



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

## *Smilax Excelsa* L. Ekstraktlarının Ames/Salmonella/Mikrozom Test Sistemi İle Antimutajenik Etkisinin Araştırılması

Elvan AZAP<sup>a</sup>, Emine YALÇIN<sup>a\*</sup>, Kültiğın ÇAVUŞOĞLU<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Biyoloji Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Giresun Üniversitesi, Giresun, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazarın e-posta adresi: emine.yalcin@giresun.edu.tr

### ÖZET

Bu çalışmada, *Smilax excelsa* L. yaprak ve meyve ekstraktlarının antimutajenik aktiviteleri Ames/Salmonella/mikrozom test yöntemi ile incelenmiştir. *Smilax excelsa* L. yaprak ve meyve ekstraktlarının 10-100 mg/mL doz aralığında sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Antimutajenite çalışmaları S9 (+) ve S9 (-) olmak üzere *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum antimutajenik etki yaprak ekstraktı ile 100 mg/plak dozunda TA98 suşu üzerine S9 karışımı yokluğunda %88 olarak elde edilmiştir. Ayrıca, *Smilax excelsa* L. bitkisinin tüm ekstraktlarının farklı oranlarda antimutajenik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Smilax excelsa* L., Ames/Salmonella/mikrozom test sistemi, Antimutajenik aktivite

## Investigation The Antimutagenic Effects Of *Smilax Excelsa* L. Extracts By Ames/Salmonella/Microsome Test System

### ABSTRACT

In this study, leaf and fruit extracts of *Smilax excelsa* L., were investigated for antimutagenic activity by Ames/Salmonella/microsome test method. Fruit and leaf extracts was not observed the cytotoxic effect in the range of 10-100 mg/mL doses. Antimutagenity analysis were studies with S9(+) and S9(-) on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains. Maximum antimutagenic activity was observed with leaf extracts at 100 mg/plaque dose on TA98 strain in the absence of S9 as 88%. And also all the extracts of *Smilax excelsa* L. showed antimutagenic activity with different rates .

**Keywords:** *Smilax excelsa* L., Ames/Salmonella/microsome test system, antimutagenic activity

## I. GİRİŞ

Artan endüstrileşme ile birlikte farklı kimyasal maddelerin kullanımının artması ve toksik etkilerin ortaya çıkması, bu toksisitesi azaltabilecek doğal bileşenlere karşı ilgiyi her geçen gün arttırmaktadır. Günlük yaşamda antimitojen ve antikarsinogen etkili bileşiklerin düzenli kullanımının kanser ve genetik hastalıklarının önlemede etkili olabileceği düşünülmektedir [1-3]. Kimyasal maddelerin mutajenik ve antimutajenik etkilerini belirlemek için en güvenilir yöntem deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Fakat indüksiyon testinin uzun zaman alması, tekrarlanabilirliğinin zor olması ve maliyetinin yüksek olması bu testin kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Bu nedenle mutajenite ve antimutajenite araştırmaları için kısa zamanda sonuç verebilen, tekrarlanabilirliği kolay, maliyeti düşük test sistemleri geliştirilmiştir. Kısa zamanlı ve maliyeti düşük test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanlardan bazıları Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi, S.O.S kromotest gibi bakteriyel test sistemleridir. Bakteriler; basit ortamlarda hızlı üremeleri ve maliyetlerinin düşük olması nedeni ile tercih edilmektedirler [4,5]. Bu çalışmada Karadeniz bölgesinde sıkça tüketilen *Smilax excelsa* L. meyve ve yaprak ekstraktlarının ve antimutajenik aktivitesi Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi ile belirlenmiştir [6-7]. *Smilax* türlerine ait dokuların immunomodülatör, antibakteriyel, antifungal, antioksidan gibi çeşitli farmakolojik özellikleri olduğu bilinmektedir. *Smilax china* kök ekstraktlarının yüksek oranda DPPH radikal süpürücü etkiye sahip olduğu, lipid peroksidasyonunu önlediği ve antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı belirtilmektedir. Kanı temizleme ve terletme özelliği bilinen *S. excelsa*'nın da frengide tedavi amaçlı kullanıldığı rapor edilmektedir [8-10].

