtag, *Ginkgo biloba extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats*, **Food and Chemical Toxicology**, 45:4 (2007) 543-550.
- [138] A. Sgambato, R. Ardito, B. Faraglia, A. Boninsegna, F.I. Wolf and A. Cittadini *Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage*, **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 496 (1-2), 2001. 171-180.
- [139] A.Y. Sun, Y-m. Chen, M. James-Kracke, P. Wixom and Y. Cheng, *Ethanol-induced cell death by lipid peroxidation in PC12 cells*, **Neurochemical Research** 22:10 (1997) 1187-1192.
- [140] S. Cadenas and G. Barja, *Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO<sub>3</sub>*, **Neurochemical Research** 22 (10), pp. 1187-1192.
- [141] M. R. Wheeler, *The Drosophilidae: A Taxonomic overview. In: The Genetics and Biology of Drosophila*, M. Ashburner, H. L. Carsen, J. Thompson, J. N. Academic Press INC. Ltd. London, 1981, Vol. 3a, s 1-84.
- [142] U. Graf ve D. Singer, *Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster*, **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, 8 (1992) 15-27
- [143] U.Graf and F.E. Würgler, *The Somatic white-ivory Eye Spot Does Not Detect the Same Spectrum of Genotoxic Events as the Wing Somatic Mutation and Recombination Test in Drosophila melanogaster*, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 27 (1996) 219-226.
- [144] A. M. Clark ve M. Rockstein, *Aging in insects*, **Physiology of insecta**, 1 (1964) 227-281.
- [145] <http://www.anatomy.unimelb.edu.au/researchlabs/whittington/index.html>. 05.05.2008
- [146] I. McMillan, M. Fitz-Earl ve D. S. Rabson, *Quantitative Genetics of Fertility I. Life Time Egg Production of Drosophila melanogaster*, **Theoretical Genetics**, 65 (1970) 349-353.
- [147] A. Demirsoy, *Yaşamın Temel Kuralları: Omurgasızlar, Cilt II*. Hacettepe Üniversitesi Yayını, Ankara, 1982, s. 41.
- [148] W. W. Doane, *Drosophila: Methods in Developmental Biology*, Edited by F. H. Wilt, N. K. Vessels, (1967) 214-219.
- [149] P. Pandey, R.M. McGowen, E.W. Vogel ve F.M. Butterworth, “*Genotoxicity of polychlorinated biphenyl (PCB) and polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures in the white/white<sup>+</sup> eye mosaic assay*” in *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* **Plenum Press**, New York, 1995, s.184
- [150] M. Ashburner, J. R. Thompson, *The Laboratory Culture of Drosophila*, In *The Genetics and Biology of Drosophila*, M. Ashburner, T. R. F. Wright, **Academic Press Inc. Ltd.**, London, 1978, Vol. 2a, p. 2-81.

- [151] B. Falakalı, “*Drosophila Genetiği*”, **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları** No:134, İzmir, 1989, s.1-10
- [152] [http://www.new-science-press.com/info/illustration\\_files/nsp-cellcycle-2-4-2\\_14.jpg](http://www.new-science-press.com/info/illustration_files/nsp-cellcycle-2-4-2_14.jpg)
- [153] M. Ashburner, “*Drosophila*”, **A Laboratory Handbook**, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1989.
- [154] N. Alemdar, *Drosophila'nın morfolojik, anatomik yapısı ve bazı sitogenetik denemeler*, Atatürk Üniv. Basımevi, Erzurum, 1980.
- [155] I.G. Mithcell and R.D. Combes, *Mutation tests with the fruit fly Drosophila melanogaster*. In Venitt's and I.M. Parry, *Mutagenicity testing a practical approach*. pp. 149-185, **IPRL**. 1984.
- [156] F. E. Würgler ve E. W. Vogel, *In vivo mutagenicity testing using somatic cells of Drosophila melanogaster*, **Chemical mutagens, Principles and Methods for Their detection**, **Plenum Press**, New York, 1986, p.1-72.
- [157] M. Spano, U. Graf ve F.E. Würgler, *Recombinogenic activity of four compounds in the standart and high bioactivation crosses of the wing spot test in Drosophila melanogaster*, **Mutation Research**, 360 (1996) 201-300.
- [158] A.N. Bozcuk, “*Drosophila melanogaster Meig (Diptera:Drosophilidae) Yaşlanması ve Orgel Hipotezi Üzerinde Araştırmalar*”, Doçentlik Tezi, Ankara, 1976.
- [159] H. Frei and F.E. Würgler, *Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive result*, **Mutation Research**, 203 (1988) 297-308.
- [160] M.A. Kastenbaum ve K.O. Bowman, *Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies*, **Mutation Research**, 9 (1970) 527-549.
- [161] S.K. Abraham, *Antigenotoxicity of coffee in the Drosophila assay for somatic mutation and recombination*, **Mutagenesis**, 9:4 (1994) 383-386.
- [162] J.M McCord, I. Fridovich, *Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythroeupein (Hemoeupein)* **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 244, No. 22, 6049-6055, (1969), November 25.
- [163] H. Luck, *Catalase*. **Methods of Enzymatic Analysis**, (1963), 885-888.
- [164] A. E. Cribb, J. S. Leeder, and S. P. Spielberg, *Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5.5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*. **Analytical Biochemistry**, 183 (1989) 195-196.
- [165] W. H. Habig, M. J. Pabst and W. B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*, **Journal of Biological Chemistry**, 249 (1974) 7130–7139.
- [166] T.P.M Akerboom & H. Sies, *Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in Biological sampels*. **Methods in Enzymology**, 77, (1981) 373-382.
- [167] M.M. Bradford, *A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, **Analytical Biochemistry**, 72 (1976) 248–254.
- [168] J. Lee, E. Park, J. Choe, and J. K. Chipman, *N-Methyl-N-Nitrosourea (MNU) Induces Papillary Thyroid Tumours Which Lack ras Gene Mutations in the Hermaphroditic Fish Rivulus marmoratus*, **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, 20(2000)1–9.
- [169] E. Yesilada, M.Özmen ve Ö. Yesilada, *Studies on the toxic and genotoxic effect of olive iol mill wastewater*, **Fresenius Environmental Bulletin**, 8 (1999) 732-739

