

**BAZI BİTKİSEL ÖSTROJENLERİN *Drosophila melanogaster*'DE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ ve FOLİK ASİT KULLANILARAK BU
ETKİLERİN İYİLEŞTİRİLMESİ ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR**

Hakan AŞKIN

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Handan UYSAL

2009

Her Hakkı Saklıdır.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI BİTKİSEL ÖSTROJENLERİN *Drosophila melanogaster*'DE
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ ve FOLİK ASİT
KULLANILARAK BU ETKİLERİN İYİLEŞTİRİLMESİ ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR

Hakan AŞKIN

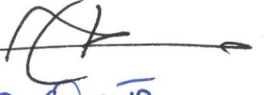
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2009

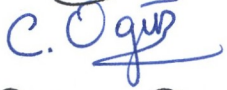
Her Hakkı Saklıdır.

Yrd. Doç. Dr. Handan UYSAL danışmanlığında, **Hakan AŞKIN** tarafından hazırlanan bu çalışma, **02/02/2009** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Mehmet Cemal OĞUZ

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Rüstem HAYAT

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Bülent KAYA

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Handan UYSAL

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ömer AKBULUT
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI BİTKİSEL ÖSTROJENLERİN *Drosophila melanogaster*'DE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ ve FOLİK ASİT KULLANILARAK BU ETKİLERİN İYİLEŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Hakan AŞKIN
Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Handan UYSAL

Bu çalışmada, insan ve hayvanların beslenmesinde kullanılan doğal ve kültüre alınmış bitkilerde biyolojik etkileri birbirine benzeyen 6 farklı bitkisel östrojenin (genistein, daidzein, glisitein, koumestrol, kuersetin ve zearalenone) olası genotoksik etkileri ile folik asidin antimutajenik etkileri *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırıldı. Deneylerimizin tümünde *Drosophila melanogaster*'in *mwh/flr³* genotipine sahip 72±4 saatlik trans-heterozigot larvaları kullanıldı. Larvalar, bitkisel östrojenlerin farklı dozlarını içeren *Drosophila* instant medium ile kronik olarak beslendi. Kullanılan bitkisel östrojenlerin etkileri, uygulama sonunda larvalardan çıkan ergin sineklerin kanat imajinal disk hücrelerindeki genetik değişimler (nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama, rekombinasyon) sonucunda oluşan mutant trikomlara göre değerlendirildi. Mutant trikom değerlendirmeleri, küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon, toplam mwh ve toplam klon sınıflandırmaları esas alınarak yapıldı.

Genotoksik etkileri araştırılan 6 bitkisel östrojenin her birisi için dört doz çalışıldı. Bu dozların genotoksik etkilerini belirlemek için 1, 2, 5 ve 10 mM dozlar kullanıldı. Ancak, genistein, daidzein, kuersetin ve zearalenonun yüksek dozlarda (özellikle 5-10 mM) *Drosophila* larvalarına toksik etki göstermesi ve bundan dolayı bu dozlar da birey elde edilemediği için uygulamalar daha seyreltik dozlar olan 1, 3, 5 ve 10 µM'lık bir seri halinde uygulandı.

Çalışmamızın ikinci aşamasında tüm bu bitkisel östrojenlerin en yüksek dozu olan 10 µM ile birlikte folik asidin 10 µM dozu larvalara aynı besi ortamında uygulandı. Hem bitkisel östrojen, hem de bitkisel östrojen + folik asit uygulama grupları ayrı ayrı olmak üzere, elde edilen bireylerin kanat preparatları *mwh/flr³* (normal kanat fenotipi) genotipi ve *mwh/TM3* (serrat kanat fenotipi) genotipi için ayrı ayrı 40 kanat çifti olacak şekilde hazırlandı.

Uygulamalar sonucunda, glisitein ve koumestrol tüm dozlarda genotoksik açıdan negatif ya da önemsiz genotoksiste, diğer dört bitkisel östrojen ise doz artışına bağlı olarak genellikle pozitif genotoksiste gösterdi. Normal kanat fenotipi için toplam mutasyon frekansına bakıldığında, genotoksiste sırası kuersetin (%0.89), zearalenon (%0.64), genistein (%0.58) ve daidzein (%0.53) olarak belirlendi.

Bu çalışmada kullanılan bitkisel östrojenlerin negatif ya da pozitif genotoksik etkileri belirlenerek folik asidin bu etkilere karşı anti-genotoksik olduğu tespit edildi.

2009, 115 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, bitkisel östrojenler, folik asit, SMART, genotoksiste ve anti-genotoksiste

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE DETERMINATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF SOME PHYTOESTROGENS ON *Drosophila melanogaster* and STUDIES ON THE IMPROVEMENT OF THESE EFFECTS BY USING FOLIC ACID

Hakan AŞKIN
Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Handan UYSAL

In this study, the potential genotoxic effects of six different phytoestrogens (genistein, daidzein, glisitein, koumestrol, quercetin and zearalenone) whose biological effects bear similarities in natural and cultured plants which are used in feeding animals and human beings, and antimutagenic effects of folic acid were researched via using *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test (SMART). In the experiments, larvae of 72 ± 4 hours trans-heterozygote which have the *mwh/flr³* genotype of *Drosophila melanogaster*, were used. The larvae were fed chronically with *Drosophila* instant medium containing different concentrations of phytoestrogens. The effects of phytoestrogens used were evaluated considering the mutant trichomes. These trichomes came into being as a result of the genetic changes (point mutation, deletion, non-disjunction, and recombination) on the wing imaginal disc cells of the mature flies emerging from the larva after the experiment. The evaluations of mutant clones were done based on small single, large single, twin, total mwh and total spot classifications.

We worked on four concentrations of each of the 6 phytoestrogens whose genotoxic effects were researched. In order to determine the genotoxic effects of these doses in a wider spectrum we used concentrations of 1, 2, 5 and 10 mM. However since genistein, daidzein, quercetin and zearaleon cause toxic effects on *Drosophila* larvae at high concentrations (especially 5-10 mM) and as individuals can not be obtained in these concentrations, the experiments were carried out at a serial of 1, 3, 5 and 10 μ M concentrations which are more diluted.

In the second stage of our study, we applied by far the highest dosage of these phytoestrogens, which is 10 μ M, together with the 10 μ M dosage of folic acid on the larva in the same feeding environment. The wing preparates of the obtained individuals were prepared as 40 wing couples respectively for *mwh/flr³* (normal wing phenotype) and *mwh/TM3* (serrat wing phenotype) genotype. As a result of the applications glisitein and koumestrol yielded in all concentrations either negative or inconclusive genotoxicity in terms of genotoxic. However the other four phytoestrogens on the whole showed positive genotoxicity depending on the increase in concentration. With regard to the total mutation frequency for normal wing phenotype the order of the genotoxicity was: quercetin (0.89%), zearalenon (0.64%), genistein (0.58%), and daidzein (0.53%). The negative or positive genotoxic effects of the plant estrogens used in this study were determined and it was found out that folic acid is anti-genotoxic against these effects.

2009, 115 pages

Keywords: *Drosophila melanogaster*, phytoestrogens, folic acid, SMART, genotoxicity and anti-genotoxicity

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yapılmış ve Atatürk Üniversitesi Fon Saymanlığı tarafından desteklenen BAP–2006/42 nolu “Çeşitli mikotoksinlerin *Drosophila melanogaster* üzerine mutajenik etkilerinin SMART (Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Test) yöntemi ile Belirlenmesi” adlı projenin bir kısmını oluşturmaktadır.

Çalışmalarında her türlü desteği sağlayan çok değerli Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Handan UYSAL’a (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Başta Bölüm Başkanımız Hocam Sayın Prof. Dr. Ö. Faruk ALGUR’a (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Deniz ALTUN ve Sayın Arif AYAR’a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, çalışmalarım sırasında çeşitli öneriler ve katkılarından dolayı Hocam Sayın Doç. Dr. Bülent KAYA (Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve Sayın Arş. Gör. Serap KOCAOĞLU’na da (Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında destek ve teşviklerini esirgemeyen eşime de teşekkür ederim.

Hakan AŞKIN

Ocak 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER SİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Bitkisel Östrojenler	1
1.1.1. Bitkisel östrojen kaynakları	3
1.1.2. Bitkisel östrojenlerin analizi	4
1.1.3. Bitkisel östrojenlerin biyosentezi	5
1.1.4. Bitkisel östrojenlerin etki mekanizması	6
1.1.5. Bitkisel östrojenlerin metabolizması	6
1.1.6. Bitkisel östrojenlerin kanser, osteoporoz ve hayvanlarda infertilite problemleri üzerine etkileri	7
1.1.7. Bitkisel östrojenlerin mutajenik, klastojenik ve genotoksik etkileri	9
1.1.8. Bitkisel östrojenlerin sınıflandırılması	10
1.1.9. Flavonoidler	11
1.1.9.a. İzoflavonlar	12
1.1.9.b. Koumestanlar	18
1.1.9.c. Prenil Flavonoidler	18
1.1.10. Non-Flavonoidler	18
1.1.10.a. Lignanlar	19
1.1.10.b. Mikoöstrojenler	20
1.1.11. Diğer bitkisel östrojenlerden galangin, kaempferol ve fisetinin genel özellikleri	21
1.1.12. Folik asit- folasin (pteroglutamik asit)	23
1.1.12.a. Folik asit'in fonksiyonları	26
1.1.12.b. Folik asit yetersizliği ve hastalıklarla ilişkisi	28
1.2. Toksisite ve Genotoksisite	28

1.2.1. Genetik toksikolojide kullanılan testler	29
1.2.2. <i>Drosophila</i> 'da mutasyon test sistemleri	30
2. KAYNAK ÖZETLERİ	31
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	42
3.1. Materyal	42
3.1.1. Kullanılan organizma ve test ile ilgili genel bilgiler	42
3.1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in sistematigi	43
3.1.3. <i>Drosophila</i> 'nın hayat döngüsü.....	44
3.1.4. <i>Drosophila</i> 'yı diğer organizmalara göre üstün kılan özellikleri	44
3.1.5. <i>Drosophila</i> mutant stokları ve kullanılan hatların genetik yapısı	47
3.1.6. Bitkisel östrojenler	49
3.2. Yöntemler	49
3.2.1. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)	49
3.2.2. Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi	50
3.2.3. Deney grupları	53
3.2.4. <i>Drosophila</i> hatlarının kültürü	53
3.2.5. Çaprazlama için birey seçimi	53
3.2.6. Bitkisel östrojenlerin uygulanması	55
3.2.7. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması	56
3.2.8. Kanat preparatlarının mikroskop analizi	57
3.2.9. Klon indüksiyon frekansı ve rekombinasyon miktarının hesaplanması	58
3.2.10. Verilerin değerlendirilmesi	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	62
4.1. <i>Drosophila</i> Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular	62
4.1.1. Distile su, DMSO ve EMS'nin genotoksik etkisinin araştırılması	65
4.1.2. Genistein'in genotoksik etkisinin araştırılması	65
4.1.3. Daidzein'in genotoksik etkisinin araştırılması	68
4.1.4. Glisitein'in genotoksik etkisinin araştırılması	70
4.1.5. Koumesterol'ün genotoksik etkisinin araştırılması	72
4.1.6. Kuersetin'in genotoksik etkisinin araştırılması	72
4.1.7. Zearalenon'un genotoksik etkisinin araştırılması	75

4.1.8. Folik asit'in etkisinin araştırılması	77
4.1.9. Folik asit + bitkisel östrojenlerin birlikte trans-heterozigot larvalara uygulanması	77
4.1.9.a. Folik asit + bitkisel östrojenlerin <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/flr³</i> hatlarına anti-genotoksik etkisinin araştırılması	78
4.1.9.b. Folik asit + bitkisel östrojenlerin <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/TM3</i> hatlarına anti-genotoksik etkisinin araştırılması	81
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	84
KAYNAKLAR	99
EKLER	114
EK 1	114
EK 2	115
ÖZGEÇMİŞ	116

SİMGELER DİZİNİ

α	: Alfa
Bd ^s	: Beaded Serrat
β	: Beta
⁰ C	: Santigrat Derece
DMSO	: Dimetil Sülfooksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DZ	: Daidzein
EMS	: Etil Metan Sülfonat
FA	: Folik Asit
<i>flr</i> ³	: Flare geni
GL	: Glisitein
GN	: Genistein
g	: Gram
kg	: Kilogram
KM	: Koumestrol
KS	: Kuersetin
LD ₅₀	: Canlının % 50'sini Öldüren Doz
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
<i>mwh</i>	: Multiple Wing Hair geni (Çoklu kanat kılı geni)
μ g	: Mikrogram
ppb	: Milyarda bir kısım
ppm	: Milyonda bir kısım
RNA	: Ribonükleik asit
SCE	: Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)
SDB	: Standart <i>Drosophila</i> Besiyeri
SMART	: Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
<i>TM3</i>	: Dengeleyici kromozom
ZN	: Zearalenone

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Flavonoidlerin kimyasal yapısı	3
Şekil 1.2. Genistein'in biyosentez yolu	5
Şekil 1.3. Bitkisel östrojenlerin sınıflandırılması	10
Şekil 1.4. Genistein'in kimyasal yapısı	14
Şekil 1.5. Daidzein'in kimyasal yapısı	15
Şekil 1.6. Glisitein'in kimyasal yapısı	16
Şekil 1.7. Kuersetin'in kimyasal yapısı	16
Şekil 1.8. Equol'ün kimyasal yapısı	17
Şekil 1.9. Biochanin A'nın kimyasal yapısı	17
Şekil 1. 10. Koumestrol'ün kimyasal yapısı	18
Şekil 1.11. Lignanların kimyasal yapıları	19
Şekil 1.12. Enterodiol'ün (1) ve Enterolakton'un (2) kimyasal yapısı	20
Şekil 1.13 Zearalenon'un kimyasal yapısı	21
Şekil 1.14 Galangin'in kimyasal yapısı	22
Şekil 1.15 Kaempferol'ün kimyasal yapısı	22
Şekil 1.16 Fisetin'in kimyasal yapısı	23
Şekil 1.17 Folik asit'in kimyasal yapısı	24
Şekil 1.18 Diyet folat'ın emilimi ve taşınması	25
Şekil 3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü	45
Şekil 3.2. <i>Drosophila</i> 'da normal ve serrat kanat fenotipleri	48
Şekil 3.3. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri	48
Şekil 3.4. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi	51
Şekil 3.5. Tekli ve ikili beneklerin oluşumuna neden olan farklı genetik mekanizmalar	54
Şekil 3.6. <i>mwh/mwh</i> ve <i>flr³/TM3, Bd^s</i> bireyleri arasındaki çaprazlamalar	55
Şekil 3.7. Kanat sektörlerinin şematik görünümü	58
Şekil 4.1. <i>mwh</i> fenotipi	63
Şekil 4.2. <i>mwh</i> fenotipindeki küçük tekli benek	63
Şekil 4.3. <i>mwh</i> fenotipindeki büyük tekli benek	63

Şekil 4.4. <i>flr</i> fenotipindeki büyük tekli benek	64
Şekil 4.5. İkili benek(a)	64
Şekil 4.6. İkili benek(b)	64
Şekil 4.7. Genistein, daidzein, kuersetin ve zearalenonun yüksek derişimlerden etkilenen larva ve pupalar	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yiyeceklerde bulunan bitkisel östrojenlerin miktarları.....	4
Çizelge 3.1. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi	60
Çizelge 4.1. Distile su, EMS ve DMSO'nun <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3</i> hatlarına etkileri	66
Çizelge 4.2. Genistein'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3</i> hatlarına etkileri	67
Çizelge 4.3. Daidzein'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3</i> hatlarına etkileri	69
Çizelge 4.4. Glisitein'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3</i> hatlarına etkileri	71
Çizelge 4.5. Koumestrol'ün <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3</i> hatlarına etkileri	73
Çizelge 4.6. Kuersetin'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3</i> hatlarına etkileri	74
Çizelge 4.7. Zearalenon'un <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3</i> hatlarına etkileri	76
Çizelge 4.8. Folik asit'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/flr³</i> hatlarına anti- genotoksik etkileri	80
Çizelge 4.9. Folik asit'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in <i>mwh/TM3</i> hatlarına anti- genotoksik etkileri	83

1. GİRİŞ

1.1. Bitkisel Östrojenler

Bitkisel östrojenler (fitoöstrojen), farklı kimyasal formları olan ve östrojen reseptörlerine bağlanarak etki gösteren maddelerdir. İnsan ve hayvanların beslenmesinde kullanılan doğal ve kültür bitkileri ile tohumlarda biyolojik etkileri birbirine benzeyen çok sayıda doğal bitkisel kökenli östrojenik madde bulunmaktadır. Colborn *et al.* (1996), yaklaşık 300 farklı bitkiden elde edilen ve içerisinde bitkisel östrojenlerin de bulunduğu 20 farklı maddeyi bildirmişlerdir. Bu bitki ve tohumlar; keten, balkabağı, susam, ayçiçeği tohumu ile sert kabuklu yemişler (badem, fındık, yerfıstığı, ceviz ve bunların yağı), rafine edilmemiş tahıllar (özellikle de mısır, karabuğday, darı, yulaf, arpa, çavdar, buğday), taze meyveler (elma, muz, kivi), kurutulmuş meyveler (özellikle kalsiyumca zengin olan hurma, incir, erik, üzüm), sebzeler (brokoli ve ıspanak gibi koyu yeşil yapraklı sebzeler, kereviz, rezene), baklagillerden soya fasulyesi ve mercimek, pişirmelik otlar (özellikle sarımsak, zencefil, maydanoz, biberiye, adaçayı, ısırgan otu)dır. Ayrıca, özellikle yabani çiçeklerinden yapılmış olan bal, arı poleni ve arı sütünde de bitkisel kökenli östrojenik maddeler bulunmuştur. Bu östrojenik maddeler ise izoflovanlar (genistein, glisitein, bichanin A, prunetin, daidzein ve formononetin), triterpenler, stilbenler, fenantrenler, steroidler, kumestanlar (coumestrol, 4-o-methylether), galangin ve acı asitler olarak sıralanmaktadır. Yaklaşık 50-60 yıldan beri varlığı bilinen ve fitohormon olarak da adlandırılan bitkisel östrojenler hakkında ilk kez 90'lı yıllarda bilimsel yazılar kaleme alınmıştır. Ancak, bitki bünyesinde üretilen bitkisel östrojenler, gıda olarak tüketilebilen çeşitli bitki türlerinde az miktarda bulunurken soya ve keten tohumunda bol miktarda tespit edilmiştir (Colborn *et al.* 1996).

Fitohormon içeren bitki özütleri birçok hastalığın tedavisinde (=alternatif tıpta) kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bitkisel östrojenlerin sağlık üzerindeki olumsuz etkileri göz ardı edilmiştir. Hücre sistemleri üzerinde pro-apoptotik etkili

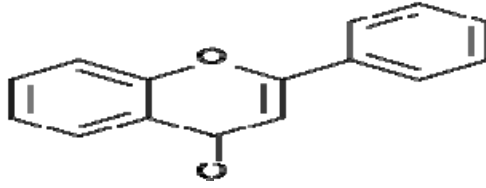
(programlanmış hücre ölümü) olan bitkisel östrojenlerin bazılarının *in vitro* şartlarda genotoksik etkili, bazılarının ise daha zayıf veya hiç etkili olmadığı gösterilmiştir (Stopper *et al.* 2005). Bazı araştırmacılar, östrojenik bileşiklerin karsinojenik olabileceğini de ileri sürmektedir (Schlumpf and Lichtensteiger 1996). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu konular üzerinde yoğunlaşmıştır. Hem sentetik östrojen olan diethylstilbestrol, hem de memeli östrojeni 17 β -estradiol insanlarda kanser ile ilişkilidir. Bu iki östrojen *in vitro* ve *in vivo*'da DNA hasarlarına neden olmaktadır (Roy and Liehr 1999).

Bitkisel östrojenlerin aşırı miktarlarda (rasyonun %100) tüketilmesi, bazı sağlık problemlerini birlikte getirmektedir. Örneğin; yüksek miktarda bitkisel östrojen içeren *Ferula communisin*'in bir varyetesi olan *Brevifolia* koyunlara (2,5 g/kg-1 canlı ağırlık) verildiğinde, zehirleyici ve kanda pıhtılaşmayı önleyici etkiler göstermiştir (Lamnaouer 1999). Bitkisel östrojenlerin bir başka etkisi de yumurtalıklardaki programlanmış hücre ölümünü (apoptosis) azaltmasıdır (Billing *et al.* 1993). Bu, ovulasyon oranının artmasına sebep olabilmektedir. Ayrıca, bir başka çalışmada (Prakash *et al.* 1991) *Ferula jeschkeana* (çakşır) ekstraktları tavşanlara aşılanmış ve folliküler gelişme üzerine olumsuz etkileri olduğu rapor edilmiştir.

Bitkisel östrojenlerin başlıca özellikleri şunlardır;

1. Bitkisel östrojenler gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirler.
2. Ateş basması, sıkıntı ve benzeri menopoza şikâyetlerinde alternatif olarak kullanılabilirler.
3. Bitkisel östrojenlerin uzun yıllardan beri sık kullanıldığı Doğu Asya ülkelerindeki kadınlarda kalp hastalıklarının, kemik erimesinin, unutkanlık ile bunamanın, meme, barsak ve rahim kanserinin daha az olduğu ve bu kadınların menopoza dönemini daha az şikâyetler ile atlattıkları bilinmektedir. Uzun yaşamanın sırrının bu fitoöstrojenlerde saklı olduğunu iddia eden merkezler de bulunmaktadır.
4. Bilinen bir diğer etkileri de antibakteriyel ve antivirütik etkileri ile hastalıklara karşı vücut direncini artırmaları ve hastalıklara karşı koruma sağlamalarıdır.

5. Fitoöstrojenler, östrojen benzeri bir kimyasal yapıya sahip olup β reseptörlere bağlanarak hormon benzeri etki gösterirler. Ancak, etkileri normal östrojene nazaran oldukça zayıftır. Bitkisel östrojenlerin çoğu $C_6C_3C_6$ karbon iskeleti tarafından karakterize edilen flavonoidler sınıfına aittir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

1.1.1. Bitkisel östrojen kaynakları

Fitoöstrojenlerin kaynakları 3 grupta toplanabilir;

1. Tabii olarak oluşan steroidal ve non-steroidal bitkisel östrojenler.
2. İnsan ve hayvan kaynaklı steroidal östrojenler (17- β -östrodiol, östron sülfat gibi).
3. Mikotoksin, zearalenone, zearalenol gibi fungal atak sonucu oluşan östrojenik aktiviteli bileşikler.

Farklı gruplarda ele alınan fitoöstrojenlerin, herbirinin yoğun olarak bulundukları besin kaynakları farklılık göstermektedir. İzoflavonların en iyi kaynağı Leguminosae ailesine ait bitkilerden kurubaklagiller (bezelye, fasulye, mercimek vb.), özellikle de soya fasulyesidir. Ancak, Graminae, Rosaceae (*Prunus sp.*), Iridaceae (*Iris sp.*) ve Solanaceae (*Nicotiniana tabacum*) türlerinde de bulunmaktadır. Bugün en çok kullanılan izoflavon kaynakları soya fasulyesinin işlenmesi ile elde edilen çeşitli ürünler olup, bunların başında soya unu, soya protein izolatları, tofu, soya sütü, soya yoğurdu ve soya şehriyesi gelir. Soya ürünleri dışındaki kaynaklar diğer kurubaklagiller, tam tahıl ürünleri ve kırmızı yonca otlarıdır. Çalışmalar kuş üzümü ve kuru üzüm gibi küçük taneli meyvelerin ve soya unu içeren tahıl ürünlerinin de iyi fitoöstrojen kaynakları

olduğunu göstermektedir. Uzakdoğuda sıklıkla tüketilen fermente soya ürünlerinin (miso, tempeh) izoflavon içeriği zengindir. Çünkü fermentasyon süresince mikroorganizmalar izoflavonların β -glukozit bağını kopararak glukozit yapılarının aglikonlara dönüşmesini sağlar. Bu durum serbest formdaki bileşiklerin konsantrasyonunu ve biyoyararlılığını artırabilmektedir. Soya fasulyesinden elde edilen soya yağı ve sosu, eser miktarda izoflavon içerirken, soya ve ürünlerinin izoflavon içeriğinin genel olarak 1-3mg/g arasında değiştiği bilinmektedir (Büyüktuncer ve Başaran 2005). Çizelge 1.1’de bazı yiyeceklerde bulunan bitkisel östrojen miktarları görülmektedir.