*Smilax* türlerinde çeşitli aktif bileşenlerin olduğu pek çok çalışma ile ortaya konmuştur. Özellikle flavonoidler, fenil prapenoidler, fenolik asitler aktif bileşen olarak rizomlarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Bu aktif bileşenler *Smilax* türlerinin antitümör, anti-mutajenik, antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antiinflamatuvar özellik sergilemesinden sorumludur. Bu çalışmada *S. excelsa* yaprak ve meyve ekstraktlarının antimutajenik aktivitesi Ames/Salmonella/ Mikrozom test yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

## II. YÖNTEM

### A. ÖRNEK HAZIRLAMA VE EKSTRAKSİYON ÇALIŞMALARI

*S. excelsa* yaprak ve meyve örnekleri laboratuvar ortamında steril koşullar altında kurutulmuş, örnekler laboratuvar tipi diskli değirmende öğütüldükten sonra analizlere kullanılmaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon için, 0.2 g öğütülmüş örnek 10 ml ekstraksiyon solventi (metanol, kloroform ve aseton) ile çalkalamalı inkübatörde 24 saat süre ile oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda katı partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla ekstrakt, Whatman No:1 filtre kağıdından filtre edilmiş ve filtrat 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonrasında sıvı faz, evaporatör yardımı ile uçurulmuş ve elde edilen ekstraktlar -18 °C'de analiz edilinceye kadar muhafaza edilmiştir.

### B. EKSTRAKSİYON VERİMLİLİĞİ

Verimlilik tayininde selülozik kartuşlar kullanılmış ve selülozik kartuşun darası alınarak 20 g bitki örneği kartuşa eklenmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonrasında selülozik kartuş kurutularak tartılmıştır.

Ekstraksiyon öncesi ve sonrasında alınan tartımlar arasındaki fark kullanılarak verimlilik oranı (%) hesaplanmıştır.

### C. SİTOTOKSİK DOZLARIN BELİRLENMESİ

Ekstraksiyon işlemi sonrasında liyofilize halde elde edilen bitki ekstraktlarından DMSO içerisinde 10mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL olacak şekilde dört farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Meyve ve yaprak ekstraktları için her dozdan üçlü tekrarlar hazırlanmıştır. *Smilax* özütlerinin toksik dozlarının belirlenmesi amacı ile Dean ve ark. [11] tarafından belirlenen yöntem kullanılmıştır. 100 µl bakteri kültürü (10<sup>9</sup>/ml), 500 µl S9 karışımından ve 100 µl farklı dozlarda bitki özütlerinden, 2.5 ml top agara ilave edilmiştir. 5 dk hafif çalkalama işlemi sonrasında karışım minimal glukoz agar içeren plaklara aktarılmış ve 37°C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir [12]. İnkübasyon sonrasında revertant koloniler sayılarak sitotoksik doz tayini gerçekleştirilmiştir.

### D. ANTİMUTAJENİTE TESTİ

Antimutajenite tayini için mutant *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 test suşları kullanılmıştır. Antimutajenite deneyinde iki test suşu üzerinde mutajen olduğu bilinen maddelerin, mutajenik etkilerinin bitki ekstraktları tarafından inhibe edilme oranları araştırılmıştır. Bu amaçla Maron ve Ames [13] tarafından önerilen ve Zengin ve ark. [14] tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılmıştır. Kısaca; 100 µl bakteri kültürü (1-2x10<sup>9</sup> bakteri/ml), 100 µl farklı dozda bitki ekstraktları, 100 µl pozitif mutajen çözeltisi ve 500 µl S9 karışımı ya da fosfat tamponu (S9'suz deney için), 2.5 ml üst agar içerisine ilave edilmiştir. Karışım vorteks ile çalkalanarak minimal glukoz agar plakalarının yüzeyine dökülerek hızlı bir şekilde yayılmıştır. Plaklar 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin ardından revertant koloniler sayılmıştır. Özütlerin antimutajenite oranları aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır [15].

$$\text{Antimutajenite (\%)} = \frac{(A-B)}{(A-C)} \times 100$$

A; Bakteri+mutajen plağındaki revertant koloni sayısını, B; Bakteri+mutajen+ekstrakt plağındaki revertant koloni sayısını, C; Kendiliğinden geri dönen revertant koloni sayısını (sadece bakteri plağı) ifade etmektedir. Elde edilen yüzdelerden antimutajenite değerlendirilmesinde, antimutajenite yüzde aralıkları esas alınmıştır. Antimutajenite değerlendirilmesinde %0-25; zayıf antimutajenite veya aktivite yok, %26-40; orta dereceli antimutajenite, %40 ve üzeri ise güçlü antimutajeniteye işaret etmektedir.