- [170] K.S. Cunha, M.L. Reguly, U. Graf ve H.H.R. Andrade, *Taxannes: the genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of Drosophila melanogaster*, **Mutagenesis**, 16: 1 (2001), 79-84.
- [171] E.E. Dogan, E.Yesilada, L. Ozata, and S. Yologlu, *Genotoxicity Testing of Four textile Dyes in Two Crosses of Drosophila Using Wing Somatic Mutation and Recombination Test*, **Drug and Chemical Toxicology**, 28 (2005) 289–301.
- [172] H. Scholz, J. Ramond, C. M. Singh and U. Heberlein, *Functional Ethanol Tolerance in Drosophila*, **Neuron**, 28 (2000) 261–271.
- [173] M. Niikawa, S. Shin and H. Nagase, *Suppressive effect of post- or pre-treatment of aspirin metabolite on mitomycin C-induced genotoxicity using the somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaste*, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 61 (2007) 113-119.
- [174] R.Y. Cheung, A. M. Rauth, P. T. Ronaldson, R. Bendayan and X. Yu Wu, *In vitro toxicity to breast cancer cells of microsphere-delivered mitomycin C and its combination with doxorubicin*, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 62 (2006) 321–331.
- [175] M.A. Spanó, H. Frei, F.E Würgler and U. Graf, *Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of Drosophila melanogaster in the wing spot test*, **Mutagenesis** 16 (2001) 385-394.
- [176] I. Gut, V. Danielová, J. Holubová, P. Souček, H. Klučková, *Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel, and docetaxel for tumor cell lines in vitro: effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism*, **Archives of Toxicology**, 74 (2000) 437-446.
- [177] P. I. Pillans, S. F. Ponzi, and M. I. Parker, *Effects of ascorbic acid on the mouse embryo and on cyclophosphamide-induced cephalic DNA strand breaks in vivo*, **Archives of Toxicology**, 64 (1990) 423-425.
- [178] K. K. Richardson, R. M. Crosby , F. C. Richardson, and T. R. Skopek, *DNA base changes induced following in vivo exposure of unadapted, adapted or Ada Escherichia coli to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*, **Molecular and General Genetics**, 209 (1987) 526-532.
- [179] C.S. Bestwick, L. Milne, *Influence of galangin on HL-60 cell proliferation and survival*, **Cancer Letters**, 243 (2006) 80–89.
- [180] J. Lu, L.V. Papp, J. Fang, S. Rodriguez-Nieto, B. Zhivotovsky and A. Holmgren, *Inhibition of Mammalian Thioredoxin Reductase by Some Flavonoids: Implications for Myricetin and Quercetin Anticancer Activity*, **Cancer Research**, 66: 8 (2006) 4410-4418.
- [181] D. R. Valenzano, E. Terzibasi, T. Genade, A. Cattaneo, L. Domenici A. Cellerino, *Resveratrol Prolongs Lifespan and Retards the Onset of Age-Related Markers in a Short-Lived Vertebrate*, **Current Biology** 16 (2006) 296–300.
- [182] J. H. Bauer, S. Goupil, G. B. Garber, and S. L. Helfand, *An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in Drosophila melanogaster*, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 101:35 (2004) 12980-12985.
- [183] Y.K. Nakamura, K. Kawai, H. Furukawa, T. Matsuo, K. Shimoi, I. Tomita, Y. Nakamura, *Suppressing effects of S-methyl methanethiosulfonate and diphenyl disulfide on mitomycin C-induced somatic mutation and recombination in Drosophila melanogaster and micronuclei in Mice*, **Mutation Research**, 385 (1997) 41–46.