Çizelge 1.1. Yiyeceklerde bulunan bitkisel östrojenlerin miktarları

Yiyecek	Bitkisel östrojenler (mg/kg taze ağı.)
Keten tohumu	600
Soya fasulyesi	1800
Tofu, tempeh, miso, natto*	2400
Soya fasulyesi unu	1300-1650
Soya fasulyesi sütü	450
Soya sosu	150
Yer fıstığı	2
Esmer pirinç	3
Buğday	5
Çavdar ekmeği	12
Kurutulmuş mercimek	18
Kurutulmuş fasulye	10-70
Taze meyve ve sebze	2

* Tofu, tempeh, miso, natto Uzakdoğu’da soyadan elden edilen geleneksel yiyeceklerin ticari isimleridir.

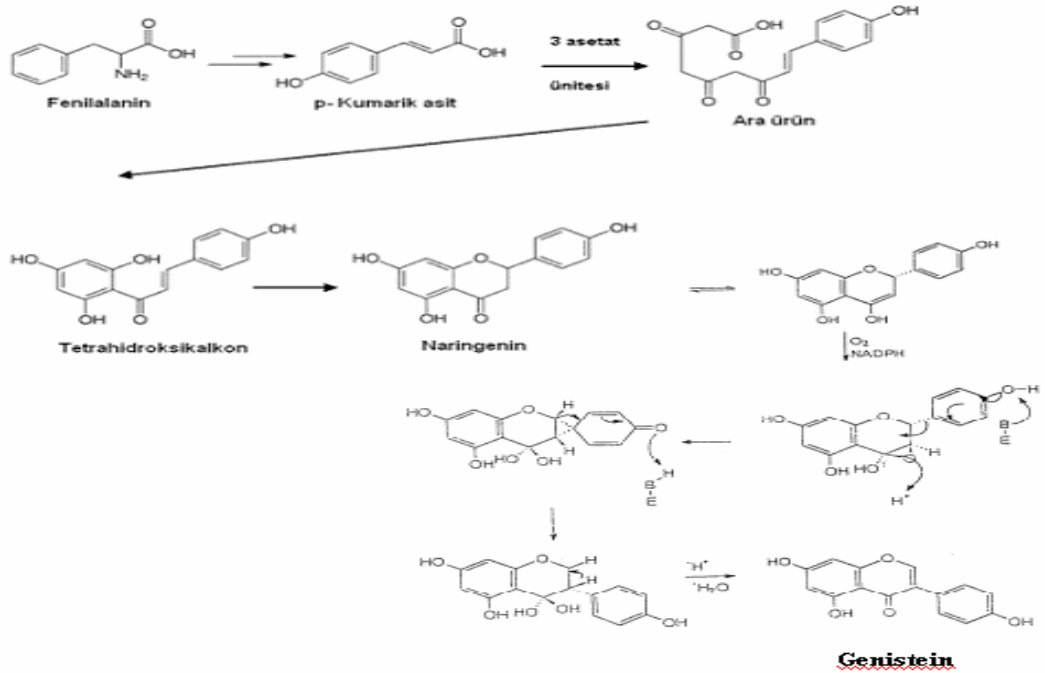
1.1.2. Bitkisel östrojenlerin analizi

Bitki, besin ve biyolojik sıvılardaki fitoöstrojenlerin, özellikle izoflavonların miktar tayinlerinde kromatografik yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanı

yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC). Diğer yöntemler, gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografi-kütle spektroskopisi (GC-MS), ince tabaka kromatografisi (IC) ve kâğıt kromatografisi şeklinde sıralanabilir (Reinli and Block 1996).

1.1.3. Bitkisel östrojenlerin biyosentezi

Sikimat-asetat yolunun son ürünü olan fenilalanin, sinamik asite ve daha sonra okside olarak p- kumarik asite dönüşür. p- kumarik asit, 3 asetat ünitesiyle kondansasyona uğrayarak A halkasını oluşturup, tetrahidrokalkona dönüşecek olan ilk ara ürünün oluşmasını sağlar. Diğer kapalı halka yapısı (C halkası) oluştuğunda, bir flavonon olan naringenin meydana gelir. Bundan sonra flavonlar arasında değişik formlar oluşur (Şekil 1.2) (Jensen and Schripsema 2002). Flavonon oluşumundan sonra izoflavonların oluşum mekanizması iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta, bir flavonon enol formunun oksidasyonu ve rearanjmanı; ikinci basamakta, su molekülünün eliminasyonu sonucu izoflavon molekülü oluşur.



Şekil 1.2. Genistein'in biyosentez yolu

1.1.4. Bitkisel östrojenlerin etki mekanizması

Steroidal olmayan bitkisel östrojenlerin etki mekanizmaları karmaşıktır. Biyolojik çevreye ve kimyasal yapılarına bağlı olarak fitoöstrojenler, ya östrojenler gibi ya da antiöstrojenler gibi fonksiyon yapabilirler. Örneğin, dolaşımdaki östrojen seviyeleri yüksek olan premenopozal kadınlarda, fitoöstrojenler antiöstrojenler gibi etkilidirler. Bu durum, reseptör bölgeleri için daha büyük bir afiniteye sahip olan endojen östrojenler ile reseptör bölgelerine zayıf bir şekilde bağlanan fitoöstrojenlerin östrojen reseptörleri üzerindeki bir bölge için yarışmalarından kaynaklanır. Diğer taraftan, endojen östrojenlerin düşük seviyelerine sahip olan postmenopozal kadınlarda fitoöstrojenler östrojen gibi fonksiyon yapar. Fitoöstrojenler, östrojen reseptör bölgelerine zayıf bir şekilde bağlanmalarına rağmen, dolaşımda bulunan diğer östrojenler çok az olduğundan östrojen reseptörlerine daha iyi bağlanır. Fitoöstrojenlerin etki mekanizmalarını dört kısma ayırmak mümkündür.

1. Östrojen reseptörlerini aktive ederek (steroidler gibi) protein sentezi yaparlar.
2. Uterusta bulunan östrojenleri bağlayıp parçalayan uterin peroksidaz enzimini inhibe ederek östrojenik aktiviteyi arttırırlar.
3. Steroidal östrojenler gibi bifazik etkileri vardır. Düşük konsantrasyonda stimülasyon, yüksek konsantrasyonda inhibisyona neden olurlar.
4. Bazı bitkisel östrojenler de rhizobiumdaki nodülasyon genini indüklemeye yeteneğine sahiptir.

1.1.5. Bitkisel östrojenlerin metabolizması

İzoflovanların emilimi hakkındaki çalışma sonuçları kesin değildir. Genel olarak, flavonoidlerin (örneğin, kuersetin) konjuge formu ankonjuge formundan daha iyi emilir. İnce ve muhtemelen kalın barsaklarda absorpsiyondan sonra, izoflavonlar sülfatlar ve glukuronidlerle rekonjuge edilir ve daha sonra idrarla veya safrayla atılır. Koyunların rumeninde daidzein, equole dönüşür. Equolün koyunlarda yonca hastalığından sorumlu

östrojenik ajan olduğu gösterilmiştir (Shutt and Cox 1972). Bununla birlikte, genistein inaktif bir bileşik olan p-ethylphenole metabolize olur. İnsan idrarında da bulunan genisteinin metabolik olarak oldukça aktif bir bileşik olma ihtimali vardır.

1.1.6. Bitkisel östrojenlerin kanser, osteoporozis ve hayvanlarda infertilite problemleri üzerine etkileri

Mide ve barsak mikroflorası tarafından bitkisel prokürsörlerinden oluşturulan izoflovonoid fitoöstrojenlerin, belirli kanser türlerine karşı koruma sağlayabileceği bildirilmektedir (Adlercreutz 1995). Bunların sahip olduğu pek çok biyolojik etki kanseri önleyici ajan olarak fitoöstrojenleri önemli hale getirir. Fitoöstrojenlerin antiviral, antiproliferatif ve hücre büyümesini önleyici etkileri vardır (Bingham *et al.* 1998). Tüm bitkisel östrojen bileşikleri zayıf östrojeniktirler ve steroid hormonlarla çeşitli enzimler ve reseptör bölgeleri için yarışırılar. Fitoöstrojenlerin plazmada oluşan serbest östrojen miktarını azaltarak karaciğerde cinsiyet hormonu bağlayan globulinin (SHBG) yapımını uyardığı da tespit edilmiştir (Adlercreutz *et al.* 1992). Bu yolla izoflovonoidlerin steroid hormon metabolizmasını değiştirebileceği ve hormona bağlı kanser hücrelerinin büyümesini ve proliferasyonunu inhibe ederek kanser riskini azaltabileceği bildirilmektedir (Adlercreutz 1995).

Hayvanlarda soya fasulyesi ürünlerinin kimyasal karsinojenlerle oluşturulan tümörleri azalttığı bildirilmiştir. Genellikle antikanserojen etki, izoflavonların antiöstrojenik özelliklerine bağlanmaktadır (Lamartiniere *et al.* 1995). Fakat izoflavonların antiöstrojenik özellikleri ile ilgili olmayan birçok antikarsinojenik özellikleri mevcuttur. Örneğin, genisteinin fosforilasyon proteinlerinden sorumlu trozinkinazları inhibe ettiği, bu nedenle pek çok hücre membranında büyümeyi önlediği gösterilmiştir. Genisteinin aynı zamanda DNA tamir enzimi olan topoizomerazı inhibe ettiği ve bir antioksidan gibi etki ederek oksidatif DNA bozulmasını potansiyel olarak önlediği bildirilmiştir (Peterson 1995). Genisteinin hücrede koruyucu bir mekanizmayı uyarak kanser hücresi veya zararlı mutasyonların çoğalmasını önlemek için hücre ölümünü programladığı gösterilmiştir (Pagliacci *et al.* 1994).

Osteoporozis, şekil aynı kalmak koşulu ile kemik miktarının her ünite hacminde bir azalma olarak açıklanır. Daha çok hormonlar bu hastalığı etkiler. Fitoöstrojenlerin hormonal etkileri soya fasulyesi tüketen Uzakdoğu toplumlarında hastalığın daha nadir olması ile birleştirildiğinde, osteoporozisteki etkilerinin araştırılmasını da hızlandırmıştır (WHO 1994).

Fitoöstrojenler, östrojen reseptör kompleksine bağlanmalarına rağmen, östrojen reseptörlerinin tamamen doldurulması ve protein sentezi gibi tüm östrojenik cevapları oluşturmada başarısızdırlar. Bu nedenle, östradiol antagonistleri olarak karakterize edilirler. Fitoöstrojenlerin zayıf östrojenik olduklarına dair pek çok *in vitro* çalışma yapılmıştır. Bunlar düşük derecede memeli östrojen reseptörlerine bağlanma kabiliyetindedirler. Fitoöstrojenlerin reseptör afiniteleri östradiol ile karşılaştırıldığında, koumesterol, östradiolden sadece 10 ila 20 kat daha düşük reseptör afinitesine sahipken genisteinin, 100 kat daidzeinin ve equolün ise 1000 kat daha az reseptöre bağlanma afinitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Tang and Adams 1980). Fitoöstrojenler çok fazla tüketilirlerse gonadotropin salınımının feedback sistemine karışabilir ve bu da hayvanlarda fertilitate problemlerine neden olabilir (Whitten *et al.* 1993). İnfertileden sorumlu yonca östrojenlerinin biyolojik etkileri çok yönlü gözükmektedir. Sperm ve ovum taşınmasında aksaklıklar, ovum implantasyonunda interferens, premature korpus luteum regresyonu, endometrial bezlerin kistik hiper plazisi, uterus prolapsusu, maternal distosia ve ayrıca uzun süreli aynı yönde beslenme dönüşü olmayan steriliteye neden olabilir (Huges 1988).

Fitoöstrojenler, hipotalamusta endojen östradiolün pozitif feedback etkisiyle gonadotropin sekresyonunu baskılayabilir. Bu nedenle, bu tür bitkisel östrojenlerin çok bulunduğu otlaklarda otlayan koçlarda laktasyon görülmüştür. Ayrıca, erkek üreme bezlerinde metaplazi, daha sonraları bulbo-üretral bezlerde genişleme, seminal dejenerasyon ve üriner retensiyon tespit edilmiştir (Whitten and Naftolin 1992).

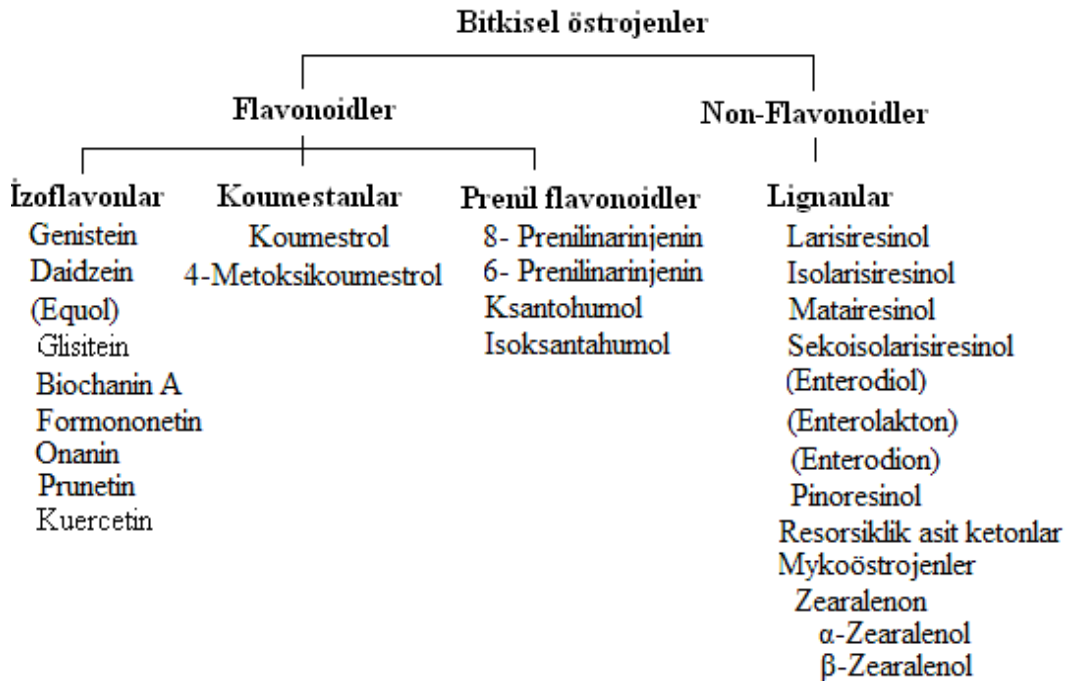
1.1.7. Bitkisel östrojenlerin mutajenik, klastojenik ve genotoksik etkileri

Epidemiyolojik veriler, bitkisel östrojenlerin tüketiminin özellikle hormona bağlı olarak oluşan hastalıklarda bir miktar koruma sağladığını göstermektedir. Bu durum beslenme alışkanlıkları düzenli olmayan toplumlarda bu östrojenik etkili maddeleri içeren besin maddelerinin aşırı bir şekilde tüketilmesine neden olmuştur. Bu aşırı tüketim sonucu oluşan bazı istenmeyen sonuçlar üzerine, bilim adamları bu maddelerin gerçekten tamamen faydalı olup olmadığı sorusu ile ilgilenmeye başlamışlardır. Bitkisel östrojenler ile yürütülen ilk çalışmalar, tümüyle bu maddelerin insan sağlığı üzerindeki faydalarını gösterme amacını taşımaktaydı. Ancak, günümüzde bu maddelerin bazı durumlarda faydalı olmalarının aksine, zararlı da olabileceklerini göstermiştir. Özellikle bitkisel östrojenlerden genistein, daidzein ve zearalenon, genotoksik olarak nitelendirilmiştir (Stopper *et al.* 2005). McClain *et al.* (2006), üç farklı deney düzeneği ile genisteinin genotoksik etkili olup olmadığını incelemişlerdir. Araştırmacılar bu amaçla, birinci deney düzeneğinde Ames testini *in vitro*'da kullanarak genisteinin mutajenik etkisini değerlendirmişler ve deney sonucunda genisteinin herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığını rapor etmişlerdir. İkinci deney düzeneğinde ise yine *in vitro*'da farelerde lenfoma deneyi ile genisteinin bu canlılar üzerinde topoizomera II enziminin etkisini inhibe ederek kromozomal hasara yol açtığını tespit etmişlerdir. Üçüncü uygulamada ise bu kez *in vivo*'da farelerde mikronükleus testini gerçekleştirmişler ve genisteinin herhangi bir mutajenik etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Yine, bir çeşit bitkisel östrojen olan ve fazla tüketildiğinde, özellikle çiftlik hayvanlarında endokrin rahatsızlıklara yol açtığı bilinen koumestrolün Chinese hamster ovaryum hücrelerinin (V-79 hücreleri) hypoxanthine phosphoribosyl transferaz (HPRT) geninde DNA ipliğinde kırılmalara, mikronükleus ve mutasyonlara sebep olduğu bildirilmiştir (Kulling and Metzler 1997). Domon *et al.* (2001) ise insan lenfoblastoid hücre kültürlerinde koumestrolün hem mutajenik, hem de klastojenik özellikler sergilediğini belirtmişlerdir.

1.1.8. Bitkisel östrojenlerin sınıflandırılması

Bitkilerde fenilpropan ve basit fenollerden sentezlenen fitoöstrojenler, kimyasal olarak çok geniş çeşitlilik gösterirler. Fitoöstrojenler, insan estradiol hormonuna (17 β -estradiol) benzer yapıda oldukları için östrojenik ve/veya antiöstrojenik etkiye neden olabilirler. En büyük östrojenik aktiviteye sahip olanlar koumestanlar ve izoflavonlardır (Collins *et al.* 1997). Fitoöstrojenleri yiyeceklerde en çok bulunmalarına ve aralarındaki akrabalık ilişkilerine göre 2 büyük grupta sınıflandırmak mümkündür. Şekil 1.3’de bu 2 grup gösterilmiştir.

İzoflavon ve koumestanlar bitkide kendiliğinden sentez edildikleri için, bazen intrinsik östrojen bileşenleri olarak da kabul edilmektedirler. Makrolit yapısında olan rezorsiklik asit ketonları, tahıl ürünlerine bulaşan küfler tarafından üretildikleri için mikoöstrojenler olarak tanımlanırlar (Davis *et al.* 1999).



Şekil 1.3. Bitkisel östrojenlerin sınıflandırılması

* Parantez içerisindeki bileşikler, bitkilerde doğal olarak bulunmaz. Ancak dahil oldukları sınıfa ait üyelerin metabolizması sonucu üretilirler.

1.1.9. Flavonoidler

Flavonoidler, izoflovanlar, koumestanlar ve prenil flavonoidler olarak üç gruba ayrılırlar. Tüm flavonoidler, 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptirler. Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır şelasyonu, μ -tokoferol rejenerasyonu foksiyonlarına ek olarak; vazodilatör, immünstimulan, antiallerjik, östrojenik, antiviral etkileri de söz konusudur (Park *et al.* 2003). Fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile antiinflamatuvar özellik gösterirler. Ayrıca, ksantin oksidaz, glutatyon redüktaz, NADH-oksidad ve protein kinaz enzimlerini inhibe ettiklerine dair veriler mevcuttur. Yiyeceklerle flavonoid alımının ortalama 26 mg/gün olduğu belirlenirken, predominant flavonoidin kuersetin olduğu saptanmıştır (Park *et al.* 2003). Alınan esas kaynakları; çay (%61), soğan (%13) ve elma (%10) oluşturmaktadır. Bunun yanında, Akdeniz kültüründe 10-20mg/L flavonoid içeren kırmızı şarabın önemli bir kaynak oluşturduğu belirlenmiştir. Soya fasulyesi, yer fıstığı, hardal, pirinç, susam, zeytin, soğan, patates, yulaf, zeytin gibi sık tüketilen gıdalarda da flavonoid içerik gösterilmiştir (Formica and Regelson 1995). Adaçayı, kekik, biberiye, karabiber ve karanfil gibi baharatların güçlü antioksidan etkiye sahip oldukları uzun süredir bilinmekte ve gıda koruyucu olarak kullanılmaktadırlar. Sentetik bir flavonoid olan ipriflavon 1960'ların sonlarında üretilmiş ve hayvan besinlerine karıştırıldığında kemikte total Ca^{+2} miktarını arttırdığı gösterilmiş ve osteoporoz tedavisinde kullanımı gündeme gelmiştir (Burak ve Çimen 1999).

Son yıllarda tanımlanmış olan bir flavonoid bileşik olan 3-Hidroksifarrerolün, 10M konsantrasyonda süperoksit anyonunun (O_2^-) nötrofil ürünlerini tetiklemesini azaltması, nötrofil miyeloperoksidaz ve elastaz salınımını inhibe etmesi, monositlerden TNF-a ve IL-8 salınımını azaltması yoluyla antibakteriyel özellik gösterebileceği bildirilmiştir. Ayrıca, ksantin oksidaz, glutatyon redüktaz, NADH-oksidad, protein kinaz gibi bazı enzimleri inhibe ettiklerine dair veriler de mevcuttur (Meloni *et al.* 1995).

Faydalı etkilerine zıt olarak, flavonoidlerin mutajenik oldukları hakkında da *in vitro* veriler bulunmaktadır. Flavonoidlerin biyolojik ve farmakolojik etkileri antioksidan ve prooksidan davranışlarına bağlıdır. Auroma and Murcia (1993), bazı fenolik antioksidanların DNA, protein ve karbonhidratlarda *in vitro* oksidatif hasarı hızlandırabildiğini bildirdiler. Bonet *et al.* (1996) yaptıkları bir çalışmada, CuCl_2 ile indüklenen düşük yoğunluklu lipid (LDL) oksidasyonunu vitamin C ve flavonoidlerin arttırabildiğini göstermişlerdir. Bu nedenle, biyolojik moleküllerde fenolik antioksidanların prooksidan etkilerini gözönünde bulundurmanın önemli olduğuna dair görüş bildirmektedirler. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Testi kullanılarak, bazı flavonoidlerin konsantrasyon ve serbest radikal kaynağına bağlı olarak hem antioksidan, hem de prooksidan davranabileceği gösterilmiştir. Flavonoidler, serbest radikallere karşı antioksidan olarak davranırlar, ama bir geçiş metali varlığında prooksidan aktivite gösterirler. Bu flavonoidlerin antioksidan etkisi ve bakırın indüklediği prooksidan aktiviteleri kendi yapılarına bağlıdır (Cao *et al.* 1997). ABD'de bir grup araştırmacı, hamile kadınlarca soya tüketiminin, doğacak erkek çocukların ilerideki cinsel yaşamında ciddi olumsuzluklara yol açabileceği uyarısında bulunmuşlardır. Bu etkiye neden olarak da soyada bulunan östrojen hormonu benzeri kimyasal maddeler gösterilmiştir (www.biltek.tubitak.gov.tr). Kadınlık hormonu olarak da bilinen östrojene benzer etkilere sahip olan ve kozmetik ürünlerinde, plastiklerde ve doğum kontrol haplarında bulunan kimyasalların, kirlenmiş derelerde bulunan balıkların cinsiyetlerini değiştirdiği, hatta insanlarda bile sperm sayılarını düşürdüğü belirlenmiştir (www.biltek.tubitak.gov.tr). Bunların yanı sıra, fitoöstrojenler olarak adlandırılan doğal östrojen benzerlerinin etkileri konusunda da endişeler mevcuttur.

1.1.9.a. İzoflavonlar

Etkisi nedeniyle, üzerinde en çok çalışılan fitoöstrojenler izoflavonlardır. Diğer yapılarla ilgili çalışma sayıları oldukça azdır. İzoflavonlar bitkilerde aglikon, glikozit, malonil glikozit veya asetil glikozit yapı olmak üzere dört temel yapıda bulunabilirler. Aglikon yapılar daidzein (7,4'-dihidroksi izoflavon), genistein (5,7,4'-trihidroksi izoflavon) ve glisitein (7,4'-dihidroksi 6-metoksi izoflavon) gibi konjuge olmamış

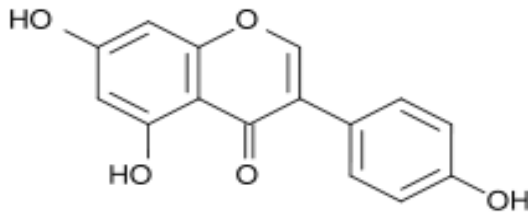
yapılardır. Glikozitler arasında 7-O-glukozit (daidzin, genistin, glisitin), 6'-O-asetilglukozit (6'-O-asetildaizidin, 6'-Oasetilgenistin, 6'-O-asetilglisitin) ve 6'-O-malonilglukozit (6'-O-malonildaizidin, 6'-O-malonilgenistin, 6'-O-malonilglisitin) yer alır (Sam and Chang 2002).