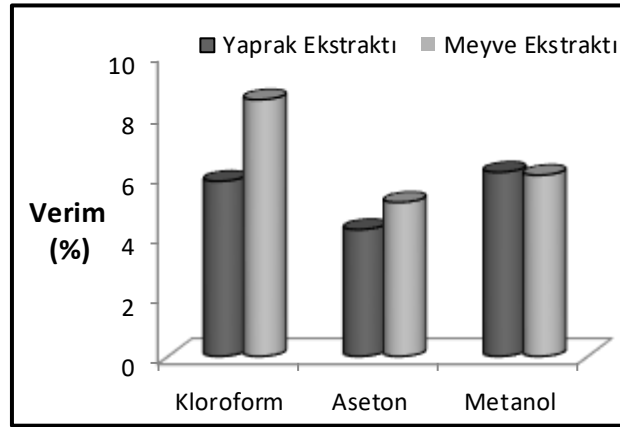
Ekstraktların antimutajenik analizlerine paralel olarak standart mutajenik etkisi olduğu bilinen ajanlar pozitif kontrol olarak aynı işleme tabii tutulmuştur. 2-aminoflouren (2-AF) S9 karışımı varlığında pozitif kontrol olarak *S. typhimurium* TA 98 suşu denemelerinde; 4-nitro-o-fenilendiamin S9 karışımı yokluğunda *S. typhimurium* TA 98 suşu denemelerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu ile yapılan çalışmalarda S9 karışımı varlığı ya da yokluğu farketmeksizin pozitif kontrol olarak sodyum azid kullanılmıştır. Çalışmada bitki ekstraktları ve pozitif kontrol amacıyla kullanılan 4-nitro-o-fenilendiamin, 2-aminoflouren Dimetil sülfoksit içerisinde çözülmüştür. Bu kapsamda dimetil sülfoksit çözeltileri negatif kontrol amacıyla test edilmiştir [16-17].

İstatistiksel farklılıkların değerlendirilmesinde One-way ANOVA ve Duncan testleri kullanılmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  Standart sapma (SD) değerleri olarak verilmiş ve p değerleri 0.05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### III. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *S. excelsa* yaprak ve meyve ekstraktının antimutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları ile araştırılmıştır. Çalışmada öncelikli olarak doku ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş, ekstraksiyon verimlilikleri ve sitotoksik doz hesaplamaları yapılmıştır. *S. excelsa* yaprak ve meyve kısımlarının kloroform, aseton ve metanol çözücülerinde ekstraksiyon verimlilikleri Şekil 1'de verilmiştir. *S. excelsa* meyve dokularının ekstraksiyonunda en verimli çözügen kloroform iken yaprak dokuları için en uygun çözügen maddenin metanol olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *S. excelsa* meyve dokularının ekstraksiyonunda yaprak dokularına kıyasla daha fazla ekstrakt elde edilmiştir. Meyve dokularında gerçekleştirilen ekstraksiyonda yaprak dokularına kıyasla 1.39 kat fazla verim elde edildiği belirlenmiştir. Dokular arasındaki bu farklılık, yaprak dokularındaki hücre zarı yapısının ekstraksiyona karşı dayanıklı olması ile ilişkilendirilmiştir.

Yaprak dokularının metanol ile ekstraksiyonunda kloroform ekstraksiyonuna kıyasla 1.05 kat, aseton ekstraksiyonuna kıyasla 1.45 kat daha fazla verimlilik oranının elde edildiği belirlenmiştir. Meyve dokularında ise kloroform ile ekstraksiyonda aseton ekstraksiyonuna kıyasla 1.60 kat, metanol ekstraksiyonuna kıyasla 1.41 kat daha fazla verimlilik oranının elde edildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar dokuların çözügenlere verdiği farklı cevap/geçirgenlik ilişkisi ile açıklanabilir. Çalışmaların devamında meyve dokularından kloroform ile elde edilen ekstraktlar, yaprak dokularında ise metanol ile elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır.