- [184] K. Taira, Y. Miyashita, K. Okamoto, S. Arimoto, E. Takahashi, T. Negishi, *Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea**, **Mutation Research** 586 (2005) 115–123
- [185] M. Sinigaglia, M.L. Reguly, and H.H. Rodrigues de Andrade, *Effect of Vanillin on Toxicant-Induced Mutation and Mitotic Recombination in Proliferating Somatic Cells of *Drosophila melanogaster**, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 44 (2004) 394–400.
- [186] M. Batiste-Alentorn, N. Xamena, A. Creus and R. Marcos, *Genotoxic evaluation of ten carcinogens in the *Drosophila melanogaster* wing spot test*, **Experientia** 51:1 (1995) 73-76.
- [187] J.A. Zijlstra and E.W. Vogel, *Influence of metabolic factors on the mutagenic effectiveness of cyclophosphamide in *Drosophila melanogaster**, **Mutation Research**, 210 (1989) 79-92.
- [188] H. Tsuda and N. Takeda, *Effect of tumor promoter TPA on spontaneous and mitomycin C induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster**, **Mutation Research**, 189 (1987) 375-379.
- [189] T. Inoue, Y.F. Sasaki, H. Imanishi, T. Ohta, Y. Shirasu, *Suppression of mitomycin C-induced micronuclei in mouse bone marrow cells by posttreatment with vanillin*, **Mutation Research**, 202 (1988) 93–95.
- [190] B. Kaya, A. Yanikoglu, R. Marcos, *Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test*, **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, 19 (1999) 305–312.
- [191] A. Matsuoka, A. Furuta, M. Ozaki, K. Fukuhara and N. Miyata, *Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line*, **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 494:1-2 (2001) 107-113.
- [192] V.M. Breinholt, A-M. Mølck, G.W. Svendsen, B. Daneshvar, A.M. Vinggaard, M. Poulsen and L.O. Dragsted, *Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) on preneoplastic lesions and on oxidative damage, hormonal status, and detoxification capacity in the rat*, **Food and Chemical Toxicology**, 41:10 (2003) 1315-1323.
- [193] R.D. Snyder & P.J. Gillies, *Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells*, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 40:4 (2002) 266-276.
- [194] I.D. Silva, A.S. Rodrigues, J. Gaspar, A. Laires and J. Rueff, *Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: Relevance to the genotoxicity of galangin*, **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 393:3 (1997) 247-257.
- [195] R. Edenharder & X. Tang, *Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds*, **Food and Chemical Toxicology**, 35:3-4 (1997) 357-372.
- [196] K. Horváthová, L. Novotný, D. Tóthová and A. Vachálková, *Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated human ML cells K562*, **Neoplasma**, 51:5 (2004) 395-399.
- [197] G. Michels, W. Wätjen, P. Niering, B. Steffan, Q.-H. Tran Thi, Y. Chovolou, A. Kampkötter, A. Bast, P. Proksch and R. Kahl *Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells*, **Toxicology**, 206:3 (2005) 337-348.