İzoflavonlar, bitkilerde doğal olarak şekerlerle konjuge yapılar halinde yani glikozit halde bulunurlar. 6'-O-asetilglukozit ve 6'-O-malonilglukozit yapılar ise, aglikona bağlanan şeker molekülü dışında, asetil veya malonil molekülü içerirler. Bitkilerden izole edilen izoflavonların birçoğunun östrojenik etkisinin olmadığı, etkili olanların da östrojenik etkilerinin aynı olmadığı saptanmıştır. Örneğin, genistein en güçlü östrojenik etkiyi gösterirken, soya izoflavonlarının %5-10'unu oluşturan glisitein, diğer izoflavonlardan çok daha zayıf östrojenik özelliğe sahiptir (Sam and Chang 2002).

İzoflavonlar, yemeklik baklagiller, rafine edilmemiş tahıl taneleri, bazı meyveler ve sebzelerde değişik miktarlarda bulunan, insanlarda hem östrojenik, hem de antiöstrojenik aktiviteler gösteren fitoöstrojen bileşiklerdir (Kelly *et al.* 1998a). İzoflavonlar, bitkisel östrojenler içinde en iyi şekilde tanımlanmıştır. En fazla miktarda soya fasülyesinde, ayrıca legümenler ve yoncada da bulunmaktadır. İzoflavonların hormonal etkilerini gösteren birçok araştırma vardır. Fakat genotoksik aktiviteleri üzerine çalışmalar hala çok sınırlıdır. Genel olarak izoflavonlar göğüs, rahim, yumurtalık, prostat ve bağırsak kanseri ile ilişkili hormonlara karşı geniş çapta koruyucu içeren sayısız biyolojik özelliklere sahiptir (Kelly *et al.* 1998b). Soyadan elde edilen izoflavonların kullanılması durumunda kandaki kolesterol (LDL) seviyesinde ve atardamarlarda plak oluşumunda azalma olduğu bildirilmiştir (Anthony *et al.* 1996; Kelly *et al.* 1998c). Ayrıca izoflavonların hücre membranında kalsiyum değişimini düzenlemek suretiyle osteoporozise (kemik erimesine) karşı koruyucu (Gould *et al.* 1995), antioksidant (Pratt *et al.* 1981) ve menopoz belirtilerini azaltıcı etkileri de (Adlercreutz and Mazur 1997) belirlenmiştir. Fakat bu koruyucu etkilerinin tam mekanizması hala açık değildir. Bununla beraber, fitoöstrojenlerin, sirküle olan östrojenlerin biyolojik aktivitelerini azaltmak yoluyla, östrojenin uyardığı sinyallere karşı oluşan hücresel cevabı değiştirdiği düşünülmektedir (Adlercreutz and Mazur

1997). Diğer taraftan, izoflavonoid tüketiminin evcil hayvanlardan koyunlarda ve sığırlarda sürekli infertileteye ve kafesteki çitalarda karaciğer hasarına sebep olduğu bildirilmektedir (Setchell *et al.* 1987). Bu durum kronik izoflavonoid tüketiminin sebep olduğu biyolojik etkiler hakkında daha fazla deneysel araştırma gereği fikrini oluşturmuştur.

Genistein, daidzein, equol, glisitein, kuersetin ve biochanin A en önemli izoflavonlar arasındadır. Bunlardan genistein, özellikle soya fasülyesinde ve soya temelli yiyeceklerde doğal olarak bulunan bir bitkisel östrojendir. Genisteinin yapısı endojenik östrojenlerin yapısına benzerlik gösterir. Ancak etkisi daha zayıftır. Genisteinin kimyasal yapısı $C_{15}H_{10}O_5$ olup molekül ağırlığı yaklaşık 270g/mol'dür (Şekil 1.4).

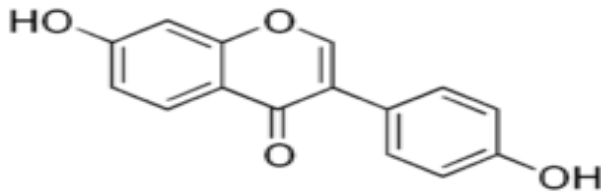


Şekil 1.4. Genistein'in kimyasal yapısı

Genistein, bebekler için satılan bazı katkılı süt ve mamalar ile bazı kadınların hormon yenileme tedavilerine alternatif olarak kullandıkları katkılı yiyeceklerde büyük miktarlarda bulunmaktadır. Bu maddelerin kanser yapabildiğini gösteren bazı çalışmalardan sonra, bir İngiliz tıbbi danışma kurulu, soya katkılı süt ve mamaların tehlikeleri konusunda ciddi kanıtlar bulunduğu uyarısında bulunmuştur. En son yapılan bir çalışmada ise soya ürünlerinin endişe verici bir başka etkisi gözlenmiştir. Araştırmacılar, gebe fareleri insanların yediğine eşdeğer genistein katkılı yiyeceklerle beslemişler ve doğan erkek yavruların daha büyük prostat bezleri ve daha küçük testisleri olduğunu gözlemişlerdir (Gültekin and Yıldız 2002). Aynı araştırmacılar, süttten kesildikten sonra genistein katkılı gıdayla beslenen ve bu gıdaların verilmediği iki grup erkek fareler arasında, ürogenital sistemde herhangi bir değişiklik olmadığını

gözlemişlerdir. Bu da genisteinin en büyük etkiyi ana rahminde ve emzirme döneminde gösterdiğini ortaya koymaktadır.

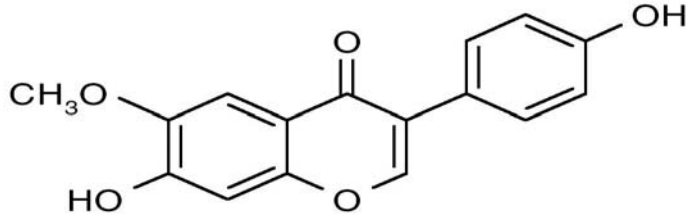
Daidzein de (7-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl) chromen-4- one) bir izoflovan çeşididir. Diğer ticari isimleri ise 4,7- Dihydroxyisoflavone, daidzeol, isoaurostaindir. Kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_4$ olan daidzeinin moleküler ağırlığı yaklaşık 254g/mol olup erime noktası $315-323^{\circ}C$ olarak ölçülmüştür (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Daidzein'in kimyasal yapısı

Daidzein, soya fasulyesinde genisteinden sonra en çok bulunan izoflovandır. Soya fasulyesi, japon sarmaşığı ve çayır üçgülünde bulunur. Genistein gibi daidzein de östradiol ile yapısal benzerlik gösterir ve bu da onların kolayca östrojen reseptörlerine bağlanmalarını sağlar. Ancak, daidzeinin östrojen reseptörüne bağlanma afinitesi genisteinin bağlanma afinitesinden oldukça düşüktür (Ünsal ve Sarıyar 2008). Dolayısıyla östrojenik etkisi diğer izoflavonlara göre daha azdır.

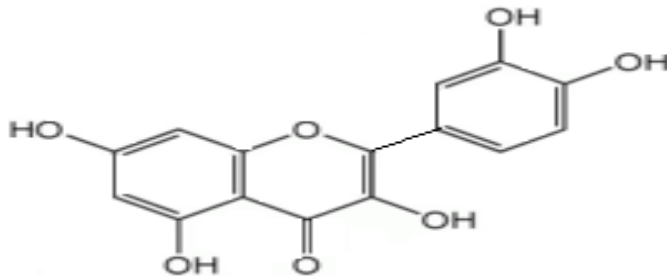
Genistein ve daidzeine ilaveten soyada keşfedilmiş olan üçüncü izoflovan glisiteindir. Soya ürünlerinde bulunan toplam izoflavonların yaklaşık %5-10'unu oluştururlar. Ticari ismi 4,7-Dihydroxy-6-methoxyisoflavone olan glisiteinin kimyasal formülü $C_{16}H_{12}O_5$ tir (Şekil 1.6). Bu bileşiğin biyolojik etkinliği bugüne kadar rapor edilmemiştir. Ancak bu bileşik, daidzein ve genistein gibi diğer izoflavonlarla birlikte birçok kez çalışılmıştır. Stopper *et al.* (2005), $150\mu M$ konsantrasyona kadar glisiteinin genotoksik etkilerini incelemişler ve mikronükleus oluşumuna rastlamamışlardır.



Şekil 1.6. Glisitein'in kimyasal yapısı

Yine bir flavonoid (flavonal) olan kuersetinin kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_7$ (Şekil 1.7), molekül ağırlığı, yaklaşık 302g/mol ve erime noktası $316^{\circ}C$ 'dir. Limonda kuersitrin ve rutin gibi kuersetinin türevleri bol miktarda bulunur. Günümüzde çeşitli bitki çaylarının içerisinde bulunan kuersetin, biyokimya, gıda kimyası, boya kimyası, tıp kimyası, boya endüstrisi ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır. Genellikle birçok bitkinin kök, gövde ve çiçeklerinde farklı flavonoidlerle birlikte bulunur.

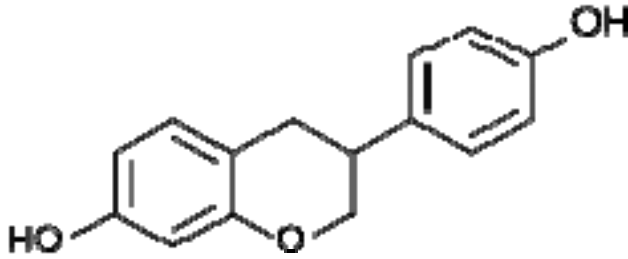
Kuersetinin genotoksisitesi üzerine çelişkili sonuçlar yayınlanmıştır. Kuersetin, *Salmonella typhimurium*'da 60nM konsantrasyonda mutajenik etki göstermiştir (Czeczot *et al.* 1990). Buna ilaveten, hem 19.8-49.6µM konsantrasyon aralığında, hem de 66.2-165.4µM konsantrasyonlarda Chinese hamster ovaryum hücrelerinde kardeş kromatid değişimine yol açmıştır (Carver *et al.* 1983).



Şekil 1.7. Kuersetin'in kimyasal yapısı

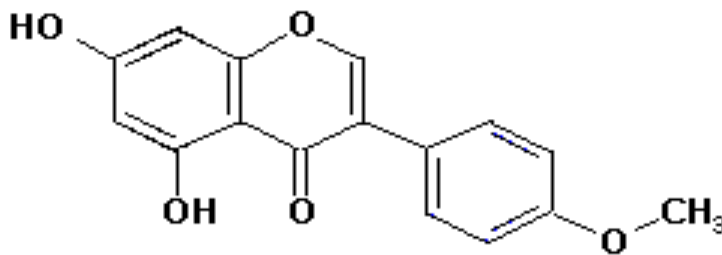
Çalışmamızda kullanılmayan ancak izoflavonlar grubunda yer alan başka bileşikler de mevcuttur. Equol ve biochanin A bu bileşiklere örnektir.

Equol (4',7-isoflavandiol), daidzeinden doğal olarak oluşan bir izoflavondur. Equol, insan barsaklarında belirli bakteriler tarafından daidzeinin ayrıştırılması sonucu oluşur. Ancak insanların yalnızca yaklaşık %30-50'sinin barsaklarında equol yapan bakteriler vardır (Frankenfeld *et al.* 2005). Equolün prostat kanseri ve menapoza karşı koruyucu etkili olduğu bildirilmektedir (Akaza *et al.* 2004; Frankenfeld *et al.* 2004). Equolün kimyasal yapısı Şekil 1.8'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Equol'ün kimyasal yapısı

Biochanin A (5,7 Dihidroxy-4'-Methoxyisoflavone), flavonoidlerin izoflavon sınıfına aittir. Östrojen benzeri biyolojik aktiviteye sahip olan nonsteroidal bileşikler içeren bitkilerden elde edildikleri için bir bitkisel östrojen olarak da sınıflandırılmaktadır. Biochanin A, zayıf östrojenik aktiviteye sahiptir. Bu zayıf östrojenik etkili madde, suda çözünmeyen katı bir maddedir ve moleküler formülü $C_{16}H_{12}O_5$ 'tir. Şekil 1.9'da biochanin A'nın kimyasal formülü görülmektedir. Biochanin A özellikle bir legümen olan *Trifolium pratense* (kırmızı yonca)'de bulunur. Biochanin A'nın koyunlara verilmesinin östrojenik bir etki meydana getirmediği bildirilmektedir (Coşkun ve İmir 1991). Ayrıca, geçmiş çalışmalar bu maddenin antioksidan etkilerini ve özellikle farelerde meme kanserine karşı koruyucu olduğunu göstermektedir (Gotoh *et al.* 1998).

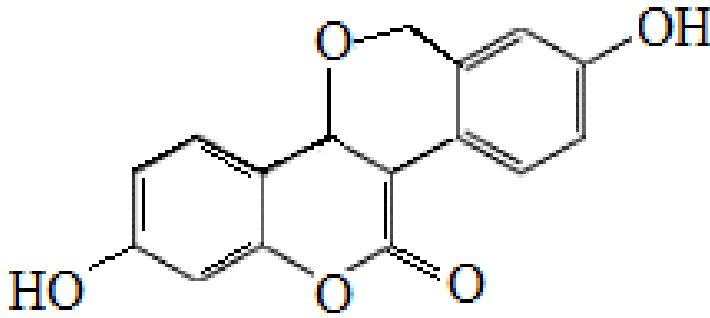


Şekil 1.9. Biochanin A'nın kimyasal yapısı

1.1.9.b. Koumestanlar

Koumestanlar, yapısal olarak izoflavonlara benzerler. Koumestanlar içinde en önemli östrojenik aktiviteye sahip olan bileşikler koumestrol (Şekil 1.10) ve 4-metoksi koumestrol'dür.

Kimyasal formülü $C_{15}H_8O_5$ olan koumestrol çeşitli yonca türlerinin filizlerinde ve diğer baklagillerde bulunmaktadır. Genistein gibi en yaygın çalışılan bitkisel östrojenlerdir.



Şekil 1. 10. Koumestrol'ün kimyasal yapısı

Kulling and Metzler (1997), koumestrolün Chinese hamster V79 hücrelerinde hem mutajeniteye (HPRT mutasyon), hem de genotoksisiteye (mikronükleus oluşumu) neden olduğunu göstermişlerdir.

1.1.9.c. Prenil Flavonoidler

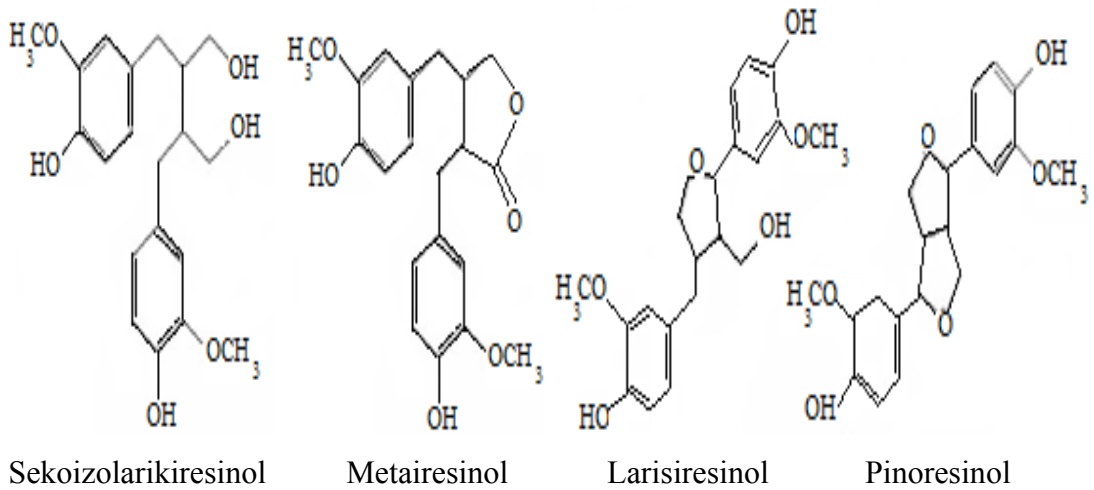
Prenil flavonoidleri, 8-prenilinarinjeninler, 6- prenilinarinjeninler, ksantohumol ve isoksantahumol oluşturur. Etkileri henüz tam olarak belirlenememiş bileşiklerdir.

1.1.10. Non-Flavonoidler

En önemli temsilcileri lignanlardır. Bütün damarlı bitkilerde glikozit formda bulunurlar.

1.1.10.a. Lignanlar

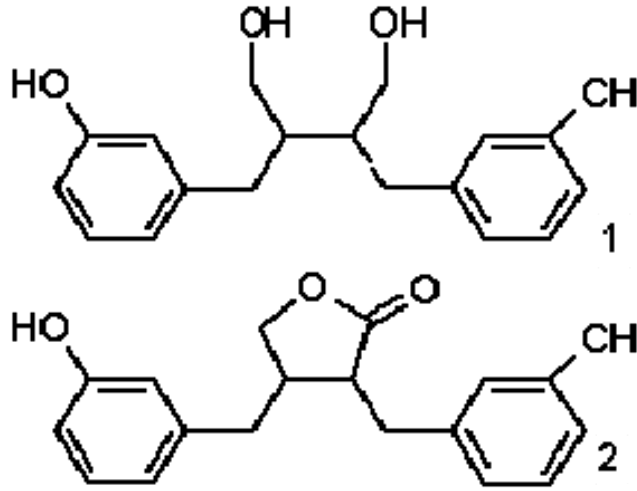
Lignanlar, 2,3 dibenzilbütan iskeleti ile tanımlanırlar. Bitkilerde bulunan temel lignanlar, larisiresinol, izolarisiresinol, metairesinol, sekoizolarisiresinol ve pinoresinol (Şekil 1.11) olup bunlar insanlarda östrojenik aktivite gösteren iki temel bileşiği, enterolakton ve enterodiolü vermektedirler. İzoflavonlar gibi enterolakton ve enterodiol de (Şekil 1.12) barsak mikroflorasının bitki lignan öncüleri üzerindeki aktivitesi sonucu oluşurlar. Enterolaktonun bunun dışında enterodiolün oksidasyonu ile de oluştuğu bilinmektedir (Davis *et al.* 1999).



Şekil 1.11. Lignanların kimyasal yapıları

İzoflavonlar gibi lignanlar da tahıl, sebze ve meyvelerde bulunurlar. En iyi bilinen kaynakları ise *Linum usitatissimum* (keten tohumu)'dur.

Lignanlar, ilk olarak bitki hücre duvarlarının yapısında var olan ligninin oluşumuna katkı sağlayan maddeler olarak tespit edilmiştir (Ososki and Kennelly 2003). Hem bitkisel östrojenlerin önemli bir grubunu oluştururlar, hem de antioksidant gibi davranırlar.

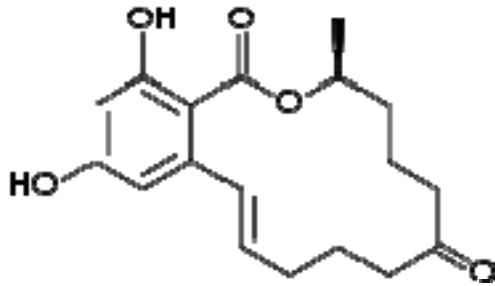


Şekil 1.12. Enterodiol'ün (1) ve Enterolakton'un (2) kimyasal yapısı

1.1.10.b. Mikoöstrojenler

Bunlara makrolitlerde denilmektedir. Makrolitler, özellikle uygun olmayan koşullarda depolanan tahıllar, yağlı tohumlar ve otlarda hızla çoğalan *Fusarium* gibi mantarların ikincil metabolitleridir. Çoğunlukla tohumun kabuk kısmında bulunurlar ve bilindiği gibi bu kısım genellikle besinin işlenme sürecinde bitkiden ayrılır. α - zearalenon (Şekil 1.13) ve β -zearalenon östrojenik aktiviteye sahip olduğu bilinen mikoöstrojenlerdir.

Zearalenon (ZE), dünyanın her iklim bölgesinde bulunabilen küf mantarı *Fusarium*'un bir metabolitidir. FES (Fermentasyon östrojenik madde) veya F-2 toksini adları ile de bilinmektedir. Bu küf metaboliti direk bir toksin olmaktan çok hormon benzeri kimyasal yapı gösterir. Tahıllar, mısır ve domates için çok önemli sorun olup, bitkilerde pek çok hastalıklar yapabilmektedir (Kuiper *et al.* 1987). Koch (1981)'a göre kuvvetli östrojenik etkili olan ZE, fareler, sıçanlar, hamsterlar ve gine domuzları gibi çeşitli hayvanların üreme sistemlerinde dejenerasyonlara yol açmaktadır. ZE ile muamele edilmiş farelerin özellikle uterus ve testislerindeki intersitital hücreleri ve ovaryum foliküllerinde ZE'nin kuvvetli yayılım gösterdiği bulunmuş ve hatta ZE'ye adipoz dokuda da rastlanmıştır (Kuiper *et al.* 1997).



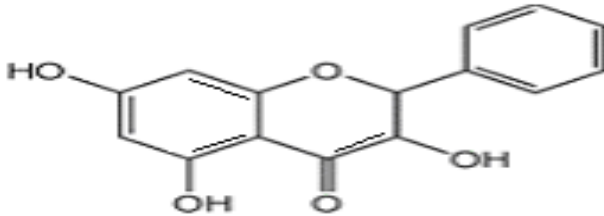
Şekil 1.13 Zearalenon'un kimyasal yapısı

Zearalenon, mutajenik ve kanserojen etkili olup, bazı hayvanlarda, özellikle eşeyssel organlarda toksik etkiler göstermektedir. Zearalenon, funguslar tarafından üretildiği bilinen tek bitkisel östrojen olup, bu özelliği ile ticari bir öneme sahiptir. Zearalenon türevlerinden biri olan Zeralenol (Zeranol), anabolik ajan olarak kullanılmaktadır. Zearalenonun 1-5ppm'lik düzeyleri canlılarda fizyolojik hasarlar meydana getirebilmektedir (Janssen *et al.* 1997).

1.1.11. Diğer bitkisel östrojenlerden galangin, kaempferol ve fisetinin genel özellikleri

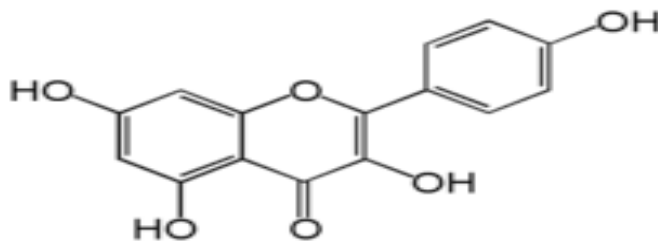
Flavonoidler ve non-flavonoidlere ilaveten diğer biyoflavonoidler-flavonlar (Milligan *et al.* 1999) ve flavonollar (Breinholt and Larsen 1998) da zayıf östrojenik aktiviteye sahiptirler. Kalp hastalığı ve kansere karşı koruyucu etkili oldukları düşünüldüğü için bu tip maddelere çok fazla ilgi gösterilmiştir. Ancak, galangin, kaempferol ve fisetin gibi flavonoidlerin de diğer bitkisel östrojenlerde olduğu gibi bazı mutajenik ve genotoksik etkileri gözlenmiştir. Bunlardan galanginin (3,5,7-trihydroxyflavone) kimyasal yapısı Şekil 1.14'de gösterilmiştir. Kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_5$ olan galanginin molekül ağırlığı yaklaşık 270g/mol'dür. Galangin, antioksidatif ve radikalleri ortadan kaldıracı aktiviteye sahiptir (Cholbi *et al.* 1991). Ancak, konsantrasyon artışına göre, bakterilerde mutajenik (40mM) ve Chine Hamster Ovaryum (=CHO) hücrelerinde klastojenik (204-277 μ M) etkilere sahip olduğu tespit

edilmiştir (Mac Gregor and Jurd 1978; Carver *et al.* 1983). Bazı araştırmacılara göre ise 0.5-1000 μ M konsantrasyonlarda anti-genotoksik etkiye sahiptir (Sohn *et al.* 1998).