Şekil 1. *S. excelsa* yaprak ve meyve örneklerinde ekstraksiyon verimlilikleri

Antimutajenite denemelerinde kullanılan bitki ekstraktlarının sitotoksik dozları *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde araştırılmıştır ve sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Mutajenite testinde normal koşullarda kendiliğinden oluşan revertant koloni değerlerinin iki katı düzeyde ya da iki katından fazla bir sayıda revertant koloni elde edilmesi mutajenik etkiye işaret etmektedir. *S. excelsa* meyve ve yaprak ekstraktları ile elde edilen revertant koloni sayıları normal koşullarda kendiliğinden oluşan revertant koloni sayıları ile paralellik göstermiş olup 2 katı düzeyine çıkmamıştır. Bu nedenle çalışmada test edilen dozların sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Revertant koloni sayısı ile test edilen ekstrakt dozu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı, yani revertant koloni

oluşumunun doza bağımlı olmadığı belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarından genel olarak S9 (+) varlığında elde edilen revertant koloni sayısının S9(-)'e kıyasla daha yüksek olduğu fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

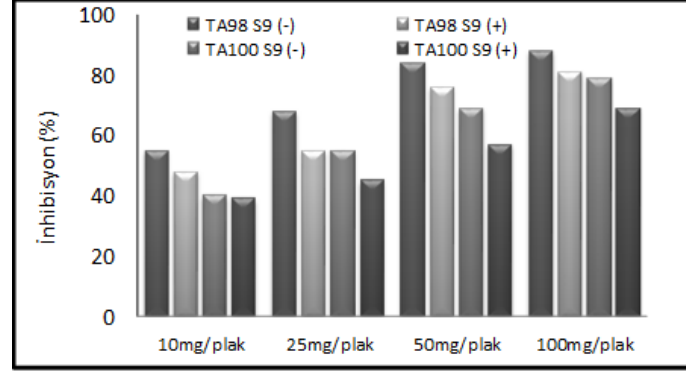
*S. excelsa* yaprak ekstraktlarının TA 98 ve TA 100 suşları ile gerçekleştirilen antimutajenite test sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. Yaprak ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA98 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda %88 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/plak ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranının 10 mg/plak dozunda elde edilen orana kıyasla 1.60 kat fazla olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde 10-100 mg/plak aralığında ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Yaprak ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA98 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında %81 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde S9 karışımı varlığında da inhibisyon yüzdeleri oranları baz alındığında 0-100 mg/plak aralığında ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca S9 karışımı varlığında ya da yokluğunda elde edilen veriler kıyaslandığında S9 karışımı kullanıldığında elde edilen inhibisyon sonuçlarının daha düşük olduğu belirlenmiştir. TA 100 suşu ile gerçekleştirilen antimutajenite test sonuçlarında yaprak ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA100 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda %79 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde 10 mg/plak aralığında ekstraktların orta düzeyde antimutajenik aktivite, 25-100 mg/plak aralığında ekstraktların güçlü antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir.

**Tablo 1.** Yaprak ve meyve ekstraktlarının sitotoksik dozları

	Konsantrasyon (mg/plak)	Revertant koloni/plak			
		TA 98		TA 100	
		S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
<b><i>S. excelsa</i> yaprak dokusu</b>	10	21±2	25±2	91±5	90±6
	25	29±3	27±3	98±4	103±5
	50	31±2	35±3	90±4	105±5
	100	35±2	41±4	101±6	111±8
<b><i>S. excelsa</i> meyve dokusu</b>	10	25±2	39±2	115±5	124±10
	25	27±3	26±3	109±7	119±7
	50	36±3	31±3	99±4	121±11
	100	29±2	30±2	115±11	127±9
<b>Pozitif k.</b>	100	495±21	3916±50	4126±38	4218±49
<b>Negatif k.</b>	100	31±3	35±2	109±8	111±7