- [198] S De Flora, C Bennicelli, A Rovida, L Scatolini and A Camoirano. *Inhibition of the 'spontaneous' mutagenicity in Salmonella typhimurium TA102 and TA104*, **Mutat Research**, 1:307 (1994) 157-67.
- [199] J.P Brown & P.S Dietrich, *Mutagenicity of plant flavonols in the Salmonella/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources*, **Mutation Research**, 66 (3) (1979) 223-240.
- [200] F. Uenobe, S.-i Nakamura. & M. Miyazawa, *Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1*, **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 373:2 (1997) 197-200.
- [201] D. Anderson, M.M. Dobrynska, N. Başaran, A. Başaran and T.-W. Yu, *Flavonoids modulate Comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm*, **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 402:1-2 (1998) 269-277.
- [202] V. Abalea, J. Cillard, M.-P. Dubos, J.-P. Anger, P. Cillard and I. Morel, *Iron induced oxidative DNA damage and its repair in primary rat hepatocyte culture*, **Carcinogenesis**, 19:6 (1998) 1053-1059.
- [203] M. Das, H. Mukhtar, D.P. Bik & D.R Bickers, *Inhibition of epidermal xenobiotic metabolism in SENCAR mice by naturally occurring plant phenols*, **Cancer Research**, 47:3 (1987) 760-766.
- [204] K. Kanazawa, T. Yamashita, H. Ashida, G.-I. Danno, *Antimutagenicity of Flavones and Flavonols to Heterocyclic Amines by Specific and Strong Inhibition of the Cytochrome P450 1A Family*, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 62:5 (1998) 970-977.
- [205] Q. Cai, Rahn, R.O. R. Zhang, *Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals*, **Cancer Letters**, 119:1 (1997) 99-107.
- [206] K. Horváthová, I. Chalupa, L. Šebová, D. Tóthová and A. Vachálková, *Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells*, **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 565:2 (2005) 105-112.
- [207] M. Miyazawa & M. Hisama, *Antimutagenic activity of flavonoids from Chrysanthemum morifolium*, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 67:10 (2003) 2091-2099.
- [208] J. Smith and A. Shrift, *Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase*, **Comparative Biochemistry and Physiology**, 63 (1979) 39-44.
- [209] R.S. Sohal, L. Arnold and W.C. Orr, *Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP<sup>+</sup> and NAD/NAD<sup>+</sup> in Drosophila melanogaster*, **Mechanism of Ageing Development**, 56 (1990) 223-235.
- [210] E.L. Bourg, *Oxidative stress, aging and longevity in Drosophila melanogaster*, **FEBS letters**, Vol.498, (2001), 183-186.
- [211] P. Amstad, A. Peskin, A. Shah, G. Mirault, M.E. Moret, R. Zbinden, and P. Cerutti, *The balance between Cu/Zn- Superoxide Dismutase and Catalase affect the Sensitivity of Mouse Eidermal Cells to Oxidative Stres*, **Biochemistry**, 30 (1991), 9305-9313.
- [212] R.J. Nicolosi, M.B. Baird, H.r. Massie and H.V. Samis, *Senescence in Drosophila-II. Renewal of catalase activity in flies of different ages*, **Experimental Gerontology**, 8 (2003) 101-108.

- [213] P. Nourissat, M. Travert, M. Chevanne, X. Tekpli, A. Rebillard, L.M-Müller, M. Rissel, J. Cillard, M.T. Dimanche-Boitrel, D. Lagadic-Gossmann and O Sergent, *Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering*, **Hepatology**, 47:1 (2008) 59-70.
- [214] A.T Canada, E. Giannella, T.D. Nguyen and R.P. Mason, *The production of reactive oxygen species by dietary flavonols*, **Free Radical Biology and Medicine**, 9 (1990) 441-449.
- [215] W.F. Hodnick, F.S. Kung, W.J. Roettger, C.W. Bohmont and R.S. Pardini, *Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: a structure-activity study*, **Biochem Pharmacology**, 35 (1986) 2345-2357.
- [216] W.C. Orr & R.S. Sohal, *The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic Drosophila melanogaster*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 297:1 (1992) 35-41.
- [217] V. Hebbar, G. Shen, R. Hu, B-R. Kim, C. Chen, P.J. Korytko, J.A. Crowell, B.S. Levine, A.-N. Tony Kong, *Toxicogenomics of resveratrol in rat liver*, **Life Sciences**, 76:20 (2005) 2299-2314.
- [218] M. Harwood, B. Danielewska-Nikiel, J.F. Borzelleca, G.W. Flamm, G.M. Williams, T.C. Lines, *A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties*, **Food and Chemical Toxicology**, 45:11 (2007) 2179-2205.
- [219] J. Duarte, M. Galisteo, M.A. Ocete, F. Perez-Vizcaino, A. Zarzuelo and J. Tamargo, *Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats*, **Molecular Cell Biochemistry**, 221 (2001) 155-160.

## ÖZGEÇMİŞ

28.02.1975 tarihinde K.Maraş'ın Andırın ilçesine bağlı Bulgurkaya Köyü'nde doğdu. İlk öğrenimini Ordu'da, orta öğrenimini Uşak Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 1994 yılında Adana Anadolu Lisesi'nden mezun oldu ve 1995 yılında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünde üniversite öğrenimine başladı. 1999 yılında bu bölümden mezun oldu. 24 Mayıs 2000 tarihinde İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Bölümü Fen Bilgisi Öğretmenliği programına Araştırma Görevlisi olarak atandı ve aynı yıl İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Biyoloji anabilim dalında “Bazı Astrazon Grubu Tekstil Boyalarının Genotoksik Etkisinin *Drosophila melanogaster* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tezini 2002 yılında tamamlayan araştırmacı, aynı yıl Doktora öğrenimine başladı ve 2008 yılı itibarıyla Doktora çalışmalarını tamamlamış bulunmaktadır.

Araştırmacı iyi derecede İngilizce bilmekte olup biyoloji ve fen bilimleri eğitimi alanında ulusal ve uluslar arası bilimsel dergilerde yayınlanmış makaleleri ve çeşitli bilimsel kongrelerde sunulmuş bildiri ve poster çalışmaları bulunmaktadır. Halen İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesindeki görevini sürdüren araştırmacı evli olup, bir çocuk annesidir.