Şekil 1.14. Galangin'in kimyasal yapısı

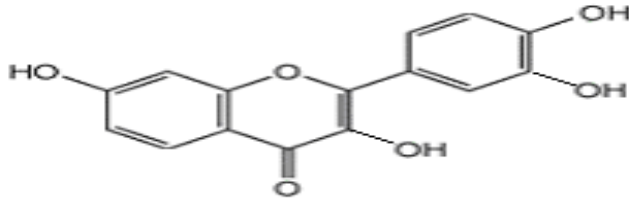
Kaempferol, Ranunculaceae familyasının bir üyesi olan *Delphinium* (bit otu) cinsi, üzüm ve diğer bitki kaynaklarından izole edilebilen doğal bir flavonoid çeşididir. Kaempferol, erime noktası 276-278⁰C olan sarı renkli kristal maddedir. Sudaki çözünürlüğü çok azdır, bu yüzden etanol ve dietil eter gibi organik çözücülerde de çözülmemektedir. Kimyasal formülü C₁₅H₁₀O₆ olan bu bileşiğin molekül ağırlığı yaklaşık 286g/mol'dür. Kaempferolün kimyasal yapısı Şekil 1.15'de gösterilmiştir. İnsan lenfositlerinde düşük dozlarda (104-500 μ M) kaempferol, mutajenik bileşikler tarafından meydana getirilen DNA hasarlarını azaltmaktadır (Anderson *et al.* 1997a; Noroozoi *et al.* 1998). Ancak, yüksek dozlarda (200-800mg/kg) kaempferolün fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir (Sahu *et al.* 1981).



Şekil 1.15. Kaempferol'ün kimyasal yapısı

Fisetin, birçok sebze ve meyvede özellikle çilekte doğal olarak bulunan bir flavonoid çeşididir. Kimyasal formülü C₁₅H₁₀O₆ olan fisetinin molekül ağırlığı yaklaşık 286g/mol

olup erime derecesi 330⁰C'dir. Bu maddenin kimyasal yapısı Şekil 1.16'da verilmiştir. Fisetin Ames testiyle yapılan bir çalışmada, mutajenik aktivite gösterirken (Fimognari *et al.* 2004), diğer genotoksik etkileri ile ilgili veri bulunmamaktadır.

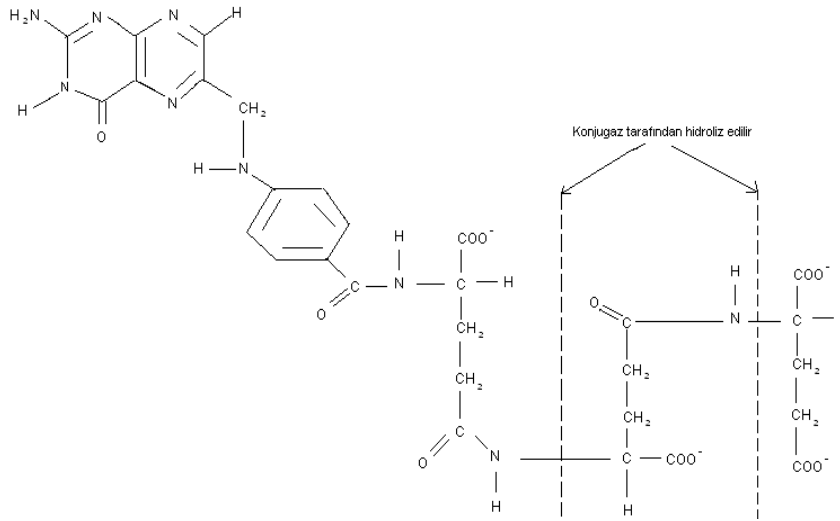


Şekil 1.16. Fisetin'in kimyasal yapısı

1.1.12. Folik asit – folisin (pteroglutamik asit)

Makrositik aneminin maya tedavisine cevabıyla ilk kez 1930'da dikkat çekilmiş ve 1941'de bu faktör "folik asit" olarak tanımlanmıştır (Mitchell *et al.* 1941). Folik asit çeşitli bitkilerde ppb düzeyinde örneğin ıspanakta 0.698, marulda 0.711, maydanozda 3.450, kuşburnunda 2.139, şalgam tohumunda 0.959, ığde çiçeğinde 10.303 bulunduğu belirlenmiştir (Güler ve Liman 2005). Bu molekülünün yapısında pteridin, p-amino benzoik asit (PABA), α -glutamik asit ve tek karbonlu gruplar (formil, metil, metilen gibi) bulunur. Pterin halkası ve PABA pteroik asidin parçalarıdır ve α -glutamik asitle konjüge olurlar. Bu yapıdan dolayı, folik aside "pteroglutamik asit" de denilir. Pteridinin yapısında primidin ve prazin halkaları bulunur. Prazin halkasının redüksiyonu dihidro ve tetrahidro glutamik asidi oluşturur. Bu gruplar prazin halkasının ya N⁵, N¹⁰ veya her iki pozisyonunda yer alır (Şekil 1.17).

Doğal olarak, folik asit poliglutamat molekülleriyle (yedi ve daha fazla çeşit) konjüge halde bulunur. Glutamat yapı, glutamatın gama karboksil grubuna peptit bağla bağlanır. Doğada yüz elliden fazla folik asit formu bulunmuştur. Tek karbon üniteleri bulunan veya bulunmayan tetra hidroksi folik asit (FH₄), folik asidin biyolojik aktif ko-enzim formudur. Folisin terimi, biyolojik aktif folik asit için kullanılırken, folat terimi genel anlamda kullanılmaktadır.



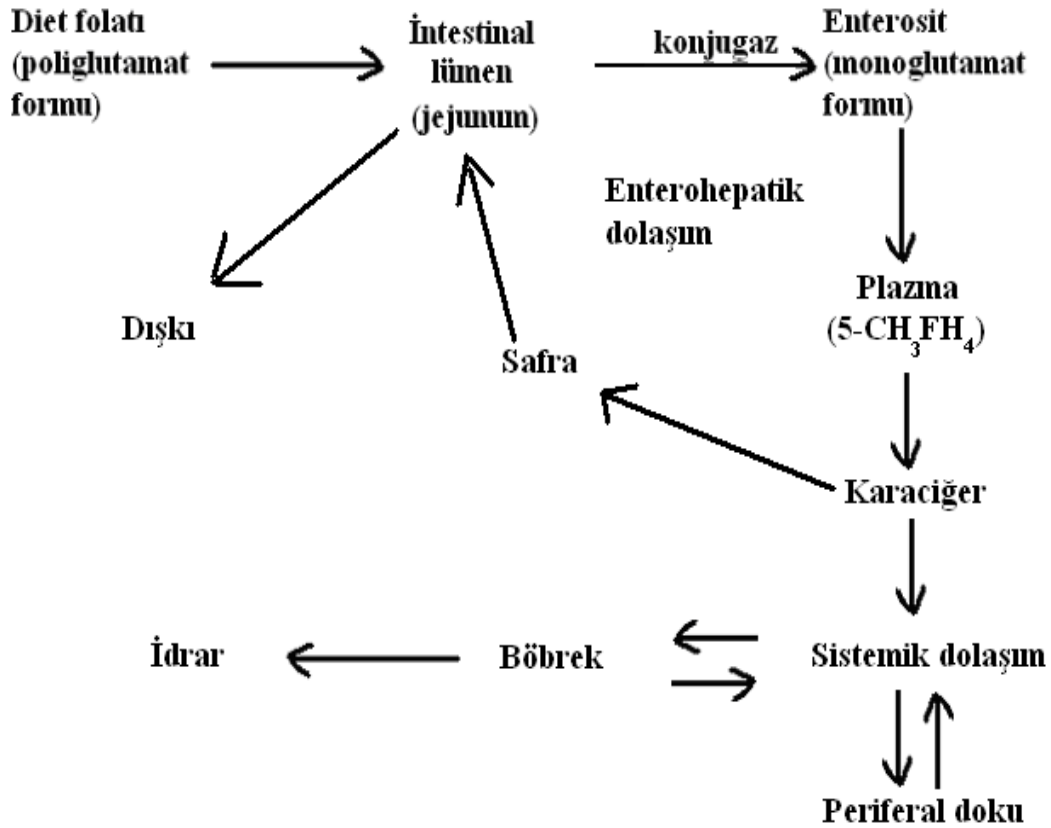
Şekil 1.17. Folik asit'in kimyasal yapısı

Folik asit, suda eriyebilen kristalize sarı renkli bir maddedir. Asidik ortamlarda ısıya dayanıklı olmakla birlikte, alkali ve nötr çözeltilerde ısıya pek dayanıklı değildir. Folik asit, bitki ve mikroorganizmaların birçoğu tarafından üretilmektedir (Donnelly 2001). Hayvanların barsaklarındaki bakteriler de folik asit üretebilirler. Ancak, insanlar tarafından sentezlenemediği için dışardan alınması gereken çok önemli bir vitamindir (Baysal 1990). Besinlerdeki folik asit, poliglutamat folat şeklindedir ve poliglutamat folat, organizmada primer intersellüler depo formudur. İntestinal hücrelerde bulunan dihidroredüktaz enzimi, NADPH^+ 'yı kullanarak poliglutamat folatı tetrahidrofolat (THF)'a indirger. Folik asidin THF formuna folinik asit denir. Ancak, emilebilmesi için spesifik bağırsak konjugaz enzimleri tarafından monoglutamat folata dönüştürülmesi gerekir ve herhangi bir yardımcı birime ihtiyaç olmaksızın duodenum ve proksimal jejunumdan emilir (Donnelly 2001). Yiyeceklerdeki folik asit poliglutamat molekülleriyle konjüge halde bulunur. Emilmeden önce intestinal mukozadaki hidrolitik enzimlerle dekonjugasyona uğrar. Bu enzim, γ glutamilkarboksi peptidazdır (konjugaz enzimi). Folik asit, indirgenmiş formuna (FH_4) emilim işlemi sırasında dönüşür. Bu reaksiyon iki aşamada NADPH - bağımlı dihidrofolat redüktaz ve tetrahidrofolat redüktaz enzimlerinin yardımıyla olur. Folik asidin indirgenmiş formu sonra enerjiye gereksinim duyarak aktif transportla ince bağırsakların üst kısmından emilir. Hafif asit

ortamda (pH 6.3) emilim artar, asidik veya alkali ortamda ise düşer. Normal bir diyetle emilim %50-75 oranındadır (Aksoy 2000).

Transportu karışık olup indirgenmiş monoglutamat türevlerinin albumine ve folat bağlayıcı proteinlere (FBP) bağlanarak plazma içinde karaciğer ve diğer dokulara taşındığı sanılmaktadır. Bu yapıyla karaciğerde, ince bağırsakların fırça yüzeyinde, ekstrasellüler sıvıda, serebrospinal sıvıda ve plazmada bulunmuştur. FBP okside formundan çok, indirgenmiş formunu bağlamaya meyillidir.

Dolaşımda en fazla 5'-metiltetrafolat formu bulunur. Enterositlerde çeşitli monoglutamatların bu yapıya dönüştüğü düşünülmektedir. Folat derivatiflerinin çoğu karaciğere eriştikten sonra safra içinde çıkarılır. Enterohepatik dolaşım plazma folat düzeyinin sürekliliği için önemlidir (Şekil 1.18).



Şekil 1.18. Diyet folat'ın emilimi ve taşınması

Folik asidin monoglutamat formları özellikle 5'-metil-FH₄ hücreler tarafından alınır ve poliglutamat formunda metabolize edilir. Bu büyük moleküler yapıyla hücre içinde tutulabilir. Vücuttaki folatın % 50'si karaciğerde depo edilir. Normal beslenmiş bir kişi, günde 5–40µg idrar ile vitamini atar. Metabolize olan folatın %20'si dışkıda bulunur, emilmeyen miktar ise 60–90µg'dır. Biyolojik yarılanma ömrü de 101 gündür. Erişkin bir erkek vücudunda toplam miktarı 5-10mg'dır (Aksoy 2000).

1.1.12.a. Folik asit'in fonksiyonları

Tek karbon ünitelerinin taşınması: Biyolojik aktif formu olan FH₄, çeşitli oksidasyon olaylarında tek karbon ünitelerini taşır. Bu gruplar, metil (-CH₃), metilen (-CH₂-), formimino (-CH = NH), formil (-CH = O) ve metenil (-CH = O)'dir. En okside karbon ünitesi ise CO₂ olup biotin tarafından transfer edilir. Bu fonksiyonundan dolayı bu vitamin, birçok metabolik reaksiyonda hayati rol oynar. Tek karbon üniti taşıyan folat derivatları birbirlerine dönüşebilirler, yalnızca 5'10', metilen FH₄'ün N⁵-metil FH₄ dönüşümü reversible değildir (Aksoy 2000).

Metionin sentezi: Karaciğerde depolanan 5-metil FH₄, B₁₂ vitaminine bağımlı metionin sentetaz enzimi ile FH₄ dönüşür. Reaksiyon sırasında homosisteine transfer edilir ve sonra metionin oluşur. B₁₂ vitamin yetersizliği folat ve metionin metabolizmasını bozar. B₁₂ vitamini yetersizliği, folatın metil FH₄ formunda tutulmasına yol açarak folat yetersizliğine de neden olur (Aksoy 2000).

Nükleik asitlerin biyosentezi: Adenin, guanin ve timin nükleik asitlerin önemli pürin ve pirimidin bazlarıdır. Aktif folat ko-enzimleri bu bazların, dolayısıyla DNA'nın sentezinde etkindirler. Aktif folat enzimlerinden formil ünitesi taşıyıcılar, pürin halkasının 2,8 pozisyonlarına tek karbon ünitelerinin katılması için gereklidir. 10-Formil FH₄ ve 5',10' metenil FH₄ purin molekülündeki bu pozisyona spesifik formil vericilerdir (Aksoy 2000). Reaksiyonda:

- (i) Glisinamid-ribosil-5'ten, formil glisinamid ribosil-5-P oluşur. Bu reaksiyon için 5',10'-metenil FH₄ ve transformilaz enzimi gereklidir.
- (ii) Bunu takiben formil glisinamidin 4. karbonundan aminasyon oluşur, glutamin amino donörüdür. Purinin 3. pozisyonuna nitrojen eklenir.
- (iii) Halka kapanır, amino imidazol ribosil-5-P oluşur.
- (iv) Bu yapı, 5-amino-4-imidazol-N-suksinil karboksiamid ribotide dönüşür. Bu işlem, karbonil grubunun eklenmesiyle olur. Karbon kaynağı CO₂, azot kaynağı da aspartik asittir. CO₂'nin kullanımı biotine bağlıdır.
- (v) Sonra, 5-amino-4-imidazol karboksiamid ribotidten, fumarik asit ayrılır, 5-amino-4-imidazol karboksiamid ribotid kalır.
- (vi) Bu yapıdan 5-formamido-4-imidazol-karboksiamid oluşur. Reaksiyon için 5',10'-formil FH₄ ve transformilaz enzimi gereklidir.
- (vii) Halka kapanır ve bunu takiben inosin monofosfat oluşur. Bundan da guanin ve adenin nükleotidleri ortaya çıkar.

Timidilat biyosentezi: Folik asit ko-enzimleri timidilat ve dolayısıyla primidin sentezine de karışırlar. Timidilat timidilat sentetaz enzimi yardımıyla deoksiuridilattan sentezlenir. Aktif folat, timidilata metil grubu vermekten sorumludur. Tek karbon ünitenin transferi 5',10'-metilen FH₄'ten olur. Bu reaksiyonda folat sadece tek karbon ünite taşımaz, aynı zamanda iki hidrojen, metilen karbonun metile indirgenmesini de sağlar (Aksoy 2000).

Aminoasitlerin dönüşümü: Homosisteinden metionin sentezinin dışında, folat ko-enzimleri diğer bazı aminoasitlerin dönüşümünde rol alırlar (serinin glisine dönüşümü gibi). Serin hidroksi metil transferaz serinin FH₄ ve formaldehitin transferini katalize eder. Bunun sonucu, 5-10-metilen FH₄ ve glisin oluşur (Aksoy 2000).

Folat, formiminoglutamatın metabolizmasına da karışır. Histidinin metabolik ürünü, formiminotransferazla katalize edilir. Formimino grup FH₄'de transfer edilir ve glutamatla 5-formimino oluşur. 5-formimino deaminasyonla daha fazla metabolize edilerek 5-10-metelin FH₄ oluşur (Aksoy 2000).

1.1.12.b. Folik asit yetersizliği ve hastalıklarla ilişkisi

Folik asidin pürin ve pirimidin oluşumunda ve dolayısıyla DNA sentezinde yer alması, yetersizliğinde DNA replikasyonu ve hücre bölünmesinin bozulmasına yol açabilir. Hızlı çoğalan hücrelerde özellikle intestinal mukozada, karaciğer rejenerasyonu ve kemik iliğinde yetersizliği hemen kendini gösterir. Epitel villus hücreleri ve eritrositler, yetersizlikten ilk etkilenen hücrelerdir. Gastrointestinal bölgedeki yetersizlik semptomları olarak dilde yanma, ülser, iştah kaybı, karın ağrısı ve bazen diyare görülebilir (Aksoy 2000).

Bu vitamin, kemik iliğinde eritrosit ve lökositlerin oluşumu ve olgunlaşması için gereklidir. Yetersizliğinde bu hücreler en fazla etkilenmekte, kırmızı kan hücreleri (RBC) büyük ve yeni sentezlenenler olgunlaşmamış durumdadır. Büyüyen RBC sayısı düşmekte, ancak hemoglobin düzeyi değişmemektedir. Bu yapıya makrositik veya megaloblastik anemi denilir. DNA sentezi azalır, hücre bölünmesi yetersiz kalır, RNA oluşumu devam eder. Makrositik anemide, yorgunluk, nefes darlığı, deride solgunluk ve stolik hırıltı görülür (Aksoy 2000).

1.2. Toksisite ve Genotoksisite

“Toksisite”, organizmada negatif etkiye neden olan bir maddenin etkisi olarak tanımlanabilir. Başka bir ifadeyle toksisite, biyolojik sistem üzerine zararlı etki meydana getiren bir maddeye bağlı olarak ortaya çıkar. Bu biyolojik etkiyi meydana getiren maddeye ise “toksikant” (zehirleyici) denir. Herhangi bir kimyasal madde belirli bir dozun üzerinde fizyolojik, biyokimyasal, histopatolojik ya da mutajenik etkili olabilir (Ecobichon 1997).

Tabiatta doğal olarak bulunan maddeler, özellikle yeni ilaçların araştırılması ve şekillendirilmesinde en önemli veritabanlarından biridir. Antioksidan aktivitenin güncelleşmesine bağlı olarak, tedavide ve beslenmede kullanılan doğal bileşiklere

duyulan ilgi artmış ve bu maddeler üzerinde yapılmakta olan çalışmalar da son zamanlarda giderek artmıştır. Maddelerin yapılarının ve aktivitelerinin aydınlatılması yanında, mutajenik ve genotoksik etkileri de incelenmeye başlanmıştır. Genlerde DNA molekülleri ile toksik ajanların (genotoksinler) etkileşmesi sonucu ortaya çıkan ve gelecek nesillere taşınan toksisite “genotoksisite” olarak bilinmektedir. “Genotoksik etki” denildiğinde, kimyasal maddelerin organizma üzerindeki toksik etkisinin genetik materyalde değişime neden olduğu anlaşılır. “Genotoksikoloji” ise genotoksik etkinin hücre ve organizmadaki mekanizmasını ve mutajenlerin neden olabileceği riskleri araştıran bilim dalıdır. Mutajenler, gelecek nesillerde genetik hataları indüklediği ve somatik hücre hasarlarının ortaya çıkışını arttırdığı için önemlidir (Hoffman 1991). Genotoksinler, kromozomlarda mutasyon meydana getirebilir ki, bu “klastojenik etki” olarak tanımlanır.

Kimyasal maddelerin hücreler üzerinde mutajenik ve genotoksik etkilerini incelemek için çeşitli yöntemler denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kimyasal maddelerin mutajeniteleri 3 grupta toplanabilir:

1. Elektrofilik bileşikler: Heterosiklik aromatik aminler, N-nitrozo bileşikler, mikotoksinler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar.
2. Oksidatif işlemler ve serbest radikaller: Oksidatif örnekler, radikal olmayan singlet oksijen ve hidroksil radikali.
3. Mekanizmaları tam aydınlatılamamış olanlar: Askorbik asit, 2-fenilbenzopiran ve flavan çekirdeğine sahip doğal maddelerdir (Başaran 2002).

1.2.1. Genetik toksikolojide kullanılan testler

Toksikolojide gen mutasyonları ile kromozomların sayısında ve yapısında meydana gelen değişimler ilgi odağı olmuştur. Bu mutasyonların herhangi birini tespit edebilecek çok çeşitli *in vitro* ve *in vivo* test sistemleri geliştirilmiştir (Houk 1992). Sıklıkla kullanılan genotoksisite testleri arasında allium testi (Levan 1938), salmonella testi (Ames *et al.* 1975), mikronükleus testi (Mac Gregor *et al.* 1987), kardeş kromatid

değişimi testi (SCE) (Latt *et al.* 1981), tek hücre jel elektroforezi (SCGE) (Fairbairn *et al.* 1995) ve *Drosophila* testlerini, eşeye bağlı resesif letal mutasyon testi (Tripathy *et al.* 1994), bitişik X (= yapışık X'lilik) ve nondisjunction (Munoz and Barnett 2002), somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) (Graf *et al.* 1987) sıralayabiliriz. *Drosophila* testleri ile çeşitli maddelerin genotoksik etkilerini tespit etmek mümkündür (Tiburi *et al.* 2002).

1.2.2. *Drosophila*'da mutasyon test sistemleri

Drosophila'da mutasyon test sistemleri ikiye ayrılarak incelenebilir.

1. Kromozomal hasarların belirlenmesinde kullanılan test sistemleri

- a) Dominant letalite testi
- b) Halkasal X kromozom kaybı testi
- c) Translokasyon testi
- d) Kanat benek (Wing spot) testi

2. Nokta mutasyonların belirlenmesinde kullanılan test sistemleri

- a) Resesif letalite testi
- b) CIB testi
- c) Bitişik X testi
- d) Kanat benek (Wing spot) testi

Buradan hareketle yapılan çalışmanın ana hedeflerini şöyle özetlemek mümkündür:

1. Özellikle Asya ülkelerinde ve son zamanlarda tüm dünya ülkelerinde tüketilen bazı bitkisel maddelerin içeriğinde bulunan bitkisel östrojenlerin *D. melanogaster*'de mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin (rekombinasyon oranını normalden daha fazla arttıran) olup olmadığını belirlemek.
2. Folik asidin koruyucu etkisinin olup olmadığını tespit etmek.
3. Yukarıda belirtilen araştırmalar neticesinde, bitkisel östrojenlerin biyolojik etki mekanizmasının işleyişi ve bu bitkisel östrojenlerin aynı yolla insanları etkileyip etkilemeyeceği hakkında sonuca varabilmektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Petersson and Kiessling (1984), biyolojik açıdan en etkin fitoöstrojenlerin isoflavonlar ve komestanlar olduğunu bildirmiş ve birçok yem bitkisinin farklı düzeylerde isoflavon içermekle beraber, özellikle Leguminosae familyasına ait *Trifolium* türlerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu belirlemişlerdir.

Singh *et al.* (1996), fitoöstrojenlerin, östrojen metabolizmasında rol oynayan kimi enzimlerin etkinliğini değiştirebildiğini, bu işlevi ile üreme sistemi hücrelerinin östrojen metabolizmasını bozabildiğini ve östrojenlerin hücreler üzerindeki etkisini değiştirebildiğini saptamışlardır.

Colborn *et al.* (1996), bitkisel östrojenlerin yeryüzünde 16 familyaya ait 300 bitki türünde tanımlanan ve kimyasal yönden birbirine benzer özellikte olan, en az yirmi adet bileşikten oluştuğunu bildirmişlerdir.

Harris *et al.* (2000), farklı derecelerde östrojenik etkinliğe sahip olan ve doğal östrojenlere hem yapı, hem de şekil yönünden benzerlik gösteren fitoöstrojenlerin, organizmada bulunan doğal östrojenler ile yarışa girerek reseptörlere bağlanıp direkt etki oluşturabileceğini göstermişlerdir.

Bitkisel östrojenlerin biyolojik etkinlikleri ile ilgili incelemeler genellikle sistemik toksisitelerine aittir.

Nation (1989), yüksek bitkisel östrojen ihtiva ettiği bilinen *Trifolium hybridum*'un ölümle sonuçlanabilen zehirlenmelere yol açtığını bildirmiştir.

Eroğlu (1993), fazla derecede bitkisel östrojen içerdiği belirlenen *Trifolium subterenaum*'un koyunlarda ölüm oranını %20-30 düzeyinde artırdığını belirlemiştir.

Giri and Lu (1995), farelere 50 mg/kg genisteini 3 gün süreyle 12 saat aralıklarla uygulamış ve uygulama gruplarının kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatid değişiminde bir artışın olduğunu belirlemişlerdir.