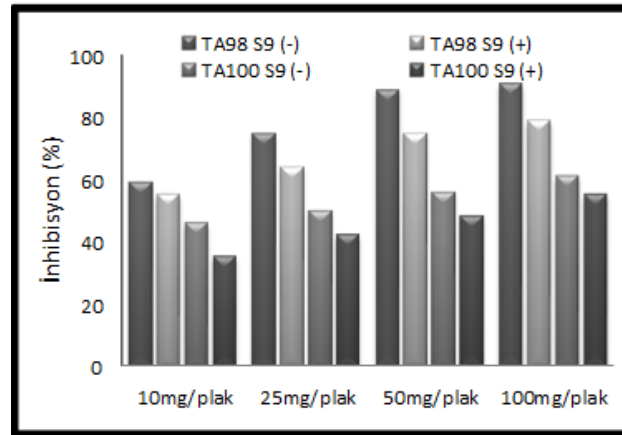
Yaprak ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA100 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında %69 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Antimutajenik aktivite artışında doz artışı etkisinin, TA 100 suşu denemelerinde TA98 suşuna kıyasla daha etkili olduğu gözlenmiştir. S9 karışımı varlığında da inhibisyon yüzdeleri oranları baz alındığında 10 mg/plak ve 25 mg/plak derişimlerinde ekstraktlar orta düzeyde antimutajenik aktivite sergilerken 50 mg/plak ve 100 mg/plak derişimlerinde güçlü etkiye sahiptir. Ayrıca S9 karışımı varlığında ya da yokluğunda elde edilen veriler kıyaslandığında S9 karışımı kullanıldığında elde edilen inhibisyon sonuçlarının daha düşük olduğu belirlenmiştir. S9

karışımı varlığında da inhibisyon yüzdeleri oranları baz alındığında 10-100 mg/plak aralığında ekstraktların güçlü antimitojenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca S9 karışımı varlığında ya da yokluğunda elde edilen veriler kıyaslandığında S9(-)'de elde edilen verilerin S9(+)' e kıyasla 1.15 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 2.** *Smilax excelsa* yaprak ekstraktlarının TA 98 ve TA100 üzerine antimitojenik aktiviteleri

*S. excelsa* meyve ekstraktlarının TA 98 ve TA 100 suşu ile gerçekleştirilen antimitojenite test sonuçları Şekil 3'te verilmiştir. Meyve ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA98 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda %91 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde 10-100 mg/plak aralığındaki ekstraktların güçlü düzeyde antimitojenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Meyve ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA100 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında %79 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Meyve ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA100 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda %61 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Doz artışı ile birlikte inhibisyon yüzdesinin de arttığı, 100 mg/ plak ekstrakt ile elde edilen inhibisyon oranının 10 mg/plak dozunda elde edilen orana kıyasla 1.31 kat fazla olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde 10 mg/plak aralığında ekstraktların orta düzeyde antimitojenik aktivite, 25-100 mg/plak aralığında ekstraktların güçlü antimitojenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Meyve ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA100 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında %55 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. S9 karışımı varlığında inhibisyon yüzdeleri oranları dikkate alındığında 10 mg/plak ve 25 mg/plak derişimlerinde ekstraktlar orta düzeyde antimitojenik aktivite sergilerken 50 mg/plak ve 100 mg/plak derişimlerinde güçlü etkiye sahiptir.



**Şekil 3.** *Smilax excelsa* meyve ekstraktlarının TA98 ve TA100 üzerine antimitojenik aktiviteleri

## IV. SONUÇ

Artan sanayileşme ve buna bağlı olarak ortaya çıkan çevre kirliliği göz önünde bulundurulduğunda doğal antimutajenik ve antikanserojenik bileşiklerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Doğal olan bu bileşiklerden en güçlü etkiyi sergileyen türler tespit edilmeli ve bu konudaki çalışmalar hızla arttırılmalıdır. Bu konuda pek çok çalışma bulunmasına rağmen doğal kaynakların çeşitliliği bu çalışmaları yetersiz kılmaktadır. Bu çalışmada *Smilax excelsa* yaprak ve meyve ekstraktlarının anti-mutajenik aktivitesi Ames/Salmonella/Mikrozom testi kullanılarak *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları ile araştırılmıştır. Çalışmada öncelikli olarak doku ekstraksiyonu sonrasında ekstraksiyon verimlilikleri ve sitotoksik doz tespiti yapılmıştır. *Smilax excelsa* yaprak dokuları ekstraksiyonunda en uygun çözücünün metanol, meyve dokularının ekstraksiyonunda en verimli çözücünün ise kloroform olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *Smilax excelsa* meyve dokularının ekstraksiyonunda yaprak dokularına kıyasla daha fazla ekstrakt elde edilmiştir. Dokular arasındaki bu farklılık, yaprak dokularındaki hücre zarı yapısının ekstraksiyona karşı dayanıklı olması ile ilişkilendirilmiştir. Yaprak dokularının metanol ile ekstraksiyonunda elde edilen yüksek verim ile meyve dokularının kloroform ile ekstraksiyonunda elde edilen yüksek verim, dokuların çözgenlere verdiği farklı cevap/geçirgenlik ilişkisi ile açıklanabilir. Ekstraksiyonda etken maddelerin dokulardan çıkarılmasında çözücünün rolü oldukça önemlidir. Etken maddelerin farklı kimyasal yapıda olmaları, farklı polariteye sahip olmaları ve bu nedenle farklı çözücülerle farklı reaksiyon vermeleri ekstraksiyon verimliliğini etkileyen önemli bir faktördür [18]. Polar çözücüler bitkisel dokulardan polifenollerin uzaklaştırılmasında oldukça etkilidir. Bu çalışmada kullanılan aseton, kloroform ve metanol polar çözücülerdendir. Bu nedenle elde edilen ekstraktlarda polifenollerin yüksek oranda bulunduğu söylenebilir. Metanol küçük moleküler ağırlık bileşiklerin ekstraksiyonunda oldukça etkili iken aseton büyük moleküler ağırlıklı bileşiklerin ekstraksiyonunda oldukça kuvvetlidir [19]. Çalışmaların devamında meyve dokularından kloroform ile elde edilen ekstraktlar, yaprak dokularında ise metanol ile elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır.