Anderson *et al.* (1997b) insan sperm ve periferal lenfositleriyle yaptıkları deneylerde, genisteinin (10 – 400µM) genotoksik bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Pool-Zobel *et al.* (2000), 12,5–100µM genisteinin insan tümör hücrelerinde DNA kırıklarına sebep olduğunu saptamışlardır.

Virgilio *et al.* (2004), genistein uygulamasının mouse V79 hücrelerinde mikronükleus oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Stopper *et al.* (2005), genistein uygulamasının mouse lenfoma hücrelerinde mikronükleus oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Akingbemi *et al.* (2007), bitkisel östrojen zengin soya ile besledikleri ergin farelerde ürogenital problemler oluştuğunu bildirmişlerdir.

Hancock *et al.* (2008), genisteinin farelerde Luteinleştirici hormon (LH)'nu engelleyerek Leyding hücrelerinde androjen biyosentezini azalttığını ileri sürmüşlerdir.

Drosophila, genetik denemelerde uzun yıllardır kullanılan model organizmaların başında gelmektedir. Bu uzun süreç içerisinde herhangi bir etmenin mutajenik, rekombinojenik, genotoksik, antimutajenik ve antigenotoksik etkilerini test etmek üzere *Drosophila*'nın kullanıldığı çeşitli testler geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), birçok araştırmacı tarafından güvenilir standart bir test olarak tavsiye edilmektedir. SMART nokta mutasyonu, delesyon, translokasyon, mitotik rekombinasyon ve kromozom kaybı veya ayrılmama gibi, belirli

kromozom aberasyonlarının genetik sonuçlarının geniş perspektifte saptanmasına izin vermektedir (Graf *et al.* 1984).

Mutajenite ve genotoksisite testlerinde, mutajenite ve genotoksisiteye neden olan ajanların belirlenmesi ve tanımlanması temel bir gayedir. Diğer önemli bir amaç ise pek çok karsinogenenik ve mutajenik olayları baskılayan ve antimutajen olarak bilinen ajanların tanımlanmasıdır. Mutajenlerin belirlenmesinde çok fazla test sistemi kullanılırken antimutajenlerin belirlenmesinde kullanılan çok az test sistemi vardır. Bu *in vivo* test sistemlerinden birisi de *Drosophila* Wing Spot testidir (Karekar *et al.* 2000).

Frei and Würgler (1996), *Drosophila* ile yapılan *in vivo* test yönteminin mikroorganizmal *in vitro* ve memeli *in vivo* genotoksisite test sistemleri arasında bağlantı oluşturabileceğini bildirmişlerdir.

Aşağıda SMART uygulamalarına ilişkin bazı çalışmalar özetlenmiştir.

Graf *et al.* (1984), 25 yıl kadar önce kanat hücre belirleyicileri, olan multiple wing hair (*mwh*) ve flare (*flr*)'in kullanımına başlamışlardır.

Negish *et al.* (1988), bakterilerde mutasyonları indükleyici olarak bilinen nükleosid analogu N4- aminositidinin *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyonları indüklediğini, hem ikili beneklerin, hem de küçük tekli beneklerin oluşumunu artırdığını wing spot test yöntemi ile gözlemişlerdir.

Graf *et al.* (1994), üç bitkisel çay, bir siyah çay, bir brendi ve beş şarap çeşidini SMART ile test etmişler ve kırmızı şaraplardan biri belirgin bir genotoksik etkiye neden olmuştur. Bitki çaylarının (*Urtica dioica*, *Achillea millefolium*) ve siyah çayın (*Camelia sinensis*) zayıf genotoksik olduğunu belirlemişlerdir.

Frei and Würgler (1996), yine SMART yöntemiyle kimya endüstrisinde birçok sentezde giriş maddesi olarak kullanılan 1,3-dikloro-2-propanol ve besin endüstrisinde çeşitli soslar ve hazır çorbaların üretiminde kullanılan 3-kloro-1,2-propandiol ile 2-kloro-1,3-propandiol bileşiklerinin genotoksik etkiye neden olmadığını bildirmişlerdir.

Yeşilada *et al.* (1999) zeytinyağı fabrikası atık suyunun genotoksik etkisini *Drosophila* kanat benek testi ile araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, zeytinyağı fabrikası atık suyunun yüksek konsantrasyonlarda letaliteyi arttırdığını ve tüm dozlarda genotoksik etki gösterdiğini saptamışlardır.

Reaktif oksijen türevlerinin toksik ve genotoksik etkisi SMART ile araştırılmıştır. Bu amaçla diquat, paraquat, menadione, juglone, plumbagin, streptonigrin, tert-butyl hidroperoksit, 4-nitroquinoline 1-okside, isimli sekiz reaktif oksijen türü kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, bu kimyasalların toksik ve genotoksik etkiye sahip oldukları bulunmuştur (Gaivao *et al.* 1999).

Kaya (2000), beş herbisidin (amitrol, metribuzin, prometrin, terbütirin ve dikwad dibromid) *Drosophila* kanat SMART testi ile genotoksisitelerini araştırmıştır. Deney sonuçlarında, amitrolün 0,5mM ve 1mM derişimleri küçük tek tip, büyük tek tip ve toplam spot frekanslarını arttırmış, sadece terbütirin 5mM derişimde küçük tek tip ve toplam spotların frekansında zayıf pozitif olduğu düşünölen az bir artışa neden olmuştur. Diğer üç herbisid ise hiçbir genotoksik etki göstermemiştir.

Yeşilada (2001), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ve AgNO_3 gibi nitrat tuzlarını içeren farklı metal bileşiklerinin en etkili genotoksik bileşikler olduğunu saptamıştır.

Lösemi tedavisinde kullanılan 1-D arabinofuranosilotozin (araC) ve 5-azo 2 deoksistidin (5-azo-dC) ilaçlarının genotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda, araC'nin %77 ve 5-azo-dC' nin %81 oranında rekombinasyona neden olduğu belirlenmiştir (Cunha *et al.* 2002).

Iwonna (2002), kaptan ve kaptofol (chloroalkylthiocarboximide) fungisidlerinin mutajenik ve karsinojenik mekanizmaları üzerine bir çalışma yürütmüş ve kaptanın topoizomerez I ve II nin aktivitesini düşürerek genotoksik etkiye neden olduğunu, kaptofolun ise herhangi bir olumsuz etki göstermediğini bildirmiştir.

Spano *et al.* (2004), dört adet prokanserojenin (potasyum kromat, siklofosfamid, pdimetilaminoazobenzen ve 9,10-dimetilantrasen) genotoksik etkisini araştırmışlar ve çalışmalar sonucunda, bu dört bileşiğin doz artışına bağlı olarak rekombinojenik aktiviteye sahip olduklarını bulmuşlardır.

Herepulido *et al.* (2004), insan meme kanserini önlemek için antiöstrojen olarak kullanılan, fakat rahim kanseriyle ilişkisi olan tamoxifen'in genotoksik etkisini araştırmışlar ve zayıf genotoksik etkili olduğunu rapor etmiştir.

Kaya *et al.* (2004), herbisid olan bentazon, molinat, tiobencarb ve trifluralin'in genotoksik etkilerini araştırmışlar ve bentazonun yalnızca yüksek bioaktivasyon çaprazında, tiokarbamat ve tiobencarb'ın ise standart çaprazda ve yüksek dozlarında pozitif sonuç verdiğini belirtirken molinatın hem yüksek bioaktivasyon, hem de standart çaprazda pozitif sonuç verdiğini tespit etmişlerdir.

Çakır and Sarıkaya (2005), bazı organofosfat insektisitlerinin (methyl parathion, azamethiphos, dichlorvos ve diazinon) farklı dozlarının *Drosophila* kanat SMART testi ile genotoksisitelerini değerlendirmişler ve toplam mutasyon ile mutasyona sahip kanat sayısı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca, kullanılan kimyasalların genotoksik etkilerine göre diazinon, dichlorvos, methyl parathion, azamethiphos olarak sıralandığını belirlemişlerdir.

Çetin (2005), X-bandındaki elektromanyetik (EM) alanın oluşturabileceği somatik mutasyonu, *D. melanogaster*'de kanat benek testi ile araştırmış ve EM alanın uygulama

süresindeki artışa bağlı olarak, *D. melanogaster*'de somatik mutasyona neden olabileceğini göstermiştir.

Sarıkaya and Çakır (2005) *Drosophila* SMART testi ile dört gıda koruyucusunun (sodyum nitrat, sodyum nitrit, potasyum nitrat ve potasyum nitrit) genotoksisitesini ve bu maddelerin letal dozlarını belirlemişlerdir. Uygulama gruplarında toplam mutasyon ve mutasyona sahip kanat sayısı arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür. Ayrıca, her iki kanatta gözlenen mutasyonlar mutasyonun tipine ve boyutuna göre de sınıflandırmışlardır. Kullanılan kimyasalları toksik ve genotoksik etkilerine göre sodyum nitrit, potasyum nitrit, sodyum nitrat ve potasyum nitrat olarak sıralamışlardır. Dahası, özellikle dört kimyasal karıştırıldığında, toksik ve genotoksik etkinin önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir.

Özata (2006), altı adet tekstil boyası (astrazon sarı GL-E, astrazon siyah FDL, chrocion kırmızı, chrocion sarı, remazol mavi, remazol kırmızı RR) ve tekstil fabrikası atık suyunun mutajenik ve rekombinojenik aktivitesini *Drosophila* kanat benek testi ile araştırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, tekstil boyaları ve fabrika atık suları mutajenik, toksik ve genotoksik etkili olarak bulunmuştur.

Son yıllarda bu testin kullanım alanı genişleyerek çevre kirliliği ile ilgili çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır.

Amaral *et al.* (2005), Brezilya'da kanalizasyon ve endüstriyel atıkların direkt olarak boşaltıldığı Cai Nehri'nden belirli dönemlerde aldıkları örneklerin genotoksik etkisini SMART testi ile analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda, atık sularda somatik hücrelerde DNA ile etkileşime girerek mitotik rekombinasyonu indükleyen genotoksinlerin bulunduğu sonucuna varmışlardır.

Brezilya'da yapılan başka bir çalışmada, endüstriyel atık ve lağım sularının etkisi altındaki bir bölgeden alınan yüzey sularının mutajenik ve rekombinajenik etkileri,

Drosophila melanogaster'de SMART test kullanılarak araştırılmıştır. Alınan örneklerin genotoksik etkiye sahip olduğu ve mitotik rekombinasyonu indüklediği bulunmuştur (Amaral *et al.* 2006).

Pantaleao *et al.* (2007), Brezilya'da Japarutuba Nehri'nde yaptıkları çalışmada, çevresel atıklarca kirletilen yüzey ve dip suyunun genotoksitesini değerlendirmişlerdir. Sonuçta, çevre yerleşim yerlerine içme suyu da sağlayan bölgenin sularının genotoksik etkili olduğunu belirlenmiştir.

Pimenta *et al.* (2008), Brezilya'da bulunan Paraguay Irmağı'ndan alınan su örneklerini SMART ile incelemişler ve özellikle deri fabrikalarının atıklarının boşaltıldığı bölgede mevsimsel değişimlere bağlı olarak genotoksik etkilere rastlamışlardır.

Bitkisel östrojenlerin olası toksik etkilerinin giderilebilmesi ya da en aza indirilebilmesi amacıyla, bir çeşit B vitamini olan folik asidin etki mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalardan bazılarının özetleri de şöyledir:

Mitchell *et al.* (1941), folik asidi ıspanak yaprağından izole etmeyi başarmış ve bu vitaminin anemi hastalığına karşı koruyucu etkisinin olduğunu ileri sürmüştür.

Perry and Miller (1965), ev sineği larvalarında folik asit eksikliğinde DNA ve RNA'nın sentezinin azaldığını ve bunun da normal gelişim ve metamorfozu olumsuz yönde etkilediğini rapor etmişlerdir.

B vitaminleri, folik asit ve biyotin eksikliğinde Diptera takımına ait olan *Dacus cucurbitae* (kavun meyve sineği)'de yumurtlama ve yumurtaların yaşayabilirliğinde azalmaların olduğu bildirilmiştir (Kaur and Srivastova 1991).

Sencer (1991), folik asit eksikliğinin nedenleri arasında, yetersiz beslenmeyi, malabsorbsiyonu ve folik asit antagonisti etki gösteren ilaçları göstermiştir.

Folik asidin nöral tüp defektlerine karşı en önemli koruyucu madde olduğunu Czeizel and Dudas (1992) bildirmişlerdir.

Li *et al.* (1995), folik asidin üriner sistem anomalilerini engellediğini belirlemişlerdir. Steinmetz and Potter (1996), yayınladıkları literatür özetlerini içeren makalelerinde, 206 insan ve 22 hayvan üzerinde yapılan araştırmaları incelemişler ve sonuçta folik asidin de içerisinde bulunduğu fitokimyasalların mide, özofagus, akciğer, gırtlak, farinks, endometriyum, pankreas ve kolon kanserlerine karşı koruyucu etkilerinin mevcut olduğunu vurgulamışlardır.

Botto *et al.* (2000), folik asidin kalp anomalilerine karşı koruyucu etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Gelişimi engelleyici etkiye sahip sodyum arsenite karşı kullanılan folik asidin SWV/Fnn (bir çeşit sıçan) embriyo fibroblastlarında koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir (Ruan *et al.* 2000).

Donnelly (2001), folik asit eksikliğinde serumdaki homosistein miktarının arttığını ve bunun da çeşitli kardiyovasküler hastalıklara neden olduğunu bildirmiştir.

Egel *et al.* (2002) insanlarda kromozom aberasyonlarının oluşmasına neden olan primetamine karşı folinik asidin koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ve primetamin nedeniyle kromozomlarda meydana gelen aberasyonların folinik asit tarafından önemli derecede azaltıldığını tespit etmişlerdir.

Güney *et al.* (2003), yaptıkları çalışmalarda, tavuk embriyolarında fenitoinin neden olduğu nöral tüp defektlerinin folik asit tarafından giderildiğini belirlemişlerdir.

Erişkin dişi wistar albino tipi sıçanlarda valporik asidin hepatotoksik etkisinin folik asit tarafından inhibe edildiğini Pamukçu *et al.* (2004) rapor etmişlerdir.

Crotta *et al.* (2005), folatın DNA'nın tamiri ve sentezindeki önemine değinmişler, insan ve kemirgenlerde folat eksikliğinin kromozomal aberasyonlara neden olduğunu ve bu eksikliğin DNA'da bazı anormalliklere ve mitokondriyal DNA hasarlarına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Tüm bunların da tümör oluşumuna neden olabileceği belirtilmiştir.

Retinoik asidin, Sprague-Dawley ratlarında meydana getirdiği çene defektlerinin folik asidin doğumdan önce alınması halinde giderilebileceğini Fırat *et al.* (2005) bildirmişlerdir.

Lee *et al.* (2005), ratlarda folik asit ilavesinin kanda bulunan homosisteinin endotel hücrelerinde neden olduğu zararlı etkiyi azaltıcı bir rol oynayabileceğini savunmaktadırlar.

Spiegelstein *et al.* (2005), folik asit içermeyen besinle besledikleri sıçanları sodyum arsenat ile muamele etmişler ve bu sıçanların uteruslarında bir takım hasarlar, embriyonik letalite ve nöral tüp defektleri gözlemişlerdir.

Aşkın *et al.* (2007), tıbbi uygulamalar ve çeşitli endüstri alanlarında yaygın olarak kullanılan fenolün *Drosophila melanogaster* üzerindeki olumsuz etkilerinin folik asit kullanarak giderildiğini bildirmişlerdir.

Wu *et al.* (2008), folik asidin DNA sentezi, tamiri ve metilasyonu ile ilişkili önemli bir mikronutrient olduğunu belirterek, hücreler arası folik asit metabolizmasının

metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (MTHFR) tarafından düzenlendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, folik asit eksikliğinin ve MTHFR C677T polimorfizminin DNA hasarıyla bağlantılı olduğunu da göstermişlerdir.

SMART testi, çeşitli etmenlerin genotoksik etkilerini belirlemenin yanında, antigenotoksik aktiviteyi belirlemek için de kullanılmaktadır. Aşağıda bu kapsamda yapılan bazı çalışmalar özetlenmiştir.

Takao *et al.* (1997), elektromanyetik alanların mutajenik veya karsinojenik aktiviteye sahip olup olmadığını belirlemek için *Drosophila melanogaster*'de SMART testini kullanmışlardır. Üçüncü evre larvalar 24 saat boyunca 5 teslalık bir statik manyetik alana maruz bırakılmıştır. Bu elektromanyetik alan uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak somatik rekombinasyonu önemli derecede arttırmıştır. Daha sonra bu artış, bir çeşit antioksidan olan E vitamini eklemesiyle kontrol düzeyine indirilmiştir.

Graf *et al.* (1998), askorbik asidin gamma ışınlarına ve kromium VI oksidin genotoksisitesine karşı koruyucu etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Karekar *et al.* (2000), vitamin E, kafeik asit ve glutatyonun antimutajenik etkilerini *Drosophila melanogaster*'de wing spot test kullanarak araştırmışlardır. Bu amaçla, mutajen olarak aflatoksin B₁ kullanmışlardır. E vitamininin herhangi bir antimutajenik etkisi görülmezken, kafeik asit ve glutatyonun aflatoksin B₁ tarafından indüklenen mutasyonlara antimutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Lassmar and Valadares (2002), *Apis mellifera*'nın tomurcuklarından elde edilen doğal reçineli propolisin antigenotoksik aktivitesini araştırmışlar ve bu maddenin anti-rekombinojenik etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Kaya (2003), askorbik asidin antimutajenik etkisini *Drosophila* kanat benek testi kullanarak araştırmış ve askorbik asidin etil metansülfonat (EMS), metil metansülfonat (MMS) ve N-nitrozo N-etilüre (ENU) kimyasallarının genotoksik etkisini azaltıcı etki gösterdiğini saptamıştır.

Taira *et al.* (2005), *Agrocybe* cinsine ait mantarların hem anti-rekombinojenik, hem de anti-genotoksik etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Magdalena *et al.* (2005), dünya çapında kullanılan altı bitkinin (*Matricaria chamomilla*, *Tilia cordata*, *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Uncaria tomentosa* ve *Valeriana officinalis*) anti-genotoksitesini *D. melanogaster*'de SMART testi kullanarak çalışmışlardır. Tüm bitkilerin hidrojen peroksitin mutajenitesini detoksifiye ettiği gösterilmiştir.

Sevim (2006), tarafından antineoplastik ajanlar olan gemsitabine ve fotemustinin genotoksikolojik etkileri ile amifostinin antimutajenik etkileri *Drosophila* kanat SMART ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, gemsitabinin mutajenik etki göstermediği, ancak zayıf rekombinojenik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Fotemustinin ise hem mutajenik, hem de rekombinojenik etki gösterdiği bulunmuştur. Çalışmanın bir başka aşamasında, mutajenik veya rekombinojenik etki göstermediği belirlenmiş olan amifostinin, gemsitabin ve fotemustin ile birlikte 72 saatlik larvalara uygulandığında antimutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan organizma ve test ile ilgili genel bilgiler

Drosophila melanogaster, Diptera takımına ait yabani tip (wild type = w.t) bir sinek türüdür. Halk arasında sirke sineği veya meyve sineği olarak tanınan bu tür, ilk kez 1910 yılında Thomas Morgan tarafından genetik araştırmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Bir canlıda herhangi bir maddenin genotoksik etkilerini belirlemede kullanılan testlerin bazıları için meyve sineği, en sık başvurulan bir model organizmadır. *D. melanogaster*'in bu testler için kullanılması Müller'in eşeye bağlı resesif letal mutasyon testini bulmasıyla başlamıştır (Müller 1927). 1984 yılında Graf ve arkadaşlarının *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testini geliştirmesiyle mutasyonların daha iyi incelenme olanağı sağlanmıştır. Bu test ile elektronegatiflik (Rosenkranz and Klogman 1996), UV ışınlarının (Kaya *et al.* 2006), çeşitli ilaçların (Frei *et al.* 1992; Marec and Gelbic 1994), anti-parazitik nitrofuranların (Alonso–Moraga and Graf 1989), ökaryotik topoizomera inhibitörlerin (Frei and Würzler 1996) ve bazı insektisitlerin (Batiste-Alentorn *et al.* 1995) mutajenik ve rekombinojenik (rekombinasyon oranını normalden daha fazla arttıran) etkileri araştırılmıştır. Ayrıca DNA tamir bozukluklarının saptanması (Graf *et al.* 1990) ve kimyasalların parçalanma ürünlerinin etkileri (Guzman-Rincon and Graf 1995) de çalışılmıştır. Bu test son yıllarda çevre kirliliği ile ilgili çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır (Amaral *et al.* 2005, 2006; Pantaleao *et al.* 2007; Pimenta *et al.* 2008). SMART testi, çeşitli etmenlerin genotoksik etkilerini belirlemenin yanında, antigenotoksik aktiviteyi belirlemek için de kullanılmaktadır (Kaya 2003; Sevim 2006). Son yıllarda kullanımı çeşitli alanlara yayılan bu test, trans-heterozigot larvalarda delesyon, nokta mutasyon, ayrılmama ve rekombinasyon ile kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan genetik değişimlerin fenotipte ortaya çıkması esasına dayanır (Graf *et al.* 1984, 1989). Bu tür genetik değişimlerin fenotipte gözlenebilmesi için *Drosophila*

melanogaster'de kanat trikomlarının fenotipini belirleyen *mwh* (multiple wing hair) ve *flr*³ (flare) genleri, belirleyici (marker) gen olarak kullanılmıştır. *D. melanogaster*'in üçüncü kromozomu üzerinde bulunan belirleyici genlerdeki değişimler, hazırlanan kanat preparatlarının ışık mikroskobu yardımıyla incelenmesi ile mutant klonlar olarak belirlenmiştir.

3.1.2. *Drosophila melanogaster*'in sistematigi

Phylum: Arthropoda (=Eklem bacaklılar). Kitinden yapılmış bir dış iskeletleri vardır ve üyeleri eklemlidir.

Subphylum: Mandibulata-Antennata. Bu alt şubeye dahil olan hayvanlar antenli olup mandibulları iyi gelişmiş ve kuvvetlidir. İç kısmında sert dişler bulunur.

Classis: Insecta-Hexapoda (=Böcekler- Altı bacaklılar). Vücut; baş, gövde ve abdomen olmak üzere üç kısma ayrılır. Toraks bölgesinin üç segmentli olması ve her göğüs segmentinde bir çift bacağın bulunması ile tanınırlar. İkinci (mesotoraks) ve üçüncü (metatoraks) göğüs segmentlerinden birer çift kanat çıkar. Başta bir çift anten ve bir çift bileşik göz bulunur. Abdomen 11 segmentten oluşur. Bu segmentler üye taşımaz.

Subclassis: Pterygota (=Kanatlı böcekler). Meso ve metatoraksta hareketli kanatlar taşırlar.

Superordo: Mecopteroidea-Panorpoidea (=Uzun kanatlılar). Arka kanatları körelme eğilimi gösterir.

Ordo: Diptera. Göğüs bölgesinden bir çift kanat çıkar. Metatorakstaki ikinci çift kanatlar **halter** adı verilen topuz şeklinde bir denge organına dönüşmüştür.

Subordo: Brachycera (=Sinekler- Kısa antenliler). Larvada ağız çengelleri bulunur. Pupa, üçüncü larva evresinden kalma bir deri ile sarılır. Antenleri çok kısadır ve birbirinden farklı şekilleri olan segmentlerin birleşmesiyle meydana gelmiştir. Üçüncü anten segmenti ya sadece uç kılı taşır (arista) ya da bu segmenti izleyen anten segmentleri birbiriyle kaynaşarak kamçı oluşturur.

Familia: Drosophilidae (=Sirke sinekleri-Meyve sinekleri). Çürümekte olan meyvelerin ve bazı tatlı sıvıların (meyve suyu, şarap, sirke, bira v.s) kokusuna pozitif kemotaksi gösterirler. Ayrıca, bitki öz suları, dışkılar ve mantarlar içinde de gelişebilirler.

Genus: *Drosophila*. Oldukça küçüktürler. Ev sineğinin 1/3'ü kadardırlar.

Species: *Drosophila melanogaster*.