*S. excelsa* yaprak ekstraktının 100 mg/plak dozunda TA98 ve TA 100 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda sırasıyla %88 ve %79 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. S9 karışımı varlığında ise TA98 ve TA 100 suşları için sırasıyla %81 ve %69 oranında inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Maksimum antimutajenik etki yaprak ekstraktı ile 100 mg/plak dozunda elde edilmiştir. Ayrıca meyve ve yaprak ekstraktlarının her bir dozu için genel olarak S9 yokluğunda, TA 98 suşu ile elde edilen antimutajenik etkinin TA 100 suşuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. *Smilax* türlerine ait yaprak ve meyve özütlerinin pek çok koruyucu etkisi daha önceki çalışmalarda araştırılmıştır. Bu araştırmalar daha çok antimikrobiyal etki ve antioksidan etkiler üzerine olup [20,21], nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisi [22], immün sistemi güçlendirici [23] etkileri üzerine de çalışmalar mevcuttur. *Smilax* türlerine ait dokuların içerdikleri aktif fenilpropanoid glikozid [24], antosiyanin [25], flavanoid glikozid [26], steroidal saponin [27,28] ve fitokimyasal bileşikler [29] nedeniyle antioksidan etki gösterdiği rapor edilmektedir. Ayrıca *Smilax excelsa* türüne ait meyvelerde renk oluşumundan sorumlu likopen de yüksek koruyucu role sahip bir bileşiktir ve bu çalışmada meyve ekstraktlarının sergilediği antimutajenik etki ile ilişkilendirilebilir. Likopen, güçlü bir antioksidandır ve antikarsinojenik/antimutajenik özellikleri bilinmektedir. Likopen ayrıca, antioksidan özelliği nedeniyle hücreleri serbest radikallerin olumsuz etkisine karşı korumakta, hücre-hücre arasındaki iletişimi, bağları güçlendirmekte ve hücre metabolizmasını düzenlemektedir [30]. *Smilax* türlerine ait çeşitli dokularda saponin varlığı bilinmektedir [27,28]. Saponinler yüksek antioksidan aktivitesi sayesinde antimutajenik, antikarsinojenik etki sergilemektedirler. Bitki dokularında bulunan saponinlerin, özellikle böceklere karşı ve çevreden gelebilecek zararlı etkenlere karşı savunmada

kullanıldığı bilinmektedir. Fareler üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada saponin uygulamasının preneoplastik kolon lezyonlarında gerilemeye neden olduğu rapor edilmektedir. Benzer başka bir çalışmada ise ginsenoside-Rb2 ve ginsenoside-Rg3 saponinlerinin tümör metastazını inhibe edici bir özellik sergilediği belirtilmiştir [31-32]. *Smilax* türlerinin rizom, yaprak ve meyve gibi çeşitli dokularında da bulunan hidroksil grubu içeren flavanoidlerin de yüksek antimutajenik aktivite sergilediği belirtilmektedir. Heo ve arkadaşları, flavon ve flavanol türevlerini de içeren 14 flavanoid türünün benzopiren mutajentitesine karşı koruyucu rolü olduğunu belirtmişlerdir [33]. Bitkilerin yaprak, kök, çiçek ve meyve gibi dokularında glikozitler şeklinde bulunan flavonoid çeşitlerinin 2000'den fazla bir sayıda olduğu bilinmektedir [34]. *Smilax* yaprak ve meyve dokuları da çeşitli flavanoid içermektedir [29]. Flavanoidler, antioksidatif etkileri ile serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonu önleyerek kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların önlenmesinde aktif rol almaktadır. Radikal oluşumunda görev alan enzimatik sistemi engellediği, metal iyonlarını bağlayarak lipid oksidasyonunu azalttığı da bilinmektedir. Pek çok çalışmada flavanoidlerin antimutajenik ve antikanserojenik etkilerinin olduğu gösterilmektedir. Bu çalışmada özellikle yaprak ekstraktlarının gösterdiği yüksek antimutajenik etki yaprak özütlerinde bulunan flavanoidlerin aktif etkileri ile açıklanabilir [35].

Bu çalışmada Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren, *Smilax excelsa* yaprak ve meyve ekstraktının antimutajenik aktivitesi Ames/Salmonella/Mikrozom testi kullanılarak *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları ile araştırılmış ve özellikle sıkça gıda maddesi olarak tüketilen yaprak ekstraktlarının yüksek antimutajenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Bununla birlikte sitotoksik doz tespiti sonucunda test edilen dozlarda mutajenik etkinin görülmemesi, *Smilax excelsa* yaprak ve meyve dokularının potansiyel doğal bir antimutajenik kaynak olduğunu göstermektedir.

**TEŞEKKÜR:** Bu çalışma FEN-BAP-A-200515-75 kodlu proje ile Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

## V. KAYNAKLAR

- [1] Ö. Süzer. 3. baskı. Klinisyen Tıp Kitabevleri, İstanbul. (2010).
- [2] C.M. Stein, "Are herbal products dietary supplements or drugs" *Cli. Pharmacol. Therapeutics*. c.71, ss. 411-423,2002.
- [3] Anonim, (16 Ağustos 2010). [Online]. Erişim: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan>.
- [4] L. Iarc, "Monographs on the carcinogenic risks of chemicals to humans. supp. z. Long Term Screening Assays For Carcinogens. A Critical Appraisal, IARC Monographs Supplement" Lyon, International Agency For Research on Cancer. 1980.
- [5] M. Hofnung, P. Quillardet, "Recent developments in bacterial short term tests for detection of genotoxic agents" *Mutagenesis*. c.1, s.5, ss. 319-330, 1986.
- [6] X. Shuo, S. Ming-Ying, L. Guang-Xue, X. Feng, W. Xuan, S. Cheng-Chao, C. Shao-Qing, "Chemical Constituents from the Rhizomes of *Smilax glabra* and Their Antimicrobial Activity" *Molecule*. c.18, ss. 5265-5287, 2013.