3.1.3. *Drosophila*'nın hayat döngüsü

Drosophila'da tam başkalaşım (holometabol) görülmektedir ve *Drosophila* ergin olmadan önce, döllenmiş yumurtadan başlayarak şu evreleri geçirir: Embriyo, üç larva evresi, prepupa ve pupa. Döllenmeden yaklaşık 22-24 saat sonra yumurtadan larva (1. larva evresi) çıkar. İki deri değişiminden sonra (2. ve 3. larva evreleri) önce prepupa daha sonra pupa meydana gelir. Yumurtadan ergin bireyin oluşması için geçen süre, yaklaşık 9-10 gündür. *D. melanogaster*'in hayat döngüsü ve ömür uzunluğu sıcaklık (Uysal *et al.* 2008), beslenme (Aşkın *et al.* 2007), popülasyon yoğunluğu, çiftleşme, radyasyon, nem gibi faktörler tarafından farklı şekilde etkilenmektedir (Clark and Rockstein 1964). *Drosophila*'nın yaşam döngüsü Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

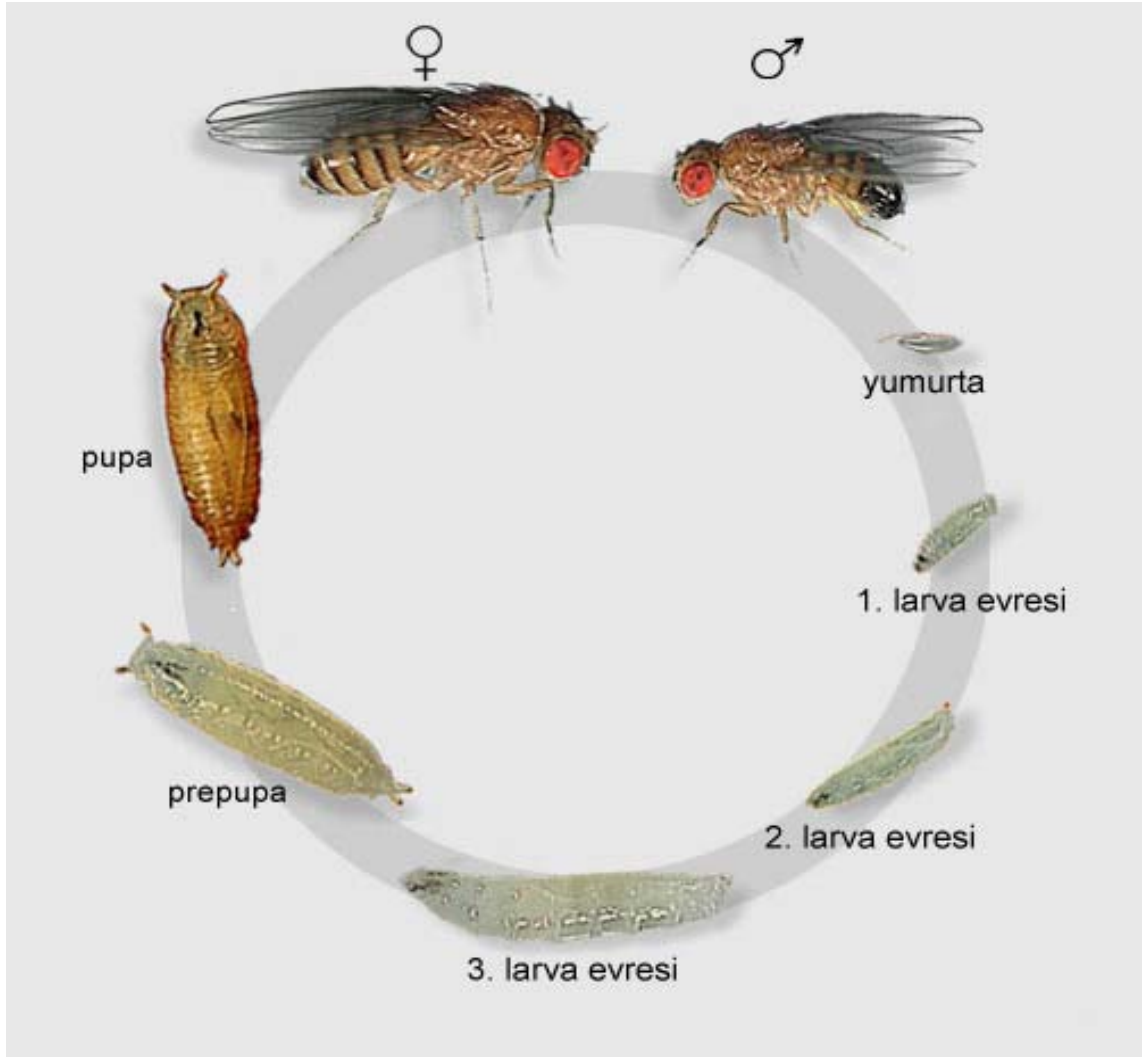
3.1.4. *Drosophila*'yı diğer organizmalara göre üstün kılan özellikleri

1) Genetik denemelerde kullanılan organizmalarda, belirgin bazı farklılıklar (varyasyonlar) görülmelidir. *Drosophila* çok çeşitli doğal ya da yapay varyasyonların gözlenebildiği bir organizmadır. Bu varyasyonları taşıyan mutant bireylerde göz rengi, göz şekli, kıl tipi, vücut rengi, kanat şekli açısından farklı fenotipik özellikleri görebilmek mümkündür. Bu tip zıt karakterleri çıplak gözle ya da binoküler mikroskop altında incelemek oldukça kolaydır.

2) *Drosophila*'nın hayat devri çok kısadır. Yumurtadan çıktıktan sonra yaklaşık 9-10 günde erginleşir ve yeniden üremeye başlar.

3) *Drosophila*'lar ile yapılan bir çaprazlama sonucunda, bir dişi birey günde 40-50 yumurta bırakır. Bu, 10 günlük bir sayım sonucunda toplam 400-500 birey demektir. Yani, bir defada oldukça fazla sayıda döl elde edilir. Bir nesilde elde edilen birey

sayısının fazla olması, onun genetiksel özellikleriyle ilgili bilginin doğru tespit edilmesi ve sonuçların güvenilirliği açısından önemlidir.



Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster*’ in yaşam döngüsü

4) Bir *Drosophila* popülasyonu laboratuvarında kolayca yetiştirilebilir ve besinleri ucuzdur. Kolayca temin edilebilecek malzemeler kullanılarak hazırlanan besi ortamları, araştırmacıya fazla bir maddi külfet getirmez.

5) Kontrollü çaprazlama (araştırmacının kontrolü altında belli özellikleri taşıyan organizmaların çaprazlanması), genetik denemelerde kullanılan çalışma yöntemlerinden biridir. Eğer eşleşmeler kontrol edilebiliyorsa, bir organizmanın genetiğinin

incelenebilmesi çok daha kolaydır. Çaprazlamanın özelliğine bağlı olarak özel ata soylar seçilip eşleşmeleri sağlanır ve elde edilen yavru bireylerin kayıtları birkaç nesil dikkatle kaydedilip, çıkan sonuçlara göre ilgilenilen özelliğin kalıtımı hakkında bir sonuca varılabilir. *Drosophila*, kontrollü çaprazlama yapılabilen en uygun canlılardan biridir.

6) Bu özelliklerden başka, *Drosophila*'nın diğer bir avantajı, mitotik kromozomlardan kolayca ayırt edilebilen ve özellikle larvaların tükrük bezi hücrelerinde görülebilen dev kromozomları (=politen kromozom) taşımasıdır. Bu kromozomlar, sitogenetik olarak, kromozom haritaları ve kromozom fonksiyon analizlerinin yapılmasını sağlar.

7) *Drosophila*'lar özel düzenekler kullanılarak, eterle kolayca bayıltıldıklarından, üzerlerinde çeşitli incelemeler yapılabilmektedir.

8) Promutajen ve prokarsinojenleri test etmek için, ayrıca metabolik aktivasyona gerek yoktur.

Çoğu bileşik doğrudan mutajenik ya da karsinojenik değildir. Ancak, bunlar memeli metabolizmasında karsinojen veya mutajenlere çevrilebilir. Bu tür bileşiklere, promutajenler ve prokarsinojenler denir (Hoffman 1991). Kültüre alınan mikroorganizmalar ve bazı memeli hücreleri, memeli bir organizmanın metabolik aktivasyon sistemlerinin birçoğundan yoksundur. Bu nedenle, mutajenite testlerinde mikroorganizmalar ve memeli hücreleri kullanılırken alternatif metabolik aktivasyon sistemlerine gereksinim duyulur. Fakat *Drosophila* kullanırken böyle bir alternatif metabolik aktivasyon sistemine ihtiyaç yoktur (Graf and Singer 1992).

Yukarıda belirtilen özellikler bakımından *Drosophila*, genetik araştırmalar için ideal bir organizmadır.

3.1.5. *Drosophila* mutant stokları ve kullanılan hatların genetik yapısı

Bu çalışmada, *Drosophila*'nın normal metabolik aktiviteye sahip iki mutant soyu, *mwh* ve *flr*³ soyları kullanılmıştır. Normal metabolik aktiviteye sahip bu hatlar (normal metabolik aktiviteye sahip hatların yanı sıra yüksek metabolik aktiviteye sahip hatlarda bulunmaktadır) Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiş ve Bölümümüz Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda standart Lewis besin ortamında (Lewis and Bacher 1968), *Drosophila* için ideal yaşama koşullarında (25±1°C de ve % 60 bağıl nem) kültüre alınmıştır. Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerin genetik yapısı aşağıdaki gibidir (Lindsley and Zimm 1992).

- *mwh* / *mwh*

- *flr*³ / *In (3LR)TM3, Bd*^s

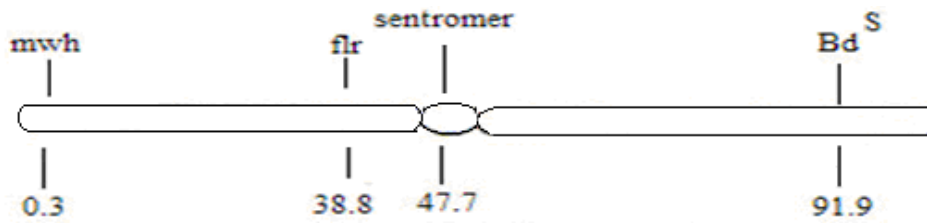
Belirleyici genlerden flare (*flr*³ – 3-38.8) geni, kanatlardaki normal düz ve uzun kıllar yerine, körelmiş, nokta şeklinde kıl oluşturmaktadır. Flare geni homozigot halde iken embriyonik evrede letal etki göstermektedir. Dolayısıyla ergin bireyler oluşamamaktadır. Hem bireyleri flare geninin embriyonik letal etkisinden korumak, hem de rekombinasyonu baskılamak için dengeleyici *TM3* kromozomu kullanılmaktadır. Sonuçların güvenilirliği için gerçek mutant klonların olası varyasyonlardan ayrılması gerekmektedir. Bu nedenle, flare fenotipteki klonlar için dörtten daha fazla sayıdaki hücreler sayıma dahil edilmiştir (Szabad *et al.* 1983). Diğer bir belirleyici gen olan *mwh* (multiple wing hair, 3-0.3) geni, kanat kıllarının aynı hücreden üç veya daha fazla sayıda çıkması şeklinde kendini göstermektedir.

Komşu iki mutant klonun sayımında, eğer iki klon arasında üç ya da daha fazla sayıda yabanıl tip trikoma sahip hücre sırası varsa, bunlar iki farklı klon olarak değerlendirilmişlerdir. Normal kanatlardaki kenarlar düzgün bir şekilde iken, *Bd*^s genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün değildir (Graf and Würgler 1996). Normal ve serrat kanat yapıları Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, kullanılan genetik hatların taşıdığı dengeleyici kromozom (*TM3*), çalışılan kromozom olan üçüncü kromozom üzerindeki rekombinasyonları baskılamaktadır.



Şekil 3.2. *Drosophila*'da normal ve serrat kanat fenotipleri

Çalışmada belirleyici olarak kullanılan *mwh*, *flr*³ ve *Bd*^S genleri *Drosophila*'nın en büyük kromozomu olan üçüncü kromozom üzerinde bulunduğundan (Şekil 3.3), belirleyici genler arasındaki mesafenin uzak olması, rekombinasyon ve mutasyonların büyük aralıkta incelenmesi açısından avantaj sağlamaktadır.



Şekil 3.3. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri

Bu çalışmada, çaprazlamalar sonucunda elde edilen trans-heterozigot larvalar kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Bu çaprazlamaların genotipik gösterimi şu şekildedir.

$$\sigma\sigma \text{ } mwh / mwh \times \text{ } \varphi\varphi \text{ } flr^3/In(3LR) \text{ } TM3, Bd^s$$

Yapılan çaprazlamada flare stoklarının dişi bireylerinin tercih edilmesinin nedeni, yumurta veriminin, *mwh* stoklarının dişilerine göre daha yüksek olmasıdır.

3.1.6. Bitkisel östrojenler

Bu çalışmada, *D. melanogaster* hatlarında bitkisel östrojenlerin (genistein, daidzein, glisitein, koumestrol, kuarsetin ve zearalenone) genotoksik etkilerini saptamak üzere, Graf *et al.* (1984) tarafından geliştirilen kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılmıştır. Çalışmalarımızda kullanılan tüm bitkisel östrojenler %1'lik DMSO'da çözülerek larvalara uygulama yapılmıştır (McClain *et al.* 2006). Ayrıca, bu çalışmada bitkisel östrojenlerin olası olumsuz etkilerinin giderilebilmesi için B vitamini ailesinin bir üyesi olan folik asit kullanılmıştır. Folik asit distile suda çözülerek çalışmalarımızda kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

Son yıllarda *Drosophila*'da somatik genotoksisite test sistemleri hakkında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Üreme hücrelerindeki mutasyonları hedef alan testlerle karşılaştırıldığında, somatik sistemler çok sayıda avantaj sunar (Graf and Würzler 1996). Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir:

a) Bu test sistemlerini hazırlamak için yalnızca bir nesile ihtiyaç vardır.

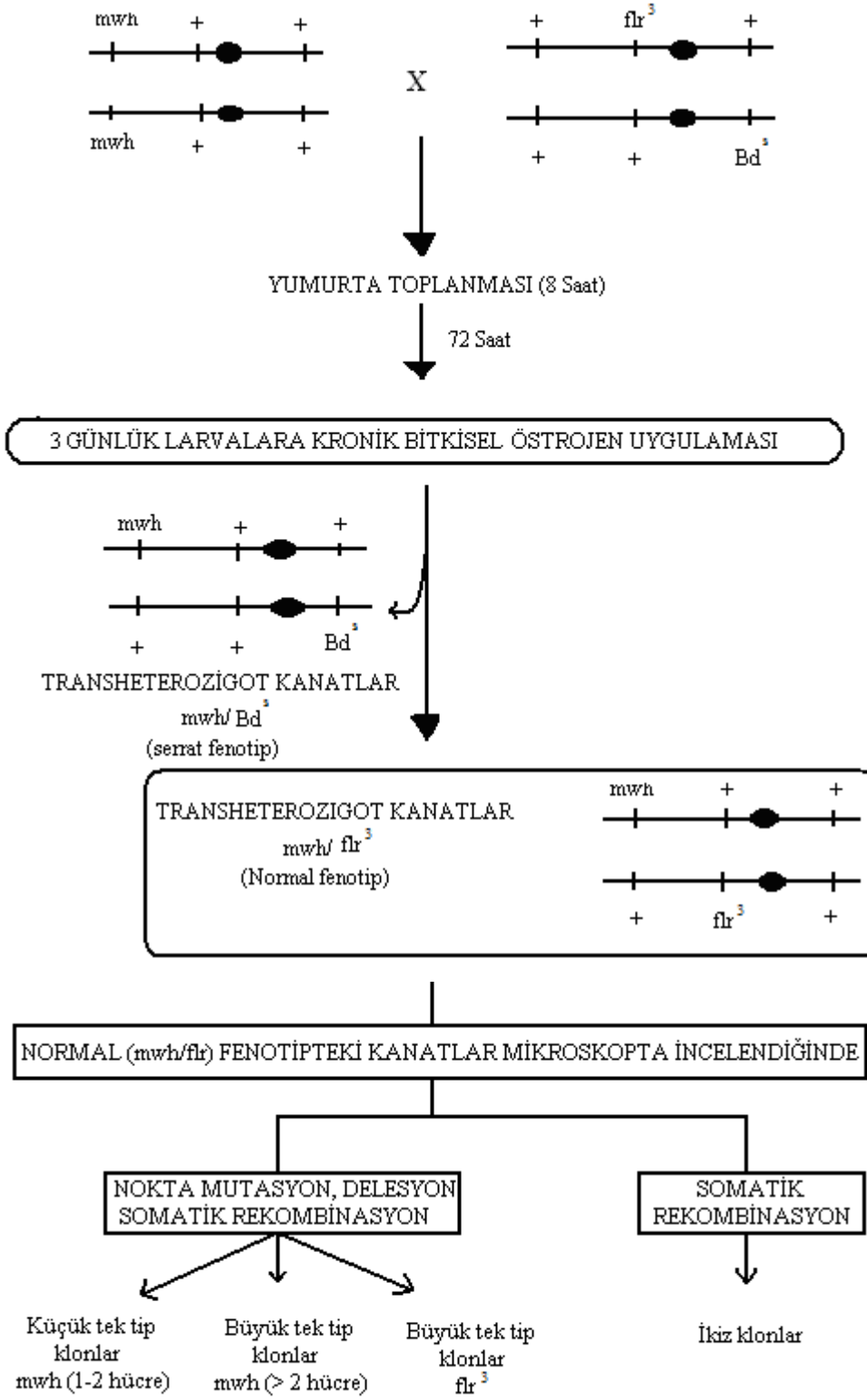
- b) İki uygun somatik doku olan kanat ve gözler tek bir ergin sinekte çok sayıda hücrenin analizine olanak verir.
- c) Genetik işaretler çok kolay fark edilir ve sonuçları kaydetmek basittir.
- d) Hızlı, ekonomik ve güvenilirliği kanıtlanmış testlerdir.

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri, göz benek testi ve kanat benek testi olmak üzere iki tanedir. Bunların her ikisi de nokta mutasyon, delesyonlar, kromozom bozuklukları ve mitotik rekombinasyonun tespit edilmesini sağlar. Bu testler, embriyonik gelişim sırasında farklı imajinal disk hücrelerinden temel alırlar. İmajinal diskler, larval gelişim sırasında mitozla çoğalır ve metamorfoz ile ergin bireyin kanat, göz, bacak gibi farklı vücut yapılarını oluşturur. Somatik test yöntemleri larvanın imajinal disklerinde mitotik olarak çoğalan büyük hücre gruplarını hedef alır. Eğer bu imajinal disk hücrelerinin herhangi birinde bir genetik değişiklik olursa, daha ileri safhada normal fenotipten farklı mutant hücre grupları oluşur. Bu genetik değişiklik fenotipte gözlenebilen bir değişikliğe neden olursa, mutant hücre grupları ergin sineğin kanatlarında ve gözlerinde mutant hücre benekleri (çoklu kıl fenotipi ve kılların körelmesi) oluşur. SMART, uygun gen işaretlerinin heterozigotluğunun kaybını temel alınarak geliştirilmiştir. Böylece, heterozigotluğun herhangi bir mutasyonla kaybedilmesi yabancı fenotipin kaybedilip, mutant fenotipin ortaya çıkmasına neden olur (Graf *et al.* 1984; Guzman-Rincon and Graf 1995). Bu çalışmada, *D. melanogaster*'in kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ya da diğer adıyla kanat benek testi kullanılmıştır.

3.2.2. Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi

Şekil 3.4'de *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi şematik olarak gösterilmiştir. Bu testte fenotipik etkisi kanat üzerinde gözlenebilen iki işaret geni kullanılmaktadır. Bu genlerden çoklu kanat kılı (multipli wing hair) geni, üçüncü kromozomun telomere yakın bölümünde bulunur (3-0.3). Resesif bir gen olup homozigot (*mwh/mwh*) olarak *mwh* stokları olarak yaşatılabilir. Bu gen homozigot olduğu zaman hücre başına bir kanat kılı yerine, çoklu kanat kıllarının oluşumuna neden

DROSOPHILA KANAT SOMATİK MUTASYON ve REKOMBİNASYON TESTİ



Şekil 3.4. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi

olur (Graf *et al.* 1984). Diğer işaret geni *flare* (flr^3) ise kanat kıllarının şeklini etkileyen resesif mutant bir gendir. Bu gen de yine üçüncü kromozom kolunda, fakat sentromere daha yakın (3-38.8) olarak yer alır. *Flare* geninin üç mutant alleli bilinmektedir ve hepsi de homozigot letaldır (flr^3 için homozigot olan zigotlar ergine gelişemez). Fakat heterozigot bir bireyin kanat imajinal disklerindeki homozigot hücreler yaşayabilir ve mutant kanat hücrelerine gelişir. Homozigot letalite nedeni ile flr^3 allelleri birçok inversiyonlar ve yine homozigot letal olan dominant işaret gen taşıyan dengeleyici bir kromozomla birlikte flr^3 /*TM3*, *Bd^s* yaştırılır. Bu stokta kanat kenarları testere dişi şeklindedir (Şekil 3.2). Çalışmamızda, heterozigot larvalara çeşitli mutajenler uygulanmıştır. Bu larvalardan gelişen ergin bireyler, kanatlarında beklenen somatik mutasyonu belirlemek amacı ile analiz edilmiştir ve erginler morfolojik olarak ayırt edilebilen iki farklı fenotipik gruba ayrılmıştır.

a) Trans-heterozigot bireyler (= *mwh/flr³*, normal kanatlı).

b) Dengeleyici-heterozigot bireyler (= *mwh/TM3*, serrat kanatlı).

Dengeleyici-heterozigot bireylerde çok sayıdaki inversiyonlar nedeni ile rekombinasyonlar engellenmiştir (Schaik and Graf 1991). Kanat kıllarında beklenen somatik mutasyonu belirlemek amacı ile kanatlar kesilerek mikroskop altında taranmıştır. Böylece, mutasyon ya da mitotik rekombinasyon sonucu heterozigotluğun kaybedilmesi ile ortaya çıkan mutant hücre klonları araştırılmıştır. Mutant hücre klonları farklı benek gruplarına ayrılarak kaydedilmiştir. Tekli benekler *mwh* veya flr^3 fenotipinde iken, ikili benekler *mwh* ve flr^3 fenotiplerini birlikte taşımaktadır.

Tekli benekler arasında 1-2 hücreli olanlar küçük tekli benek olarak isimlendirilirken 3 ve daha fazla sayıda hücre gruplarından oluşan beneklere ise büyük tekli benekler denilmektedir. Ayrıca, somatik hücrelerde genetik değişikliğin indüksiyon zamanı ve beneklerin büyüklüğü arasında pozitif bir ilişkinin olduğu belirtilmektedir. Eğer mutasyon, hücre bölünmesinin yoğun olduğu erken dönemde olursa, bu mutant hücreden köken alan benekler daha fazla hücre içerecek ve daha büyük olacaktır (Guzman-Rincon and Graf 1995).

İstatistik analizlerde kanat beneklerinin içerik ve büyüklüğüne göre sınıflandırılması (küçük tekli benek, büyük tekli benek ve ikili benek) ile oluşturulan veriler kullanılmaktadır. Tekli benekler *mwh* veya *flr³* fenotipindeki hücrelerden oluşurken ikili benekler ise *mwh* ve *flr³* fenotipini gösteren hücre gruplarının birlikte bulunduğu beneklerdir. Beneklerin farklı tipleri farklı genetik mekanizmalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Tekli benekler, nokta mutasyon, delesyon ve iki işaret gen (*mwh* ve *flr³*) arasındaki mitotik rekombinasyonla oluşurken, ikili benekler 3. kromozomun sentromeri ve *flr³* geni arasındaki somatik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır. Şekil 3.5’de oluşabilecek tüm ihtimaller şematize edilmiştir.

3.2.3. Deney grupları

Bu çalışmada, özellikle Asya ülkelerinde çeşitli gıdalar vasıtasıyla vücuda fazla miktarda alınan 6 farklı bitkisel östrojenin mutajenik ve/veya rekombinojenik özelliklerini saptayabilmek için *Drosophila* mutant stokları kullanılmıştır. Teste tabi tutulan bitkisel östrojenlerden genistein, daidzein ve koumestrol (coumestan) Fluka şirketinden, glisitein Merck şirketinden, folik asit ve zearolenon Sigma şirketinden, kuersetin ise Aldrich şirketinden satın alınmıştır.

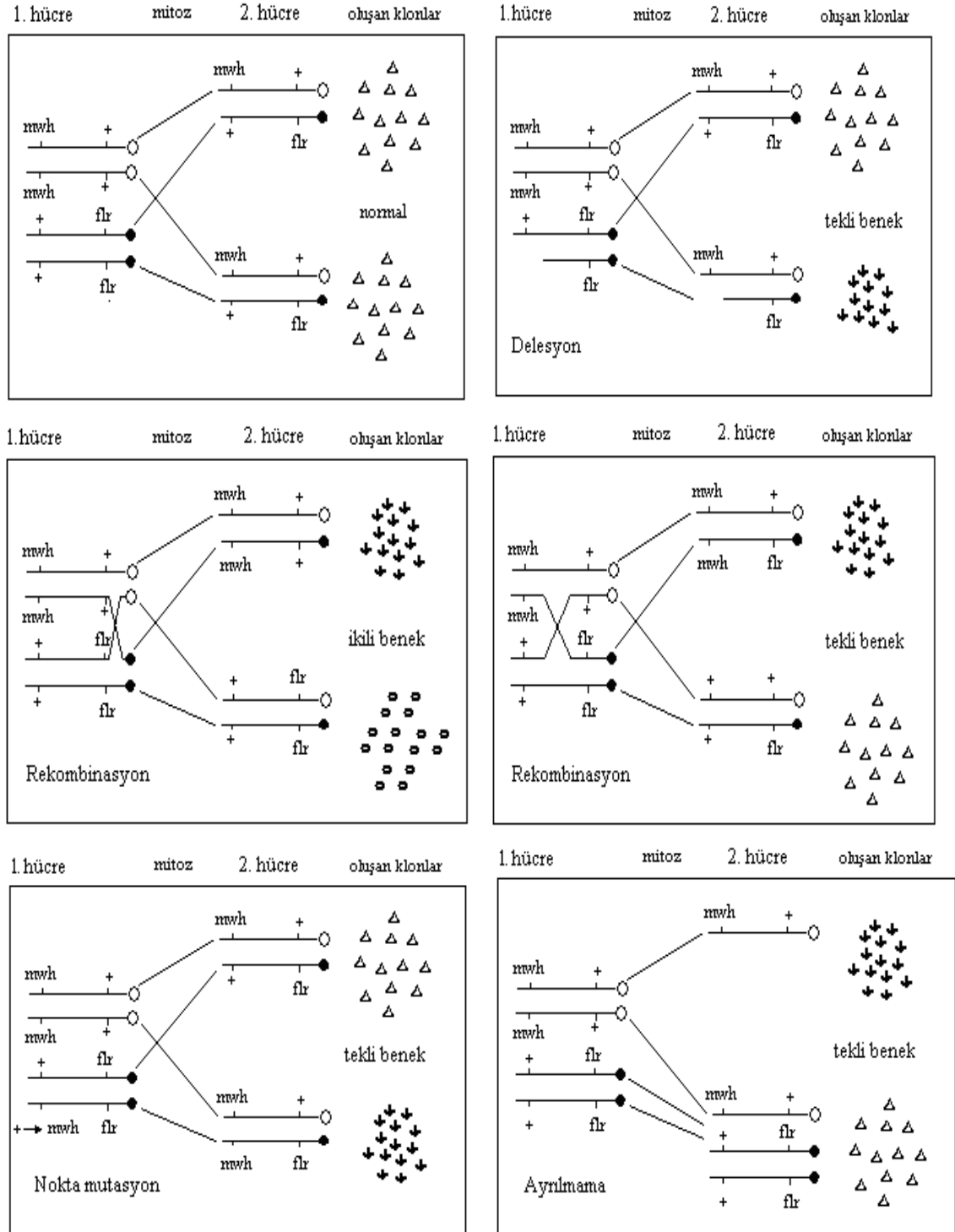
3.2.4. *Drosophila* hatlarının kültürü

Çalışmada kullanılan tüm hatlar, Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden temin edilmiştir. Hatlar Bölümümüzde Genetik Araştırma Laboratuvarı’nda uygun sıcaklık kabinlerinde 200 ml hacimdeki cam şişelerde standart *Drosophila* besini ile kültüre alınmıştır. Standart besin ortamının hazırlanışı EK-1’de verilmiştir.

3.2.5. Çaprazlama için birey seçimi

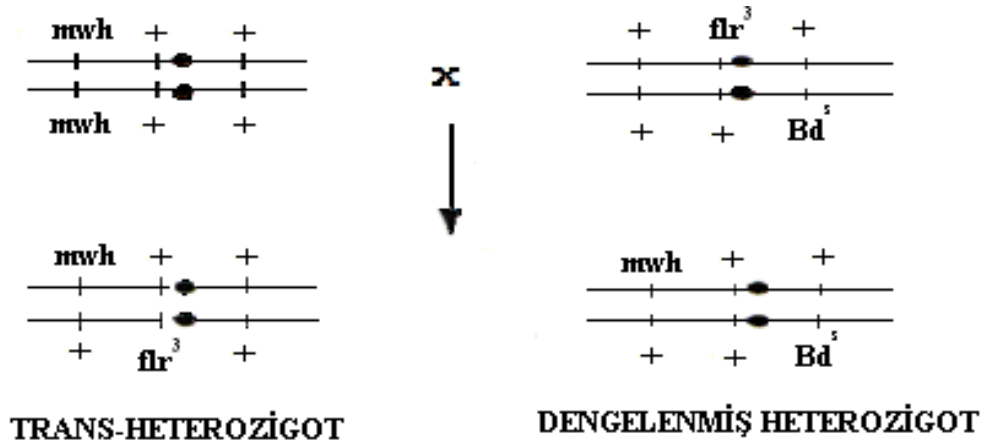
Trans-heterozigot larvaların elde edilmesi için flare dişiler 4’er saat aralıklarla virgin (= bakire) iken toplandı ve yeni bir besin ortamına alındı. Yeterince virgin dişi birey toplandıktan sonra uygulamaların yapılacağı trans-heterozigot larvaların elde

edilebilmesi için her şişede 40 *mwh* erkek, 40 *flr*³ dişi olacak şekilde çaprazlama yapıldı.



Şekil 3.5. Tekli ve ikili beneklerin oluşumuna neden olan farklı genetik mekanizmalar

Oogenezin gerçekleşmesi için erkek ve dişi bireyler en az bir gün süre ile aynı ortamda bırakıldı. Uygulama yapılacak olan larvaların aynı evrede olabilmesi için oogenezi gerçekleştirmiş olan bireylerin 8 saat boyunca yeni bir besin ortamına alınarak bu süre boyunca yumurta bırakmaları sağlandı. Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için defalarca kullanıldı. Trans-heterozigot larvaların elde edilebilmesi için yapılan çaprazlama Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. *mwh/mwh* ve *flr*³/*TM3*, *Bd*⁵ bireyleri arasındaki çaprazlamalar

3.2.6. Bitkisel östrojenlerin uygulanması

Çalışmamızın birinci bölümünde genotoksik etkileri test edilecek olan 6 bitkisel östrojen için dört derişim (1, 2, 5 ve 10mM) çalışıldı. Bu derişimler, bitkisel östrojenlerin genotoksik etkilerini geniş bir spektrumda incelemek için, daha önceki çalışmalarda kullanılan derişimler olarak seçildi (Torres *et al.* 1992). Ancak genistein, daidzein, kuersetin ve zearalenon uygulama gruplarında toksik etkiden dolayı bu konsantrasyonlarda birey elde edilemediği için uygulamalar 1, 3, 5 ve 10µM'lık bir seri halinde uygulandı. Böylece, kanat preparatı hazırlamak için yeterli birey elde edilmiş oldu. Sekiz saat süresince çiftleştirilen ebeveynlerin bıraktığı döllenmiş yumurtalardan çıkan bireyler, üçüncü larva evresine eriştiğinde, musluk suyu altında yıkandı ve elekten geçirilerek ayrıldı. 72±4 saatlik larvaların uygulama ortamı olarak kullanılan cam tüpler içerisine yaklaşık 4.5g kadar hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, ABD) konuldu ve

besinler uygulamadan hemen önce hazırlanmış bitkisel östrojenlerin 9ml'si ile nemlendirildi. Toplanan larvalar her bir cam tüp içerisine 1-2 spatül dolusu (yaklaşık 100 larva) konularak uygulama ortamına alınmış oldular.

Çalışmamızın ikinci aşamasında, tüm bitkisel östrojenler için kullandığımız en yüksek uygulama dozu olan 10 μ M ile birlikte folik asidin 10 μ M dozu larvalara aynı besi ortamında birlikte verilmiştir. Bu amaçla çalışmamızda kullanılan tüm bitkisel östrojenlerin ve folik asidin 20 μ M'lık stok çözeltileri hazırlanmış ve 4.5g *Drosophila* Instant Medium'a ayrı ayrı 4.5ml emdirilmiştir.

Böylece hazırlanan tüm deney ve kontrol grupları, sıcaklığın ve nemin sabit olduğu etüvlerde tutularak, larvalar kronik olarak 48 saat boyunca çeşitli kimyasallara maruz bırakıldılar.

3.2.7. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması

Uygulama ortamında bitkisel östrojenlere maruz bırakılan larvalardan, pupa evresini takiben, çıkan ergin bireyler günlük olarak, eterle bayıltılarak toplanmış ve kanat preparatlarını hazırlamak için bu bireyler %70'lik etil alkole konularak +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu bireyler kanat morfolojilerine göre normal kanatlı (trans-heterozigot *mwh/flr*³) ve serrat kanatlı (dengelenmiş heterozigot *mwh/TM3*, *Bd*^s) olarak iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan normal fenotipe sahip (*mwh/flr*³) olan kanatlar, hem mutasyon, hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonları içermesine karşın, serrat (*mwh/TM3*, *Bd*^s) kanatlar, dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan klonları içermektedir (Zordan *et al.* 1994). Bu nedenle, her iki fenotipteki kanatların da preparatları ayrı ayrı hazırlanarak değerlendirilmiştir. Kanat preparatlarını hazırlamak için Negishi *et al.* (1988) ve Schaik and Graf (1991)'in çalışmalarında kullandıkları "Faure solüsyonu" hazırlanmıştır. Bu solüsyonun hazırlanışı EK-2'de verilmiştir.

Kanat preparatları hazırlanırken çukur lam üzerine faure solüsyonundan bir iki damla konulmuştur. Distile suya alınmış olan her bir sinek, faure solüsyonu damlatılmış çukur lama alınmıştır. Binoküler mikroskop altında ince uçlu pens ile kanatlar vücuda bağlandığı yerden tutularak kanat üzerindeki kıllara ve kanada zarar verilmeyerek vücuttan özenle ayrılmıştır. Her bir bireyin kanadı ayrıldıktan sonra aynı bireye ait kanatlar lam üzerine uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Lam üzerine yeterince kanat çifti (96 adet) yerleştirildikten sonra preparatlar kuruması için tozsuz bir ortamda bir gün bekletilmiştir. Preparatlar kuruduktan sonra lamlara bir iki damla entellan (=kanada balzamu) damlatılarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri lamel (24x60mm) ile kapatılmıştır. Kanatların düzgün bir şekilde kuruması için kapatılan preparatların üzerine 3-4g ağırlığında metal vidalar konmuştur. Birkaç saat bu şekilde bekletilen preparatlar ışık mikroskobunda sayım ve inceleme için hazır hale getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, musluk suyunda yıkanarak ışık mikroskobunda kılların görülmesini engelleyen safsızlıklar temizlenmiştir.

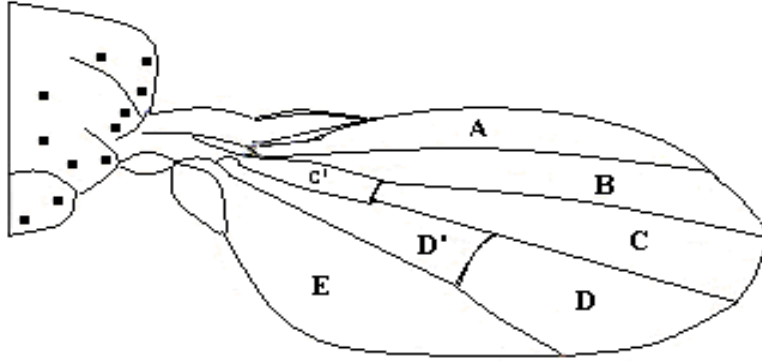
3.2.8. Kanat preparatlarının mikroskop analizi

Temiz bir şekilde hazırlanmış olan kanat preparatları 10X40 büyütmede ışık mikroskobunda incelenmiştir. Kanatların incelenmesinde kolaylık olması açısından kanat üzerindeki sektörler Şekil 3.7'deki gibi A, B, C, C¹, D, D¹, E olarak bölümlere ayrılmıştır. Kanatların mutant klon taşıyıp taşımadığını incelemek için, hem dorsal hem de ventral yüzeydeki hücre tabakaları ayrı ayrı incelenmiştir. Kanat yüzeyindeki her bir sektör ayrı ayrı taranarak *mwh* ve/veya *flr* mutant fenotipler sayılarak kayıtları tutulmuştur. Sayımda kayıtları tutulan mutant klonlar:

- Küçük tek tip klon (1-2 *mwh* hücre)
- Büyük tek tip klon (≥ 3 *mwh* veya ≥ 4 *flr* hücre)
- İkiz klon (*mwh* ve *flr* hücrelerin ikisini de yan yana aynı klonda içeren klonlar)

Bu sınıflandırmanın biyolojik açıdan anlamlı olduğu Graf *et al.* (1984) tarafından gösterilmiştir. Sınıflandırmada küçük tek tip klonlar yalnızca *mwh* hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 4.3). Çünkü varyasyonla oluşan ve flare gibi görünen hücreleri mutantlardan ayırmak için sayıma 4'den daha fazla sayıdaki flare hücreler dahil

edilmiştir (Graf *et al.* 1984). Bu nedenle, küçük tek tip klonlar sadece *mwh* klonları içermektedir. Büyük tek tip klonlar ise Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de görüldüğü gibi, 3 veya daha fazla *mwh* ya da flare mutant hücrenin oluşturduğu klonlardır.



Şekil 3.7. Kanat sektörlerinin sematik görünümü

İkiz klonlar, *mwh* ve flare hücreler aynı klon içerisinde dağılmış olarak bulunduğu durumda oluşan klonlardır (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). İkiz klon, *mwh* ve flare hücrelerin yan yana iki ayrı klon olarak bulunmasıyla da oluşabilir. Ancak, yan yana bulunan *mwh* ve flare klonların arasındaki yabancı tip trikominin sayısı üçü geçmiyorsa aynı klon içerisinde değerlendirilerek ikiz klon denilmektedir. *mwh* klonlar nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama, ve rekombinasyon sonucu oluşmaktadır. Flare klonlar ve ikiz klonlar ise flare geni ile sentromer arasında gerçekleşen rekombinasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Normal kanatlı bireylerde görülebilecek değişik genetik olayların şematik gösterimi Şekil 3.5’de verilmiştir.

3.2.9. Klon indüksiyon frekansı ve rekombinasyon miktarının hesaplanması

Kronik uygulamada, her hücrede ve her hücre bölünmesindeki indüksiyon frekansı aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır (Szabad *et al.* 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^{-5}$$

Bu denkleme göre, sadece *mwh* klonları göz önüne aldığımızda, denklemdaki “f” *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “n” gözlenmiş olan toplam *mwh* klon

sayısını, “N” analiz edilmiş olan kanat sayısını ve “C” bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göster mektedir. Bir kanat üzerinde incelenebilecek hücre sayısının önceki çalışmalarla 24.400 olduğu bilinmektedir (Würgler and Vogel 1986).

Çaprazlamalar sonucunda oluşan trans-heterozigot larvalardan gelişen bireyler, kanat bakımından normal ve serrat kanat olmak üzere, iki farklı fenotipte gözlenmektedir. Serrat kenarlı kanatlara sahip bireylerde bulunan dengeleyici kromozomun varlığı, bu kromozom parçası üzerine yerleştirilmiş dominant mutant bir gen olan Serrate (Ser) sayesinde tespit edilebilmektedir. Dengeleyici kromozomun (*TM3*) rekombinasyonu baskılaması nedeniyle bu fenotipe sahip bireylerde gözlenen mutant klonlar, sadece mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Böylece, serrat kanatlı bireylerden elde edilen verilerle normal kanatlı bireylerden elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla çalışmada kullanılan ajanın mutajenik ve/veya rekombinojenik etkileri ayrı ayrı tespit edilebilmektedir (Vogel 1992; Frei and Würgler 1996). Gerçekleşen rekombinasyon yüzdesi şu şekilde hesaplanmaktadır.

$$\% \text{ rekombinasyon} = \frac{a - b}{b} \times 100$$

Formülde;

a: normal fenotipteki kanatlarda gözlenen *mwh* sektörlerinin frekansı

b: serrat fenotipteki kanatlarda gözlenen *mwh* sektörlerinin frekansı

3.2.10. Verilerin değerlendirilmesi

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilirken orijinal (null) hipotez (H_0)’de uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayılmıştır. Alternatif hipotez (H_a)’de ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan m defa daha fazla olduğu varsayılmıştır. Orijinal ve alternatif hipotezlerin Binomial Şartlı Test kullanılarak hesaplanmasıyla sonuçlar; pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) ve negatif (-) olarak gösterilmiştir (Çizelge 3.1) (Selby and Olsen 1981; Frei and Würgler 1988).

Çizelge 3.1. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		H_A (Alternatif)	
		KABUL(1-β)	RED(β)
H₀ (Null)	KABUL (1-α)	ÖNEMSİZ FARK $P=(1-\alpha)(1-\beta)= 1-\alpha-\beta + \alpha\beta$	NEGATİF $P=(1-\alpha)\beta= \beta-\alpha\beta$
	RED (α)	POZİTİF $P=\alpha(1-\beta)= \alpha- \alpha\beta$	ZAYIF POZİTİF $P=\alpha\beta$

Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesine karar verilirken Kastenbaum and Bowman (1970)'in çizelgesinden yararlanıldı. Hipotezlerin kurulması sırasında yapılan hesaplamalarda kullanılan parametreler aşağıda verilmiştir.

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_o) için

$P_o = N_c / (N_c + N_t)$

q_o= uygulama grubunda beklenen mutant klon frekansı, Orijinalhipotez (H_o) 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_{on}= Kontrol grubunda beklenen mutant klon sayısı,Orijinal hipotez (H_o) için

q_{on}= Uygulama grubunda beklenen mutant klon sayısı, Orijinal hipotez (H_o) 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 hazırlanmış olan bilgisayar programı Microsta ile öncelikle yukarıda verilen parametreler hesaplandı. Hesaplama sonucunda, eğer uygulama grubundaki (nt) mutant klon sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse Ho red edildi. Aynı şekilde, kontrol grubundaki (nc) mutant klon sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse Ha red edildi.

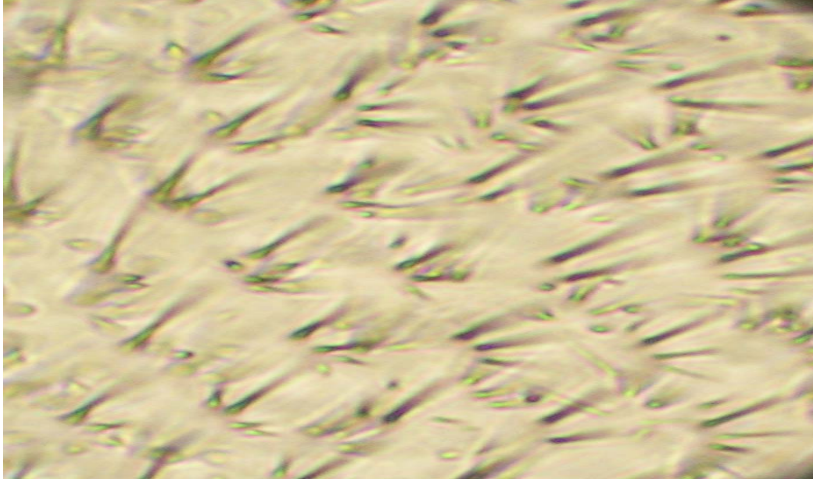
Ho ve Ha'nın kabul veya red edilmesine göre Çizelge 3.1 kullanılarak sonuçlar pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada, insan ve hayvanların beslenmesinde kullanılan doğal ve kültüre alınmış bitkilerde biyolojik etkileri birbirine benzeyen 6 farklı bitkisel östrojenin (genistein, daidzein, glisitein, koumestrol, kuersetin ve zearalenone) olası mutajenik etkileri *D. melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılmıştır. Genotoksik etkileri değerlendirilen bitkisel östrojenlerin her bir derişimi için dengeleyici kromozom (*TM3*) taşıyan serrat kanatlı bireylerden ve dengeleyici kromozom taşımayan normal kanatlı bireylerden kanat preparatı hazırlanarak incelemeleri yapılmıştır. Etkileri araştırılan maddelerden elde edilen sonuçların tümü çizelgelerde verilmiştir.

4.1. *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular

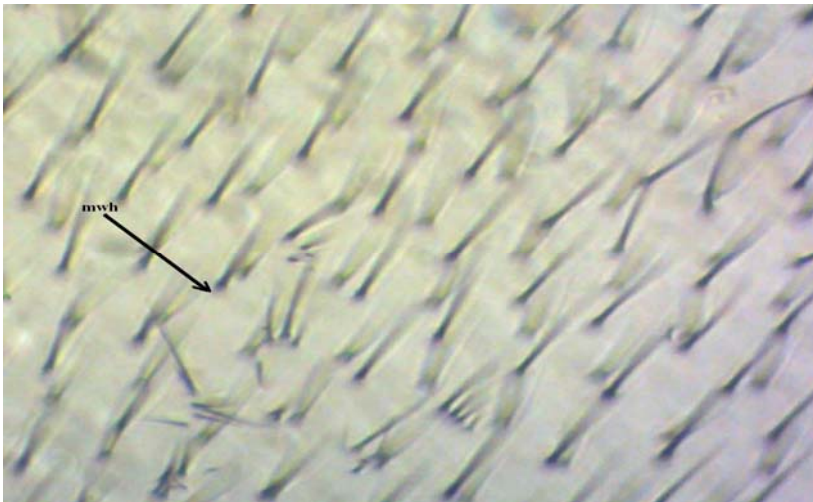
Bu amaçla Bölüm 3'te anlatılan deney sistemleri kurulmuştur. Deneylerde negatif kontrol grubu olarak distile su ve DMSO, pozitif kontrol grubu olarak da mutajenik etkisi bilinen EMS kullanılmıştır. Çalışmaların ilk aşamasında 72±4 saatlik larvalardan ergine gelişen trans-heterozigot ergin bireylerin kanatları beneklerin varlığını belirlemek için ışık mikroskopunda 400X büyütme ile taranmıştır. Çalışmalar sırasında gözlenen kanat benekleri sınıflandırılarak kaydedilmiştir. Buna göre, yalnızca *mwh* (Şekil 4.2) veya *flr* fenotipinde olan hücreler tekli benek ve *mwh* ve *flr* fenotipindeki hücrelerin yan yana bulunduğu hücreler ise ikili benek olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca, tekli beneklerde kendi aralarında küçük tekli benek (1-2 hücreli) ve büyük tekli benek (üç ve daha fazla hücreli) olmak üzere ayrılmıştır. Çalışmalarımız sırasında çeşitli preparatlarda gözlediğimiz küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz beneklerin fotoğrafları çekilmiş ve bunlar Şekil 4.1- Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



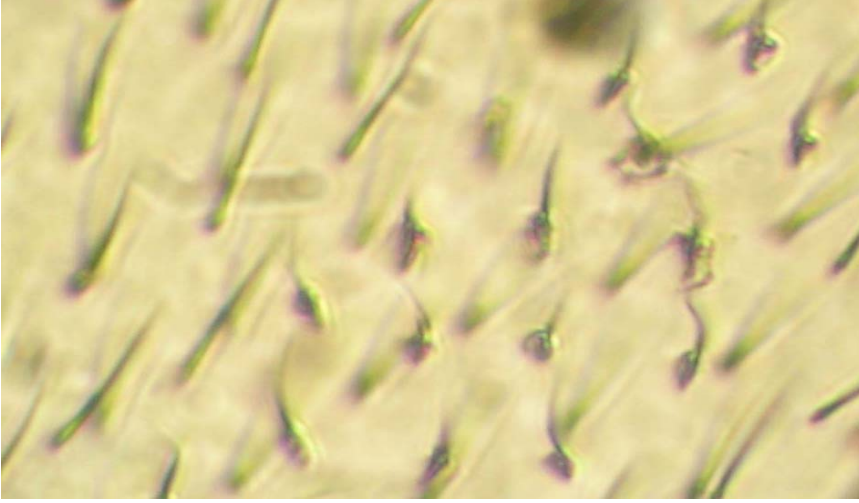
Şekil 4.1. *mwh* fenotipi



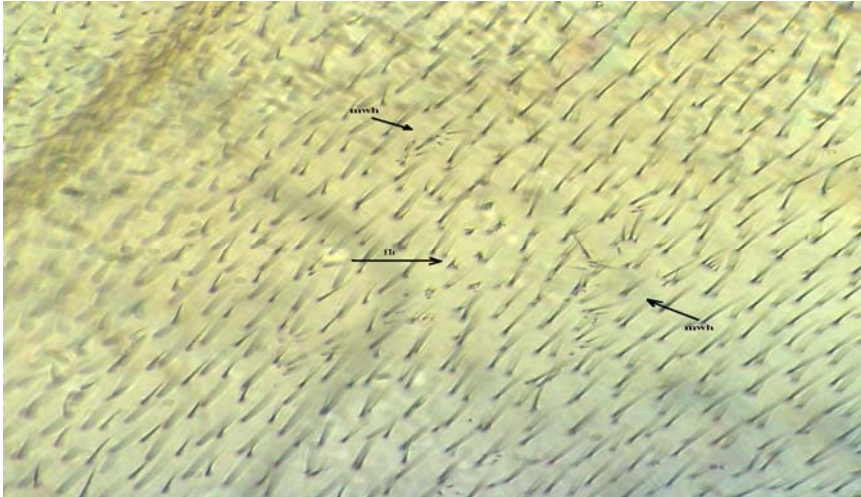
Şekil 4.2. *mwh* fenotipindeki küçük tekli benek