- [7] M. C. Navarro, M.P. Montilla, M.M. Cabo, M. Galisteo, A. Cáceres, C. Morales, I. Berger, “Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in izabal for infectious disease. phytotherapy research” *Phytotherapy Research*. c. 17, ss. 325–329, 2003.
- [8] J. Jiang, Q. Xu, “Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats” *Journal of Ethnopharmacology*. c.85, ss. 53–59, 2003.
- [9] T. Chen, J. Li, J. Cao, Q. Xu, K. Komatsu, T. Namba. “A new flavanone isolated from rhizoma *Smilacis glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage” *Planta Medica*. c.65, ss. 56–59, 1999.
- [10] S.E. Lee, E.M. Ju, J.H. Kim, “Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root” *Experimental and Molecular Medicine*. c. 33, ss. 263–268, 2001.
- [11] B.J. Dean, T.M. Brooks, G. Hodsonwalker, D.H. Hutson, “Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals” *Mutat Res*. c. 153, ss. 57-77 (1985).
- [12] A. Uysal, I. Lazarova, G. Zengin, E. Guneş, A. Aktumsek, R. Gevrenova, “New Perspectives on *Asphodeline lutea* from Bulgaria and Turkey: Anti-mutagenic, Anti-microbial and Anti-methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Activity” *Brit J Pharm Res*. c.10, 2016.
- [13] D.M. Maron, B.N. Ames, “Revised methods for the mutagenicity test. “*Mutat. Res*. c.113, ss. 173-215, 1983.
- [14] G. Zengin, A. Uysal, E. Gunes, A. Aktumsek, “of phytochemical composition and biological effects of three extracts from a wild plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch. etMey.): a potential source for functional food ingredients and drug formulations,” *Plos One* c. 9, ss.1-13, 2014.
- [15] K. Schutz, R. Carle, A. Schieber, “*Taraxacum* - A review on its phytochemical and pharmacological profile” *J Ethnopharmacol* c.107, ss. 313-23 (2006).
- [16] J. Yamada, Y. Tomita, “Antimutagenic activity of water extracts of black tea and oolong tea” *Biosci Biotechnol Biochem*. c.58, s.12, ss. 2197-2200, 1994.
- [17] Wu L.S., Wang X.J., Wang H., Yang H.W., Jia H., Jia A.Q., Ding Q, “Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L.” *J Ethnopharmacol*. c.130, ss.460–464, 2010.
- [18] N. Turkmen, F. Sari, Y.S. Velioglu, “Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu Methods” *Food Chem*, c. 99, ss. 835–841, 2006.
- [19] J. Dai, R.J. Mumper, “Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties” *Molecules* c. 15, ss. 7313–7352, 2010.
- [20] H.K. Seo, J.H. Lee, H.S. Kim, C.K. Lee, S.C. Lee, “Antioxidant and antimicrobial activities of *Smilax china* L. leaf extracts” *Food Sci Biotechnol*. c.21, ss. 1723-1727, 2012.
- [21] N. Ozsoy, A. Can, R. Yanardağ, N. Akev, “Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts” *Food Chem*. c.110, ss. 571-583, 2008.
- [22] N. Özsoy, A. Okyar, P. Arda-Pirinçci, A. Can, Ş. Bolkent, N. Akev, “Evaluation of *Smilax excelsa* L. Use in Experimentally Induced Nephrotoxicity” *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. c.(5), ss. 807-814 (2013).

- [23] T. Chen, J. Li, J. Cao, Q. Xu, K. Komatsu, T. Namba, "A new flavanone isolated from rhizoma *Smilacis glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage" *Planta Med.* c.65, ss. 56-59, 1999.
- [24] Y.H. Kuo, Y.W. Hsu, C.C. Liaw, J.K. Lee, H.C. Huang, L.K.J. Kuo, "Cytotoxic phenylpropanoid glycosides from the stems of *Smilax china*" *J. Nat. Prod.* c.68, ss. 1475, 2005.
- [25] L. Longo, G. Vasapollo, "Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries." *Food Chem.* c.94, ss. 226, 2006.
- [26] Y.B Cheng., D.M Zhang, S.S Yu, "Chemical constituents of *Smilax perfoliata*." *Acta Bot Sin.* c.46, ss. 618-620, 2004.
- [27] R.R. Bernardo, A.V. Pinto, J.P. Parente, "Steroidal saponins from *Smilax officinalis*" *Phytochem.* c.43, ss. 465, 1996.
- [28] A. Ivanova, B. Mikhova, I. Klaiber, D. Dinchev, I. Kostova, "Steroidal saponins from *Smilax excelsa* rhizomes" *Nat. Prod. Res.* c.23, ss. 916, 2009.
- [29] A. Ivanova, B. Mikhova, I. Kostova, I. Evstatieva, "Bioactive chemical constituents from *Smilax excelsa*." *Chem Nat Compd.* c.46, ss. 295-297, 2010.
- [30] S.K.Gupta, D. Trivedi, S. Srivastava, S. Joshi, N. Halder, S.D. Verma, "Lycopene Attenuates Oxidative Stress Induced Experimental Cataract Development: An In Vitro And In Vivo Study" *Nutr.* c.19, ss. 794-799, 2003.
- [31] M.A. Lacaille-Dubois, H. Wagner, "A review of the biological and pharmacological activities of saponin." *Phytomed.* c.2, ss. 363-386, 1997.
- [32] R. Koratkar, A.V. Rao, "Effect of soya bean saponins on azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the colon of mice" *Nutr Cancer.* c.27(2), ss. 206-209, 1997.
- [33] M.Y. Heo, K.S. Yu, K.H. Kim, H.P. Kim, W.W. Au, "Anticlastogenic effect of flavonoids against mutagen-induced micronuclei in mice" *Mutat. Res.* c.284, ss. 243-249, 1992.
- [34] F. Shahidi, M. Naczk. *Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications.* Technomic, USA, 1995.
- [35] R. Edenharder, X. Tang X, "Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds." *Food Chem. Toxicol.* c.35, ss. 357-372, 1997.