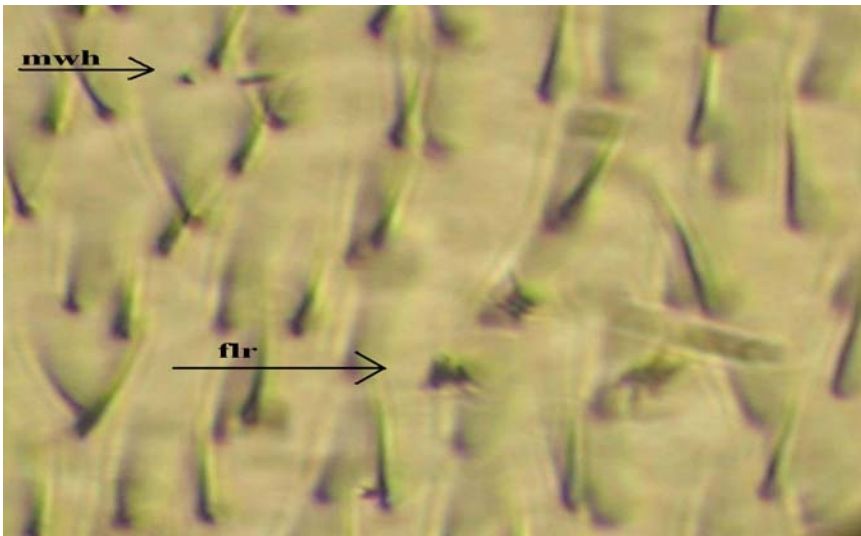
Şekil 4.3. *mwh* fenotipindeki büyük tekli benek



Şekil 4.4. *flr* fenotipindeki büyük tekli benek



Şekil 4.5. İkili benek(a)



Şekil 4.6. İkili benek(b)

4.1.1. Distile su, DMSO ve EMS'nin genotoksik etkilerinin araştırılması

Çalışmalarımızda distile su ve DMSO negatif kontrol, EMS ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu üç maddenin etkileri hem normal kanatlı bireyler, hem de serrat kanatlı bireyler için Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Distile suda kendiliğinden oluşan (spontan) mutasyon frekansı, normal kanat fenotipine sahip bireyler için 0.15, serrat kanatlı bireyler için ise 0.23 olarak hesaplanmıştır. EMS, tespiti yapılan tüm klonlar (küçük tek tip klonlar, büyük tek tip klonlar, ikiz klonlar, toplam *mwh* klonları ve toplam klonlar) açısından pozitif sonuçlar gösterirken, DMSO ise distile su ile karşılaştırıldığında, tüm durumlar için önemsiz fark ($P>0.05$) göstermektedir (Çizelge 4.1). Kullanılan tüm bitkisel östrojenler DMSO'da çözöldüğü için, istatistiksel değerdendirmeler bu gruba göre yapılmıştır.

4.1.2. Genistein'in genotoksik etkisinin araştırılması

Çalışmalarımızda kullandığımız genistein, izoflavonlar içinde yer almakta ve özellikle soya fasülyesinde ve soya temelli gıdalarda doğal olarak bulunmaktadır. DMSO'da çözölererek farklı konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler larvaların beslenmesinde kullanılan *Drosophila* Instant Medium'a katılmış ve uygulama için en uygun evre olan üçüncü larva evresindeki (72 saat) larvalar kronik uygulamaya bırakılmıştır. Bölüm 3.2.6'da da belirtildiği gibi, genistein uygulaması için ilk önce seçilen 1, 2, 5, 10mM derişimler *Drosophila* larva ve pupalarında toksik etki yaptığı için (Şekil 4.7) en yüksek doz 10µM olarak belirlenmiş ve bu konsantrasyonun dilisyonu ile sırasıyla 1, 3 ve 5µM'lık uygulama dozları çalışılmıştır. Bu uygulama dozlarının kullanıldığı gruplarda *mwh/flr³* ve *mwh/TM3* çaprazlarından elde edilen bulgular Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'de de göröldüğü gibi, genistein standart çaprazında (*mwh/flr³*) 1µM doz DMSO grubu ile karşılaştırıldığında, tüm klon tiplerinde fark önemsizdir ($P>0.05$). Ancak, konsantrasyon artışına bağılı olarak, özellikle küçük tek tip (Şekil 4.2), toplam *mwh* ve toplam klonlarda pozitif sonuçlar gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Distile su, EMS ve DMSO'nun *Drosophila melanogaster*'in *mwh/flr³* ve *mwh/TM3* hatlarına etkileri

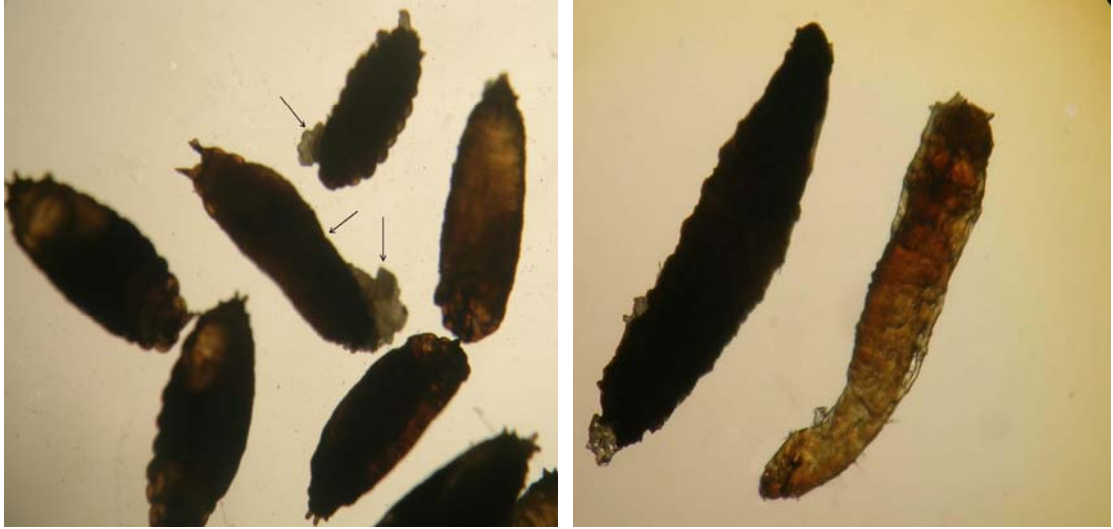
Uygulama Dozu (μM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (≥2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar(m=5)			Σ mwh klonlar (m=2)			Σ klonlar(m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
<u>Normal Kanat (mwh/flr³)</u>																	
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 EMS	80	31	(0.39)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
1 DMSO	80	13	(0.16)	i	1	(0.01)	i	0	(0.00)	i	14	(0.18)	i	14	(0.18)	i	0.72
<u>Serrat Kanat (mwh/TM3)</u>																	
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 EMS	80	34	(0.43)	+	12	(0.15)	+				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
1 DMSO	80	16	(0.20)	i	4	(0.05)	-				20	(0.25)	i	20	(0.25)	i	1.02

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würgler (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçların gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı (10⁵ hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*, çarpım faktörü; b, Dengeleyici *TM3*kromozomu, *flr³* mutasyonu taşımaz. EMS, etil metan sülfonat; DMSO, dimetil sülfoksit. Olasılık düzeyi= 0.05.

Çizelge 4.2. Genistein'in *Drosophila melanogaster*'in mwh/flr^3 ve $mwh/TM3$ hatlarına etkileri

Uygulama Dozu (μM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (≥2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar(m=5)			Σ mwh klonlar (m=2)			Σ klonlar(m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Normal Kanat (mwh/flr ³)																	
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 EMS	80	31	(0.39)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
1 DMSO	80	13	(0.16)		1	(0.01)		0	(0.00)		14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
10 FA	80	14	(0.18)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	17	(0.21)	i	18	(0.23)	i	0.87
1 GN	80	15	(0.19)	i	1	(0.01)	i	1	(0.01)	i	16	(0.20)	i	17	(0.21)	i	0.82
3 GN	80	23	(0.29)	i	3	(0.04)	i	0	(0.00)	i	26	(0.33)	+	26	(0.33)	+	1.33
5 GN	80	28	(0.35)	+	5	(0.06)	i	4	(0.05)	i	32	(0.40)	+	37	(0.46)	+	1.64
10 GN	80	33	(0.41)	+	7	(0.09)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
Serrat Kanat (mwh/TM3)																	
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 EMS	80	34	(0.43)	+	12	(0.15)	+				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
1 DMSO	80	16	(0.20)		4	(0.05)					20	(0.25)		20	(0.25)		1.02
10 FA	80	9	(0.11)	-	2	(0.03)	-				11	(0.14)	-	11	(0.14)	-	0.56
1 GN	80	11	(0.14)	-	3	(0.04)	-				14	(0.18)	-	14	(0.18)	-	0.72
3 GN	80	17	(0.21)	i	6	(0.08)	i				23	(0.29)	i	23	(0.29)	i	1.18
5 GN	80	20	(0.25)	i	9	(0.11)	i				29	(0.36)	i	29	(0.36)	i	1.49
10 GN	80	25	(0.31)	i	12	(0.15)	+				37	(0.46)	+	37	(0.46)	+	1.84

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würdler (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçların gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı (10^5 hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m, çarpım faktörü; b, dengeleyici *TM3* kromozomu, flr^3 mutasyonu taşımaz. GN, genistein; FA, Folik asit; Olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 4.7. Genistein, daidzein, kuersetin ve zearalenonun yüksek derişimlerden etkilenen larva ve pupalar

Büyük tek tip (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) ve ikiz klonlar (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) DMSO grubu ile karşılaştırıldığında (10 μ M genistein uygulaması hariç), farkın önemsiz olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2). 1 μ M'lık genistein uygulaması sonucu oluşan klon indüksiyon frekansı 0.82 iken, 10 μ M'lık en yüksek genistein uygulama grubunda bu değer 2.05'e kadar yükselmiştir. Diğer taraftan, dengeleyici kromozoma sahip *mwh/TM3* genotipindeki bireylerde toplam mutant klonların frekansı, DMSO grubu ile karşılaştırıldığında negatif ya da önemsiz olarak gözlenmiştir (10 μ M deney grubu hariç). Sonuç olarak, genistein özellikle standart çaprazda konsantrasyon artışına bağlı olarak pozitif sonuçlar göstermiştir.

4.1.3. Daidzein'in genotoksik etkisinin araştırılması

Genistein gibi bir primer izoflavon olan daidzeinin de 1, 2, 5 ve 10mM'lık derişimleri *Drosophila* larvaları üzerinde aşırı toksik etki gösterdiğinden, canlı birey elde edilememiştir. Bu nedenle, DMSO'da çözülerek dört farklı dozda hazırlanan daidzein (1, 3, 5, 10 μ M), larvaların beslenmesinde kullanılan *Drosophila* Instant Medium'a emdirilmiş ve 72 saatlik larvalar kronik uygulamaya bırakılmıştır. Uygulama gruplarına ait normal kanat ve serrat kanat preparatlarından elde edilen bulgular, Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Daidzein'in *Drosophila melanogaster*'in *mwh/flr*³ ve *mwh/TM3* hatlarına etkileri

Uygulama Dozu (µM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (≥2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar(m=5)			Σ mwh klonlar (m=2)			Σ klonlar(m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
<u>Normal Kanat (mwh/flr³)</u>																	
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 EMS	80	31	(0.39)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
1 DMSO	80	13	(0.16)		1	(0.01)		0	(0.00)		14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
10 FA	80	14	(0.18)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	17	(0.21)	i	18	(0.23)	i	0.82
1 DZ	80	17	(0.21)	i	1	(0.01)	i	3	(0.04)	i	18	(0.23)	i	21	(0.26)	i	0.87
3 DZ	80	16	(0.20)	i	2	(0.03)	i	3	(0.04)	i	18	(0.23)	i	21	(0.26)	i	0.87
5 DZ	80	28	(0.35)	+	7	(0.09)	+	5	(0.06)	+	34	(0.43)	+	40	(0.50)	+	1.74
10 DZ	80	35	(0.44)	+	4	(0.05)	i	3	(0.04)	i	39	(0.49)	+	42	(0.53)	+	2.00
<u>Serrat Kanat (mwh/TM3)</u>																	
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 EMS	80	34	(0.43)	+	12	(0.15)	+				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
1 DMSO	80	16	(0.20)		4	(0.05)					20	(0.25)		20	(0.25)		1.02
10 FA	80	9	(0.11)	-	2	(0.03)	-				11	(0.14)	-	11	(0.14)	-	0.56
1 DZ	80	15	(0.19)	-	3	(0.04)	-				18	(0.23)	-	18	(0.23)	-	0.92
3 DZ	80	16	(0.20)	-	5	(0.06)	i				21	(0.26)	-	21	(0.26)	-	1.08
5 DZ	80	19	(0.24)	i	4	(0.05)	-				23	(0.29)	-	23	(0.29)	-	1.18
10 DZ	80	25	(0.31)	i	8	(0.10)	i				33	(0.41)	+	33	(0.41)	+	1.69

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würger (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçların gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı (10⁵ hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m, çarpım faktörü; b, dengeleyici *TM3* kromozomu, *flr*³ mutasyonu taşımaz. DZ, daidzein; FA, Folik asit; Olasılık düzeyi= 0.05.

Daidzeinin *mwh/flr³* genotipinde çalışılan dört derişim için sonuçlar küçük tek tip klonlar açısından değerlendirildiğinde, 1 ve 3µM dozlarda sonuç kontrole göre önemsiz, 5 ve 10µM daidzein dozlarında ise sonuç kontrole göre pozitif olmaktadır. Büyük tek tip (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) ve ikiz klon (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) oluşumunda sonuçlar, 5µM doz hariç diğer dozlar için önemsizdir ($P>0.05$). Toplam *mwh* ve toplam klonlar incelendiğinde, sonuçların küçük tek tip klonları için elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Daidzeinin farklı dozları uygulanarak elde edilen normal kanat fenotipine ait klon indüksiyon frekansı, DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında, bu değerin uygulama gruplarında 0.87'den 2.00'a kadar arttığı hesaplanmıştır.

Serrat kanat fenotipine sahip kanatlarda ise daidzein bütün klonlarda ya önemsiz ya da negatif sonuç göstermiştir. Sadece 10µM daidzein, toplam *mwh* ve toplam klon oluşumunda pozitif etkili olmuştur (Çizelge 4.3). Serrat kanatların indüksiyon frekansı 10µM daidzein uygulaması sonucu 1.69 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, pozitif kontrolün klon indüksiyon frekansından daha düşük bir değere sahiptir. EMS için bu değer 2.36'dır. Sonuçlara genel olarak bakıldığında, daidzein dozlarının özellikle standart çapraz için pozitif, *mwh/TM3* çaprazı için ise önemsiz veya negatif olduğu görülmektedir.

4.1.4. Glisitein'in genotoksik etkisinin araştırılması

Diğer izoflavonlara göre daha az östrojenik etkiye sahip olan glisitein için elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.4'de görülmektedir. Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi, glisiteinin normal kanatlara sahip *mwh/flr³* genotipindeki bireylerde hiçbir doz için pozitif sonuç gözlenmemiştir. Tüm klon frekanslarına bakıldığında, sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir. Uygulama gruplarındaki (1-10µM) toplam klonlar 0.19 ile 0.21 arasında değişim göstermektedir. Bu sonuçlar, DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Benzer durum *mwh/TM3* genotipine sahip serrat kanatlar için de geçerlidir. Normal kanatlı bireylerden elde edilen klon indüksiyon frekans sonuçları 0.72 ile 0.82 arasında değişirken, serrat kanatlı bireyler için klon indüksiyon frekansının 0.67 ile 1.18 arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Glisitein'in *Drosophila melanogaster*'in *mwh/flr³* ve *mwh/TM3* hatlarına etkileri

Uygulama Dozu (μM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (≥2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar(m=5)			Σ mwh klonlar (m=2)			Σ klonlar(m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
<u>Normal Kanat (mwh/flr³)</u>																	
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 EMS	80	31	(0.39)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
1 DMSO	80	13	(0.16)		1	(0.01)		0	(0.00)		14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
10 FA	80	14	(0.18)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	17	(0.21)	i	18	(0.23)	i	0.87
1 GL	80	12	(0.15)	-	4	(0.05)	i	1	(0.01)	i	16	(0.20)	i	17	(0.21)	i	0.82
3 GL	80	11	(0.14)	-	3	(0.04)	i	2	(0.03)	i	14	(0.18)	-	16	(0.20)	i	0.72
5 GL	80	14	(0.18)	i	1	(0.01)	i	1	(0.01)	i	15	(0.19)	i	16	(0.20)	i	0.77
10 GL	80	11	(0.14)	-	4	(0.05)	i	0	(0.00)	i	15	(0.19)	i	15	(0.19)	i	0.77
<u>Serrat Kanat (mwh/TM3)</u>																	
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 EMS	80	34	(0.43)	+	12	(0.15)	+				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
1 DMSO	80	16	(0.20)		4	(0.05)					20	(0.25)		20	(0.25)		1.02
10 FA	80	9	(0.11)	-	2	(0.03)	-				11	(0.14)	-	11	(0.14)	-	0.56
1 GL	80	10	(0.13)	-	3	(0.04)	-				13	(0.16)	-	13	(0.16)	-	0.67
3 GL	80	13	(0.16)	-	4	(0.05)	-				17	(0.21)	-	17	(0.21)	-	0.87
5 GL	80	17	(0.21)	i	6	(0.08)	i				23	(0.29)	-	23	(0.29)	-	1.18
10 GL	80	15	(0.19)	-	5	(0.06)	i				20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1.02

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würzler (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçların gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı (10⁵ hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m, çarpım faktörü; b, dengeleyici *TM3* kromozomu, *flr³* mutasyonu taşımaz. GL, glisitein; FA, Folik asit; Olasılık düzeyi= 0.05.

4.1.5. Koumestrol'ün genotoksik etkisinin araştırılması

Koumestrol (=coumestrol), fitokimyasallardan organik bir bileşiktir ve koumestanlar olarak bilinir. Standart çaprazlama sonucu elde edilen trans-heterozigot larvalara koumestrolün uygulaması ile elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiği zaman, normal kanat fenotipine sahip *mwh/flr³* genotipli bireylere ait değerlerin glisiteinden elde edilen değerlere benzediği ve önemsiz farkların elde edildiği görülmektedir. Sadece, 1µM uygulamadaki küçük tek tip ile 3µM uygulamadaki küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klonlardan elde edilen sonuçlar, DMSO kontrol grubundan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak negatif sonuçlar elde edilmiştir ($P>0.05$).

Klon indüksiyon frekansları da kontrolden elde edilen sonuçlara yakındır. DMSO grubundan elde edilen KİF 0.72 iken, 5µM koumestrol uygulaması sonucu elde edilen KİF 0.92'dir. Bu iki değer arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($P>0.05$). Serrat kanat fenotipinden elde edilen sonuçlarda da herhangi bir pozitif farka rastlanmamıştır. Sonuçlar ya negatif ya da önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.5).

4.1.6. Kuersetin'in genotoksik etkisinin araştırılması

Kuersetin çalışmamızda kullandığımız diğer bitkisel östrojenlere göre en fazla toksik etki gösteren madde olmuştur. Kuersetin uygulamasının sonuçları, Çizelge 4.6'da hem *mwh/flr³*, hem de *mwh/TM3* genotipleri için gösterilmiştir.

Kuersetinin *mwh/flr³* genotipli erginlerde sadece 1 ve 5µM uygulamasında büyük tek tip klon sayıları ve 1µM uygulamasında ikiz klon sayıları DMSO kontrole göre önemsiz çıkarken, diğer tüm doz ve klonlarda pozitif sonuçlar görülmüştür (Çizelge 4.6). 10µM kuersetin uygulamasında toplam klon frekansı % 0.89 ile kullandığımız diğer bitkisel östrojenler arasında en yüksek değer olarak bulunmuştur. Yine aynı uygulama grubu için toplam klon sayısı 71 ve klon indüksiyon frekansı da 3.28 olarak gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. Koumestrol'ün *Drosophila melanogaster*'in mwh/flr^3 ve $mwh/TM3$ hatlarına etkileri

Uygulama Dozu (μM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (≥2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar(m=5)			Σ mwh klonlar (m=2)			Σ klonlar(m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
<u>Normal Kanat (mwh/flr³)</u>																	
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 EMS	80	31	(0.39)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
1 DMSO	80	13	(0.16)		1	(0.01)		0	(0.00)		14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
10 FA	80	14	(0.18)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	17	(0.21)	i	18	(0.23)	i	0.82
1 KM	80	11	(0.14)	-	4	(0.05)	i	0	(0.00)	i	15	(0.19)	i	15	(0.19)	i	0.77
3 KM	80	9	(0.11)	-	2	(0.03)	i	2	(0.03)	i	11	(0.14)	-	13	(0.16)	-	0.56
5 KM	80	17	(0.21)	i	1	(0.01)	i	3	(0.04)	i	18	(0.23)	i	21	(0.26)	i	0.92
10 KM	80	15	(0.19)	i	0	(0.00)	i	1	(0.01)	i	15	(0.19)	i	16	(0.20)	i	0.77
<u>Serrat Kanat (mwh/TM3)</u>																	
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 EMS	80	34	(0.43)	+	12	(0.15)	+				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
1 DMSO	80	16	(0.20)		4	(0.05)					20	(0.25)		20	(0.25)		1.02
10 FA	80	9	(0.11)	-	2	(0.03)	-				11	(0.14)	-	11	(0.14)	-	0.56
1 KM	80	11	(0.14)	-	3	(0.04)	-				14	(0.18)	-	14	(0.18)	-	0.72
3 KM	80	16	(0.20)	-	5	(0.06)	i				21	(0.26)	-	21	(0.26)	-	1.08
5 KM	80	15	(0.19)	-	3	(0.04)	-				18	(0.23)	-	18	(0.23)	-	0.92
10 KM	80	12	(0.15)	-	7	(0.09)	i				19	(0.24)	-	19	(0.24)	-	0.97

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würdler (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçların gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı (10^5 hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m, çarpım faktörü; b, dengeleyici $TM3$ kromozomu, flr^3 mutasyonu taşımaz. KM, koumestrol; FA, Folik asit; Olasılık düzeyi= 0.05.

Çizelge 4.6. Kuersetin'in *Drosophila melanogaster*'in mwh/flr^3 ve $mwh/TM3$ hatlarına etkileri

Uygulama Dozu (μM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (≥2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar(m=5)			Σ mwh klonlar (m=2)			Σ klonlar(m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
<u>Normal Kanat (mwh/flr³)</u>																	
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 EMS	80	31	(0.39)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
1 DMSO	80	13	(0.16)		1	(0.01)		0	(0.00)		14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
10 FA	80	14	(0.18)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	17	(0.21)	i	18	(0.23)	i	0.87
1 KS	80	24	(0.30)	+	6	(0.08)	i	3	(0.04)	i	30	(0.38)	+	33	(0.41)	+	1.54
3 KS	80	38	(0.48)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	46	(0.58)	+	53	(0.66)	+	2.36
5 KS	80	42	(0.53)	+	8	(0.10)	i	5	(0.06)	+	48	(0.60)	+	55	(0.69)	+	2.46
10 KS	80	53	(0.66)	+	11	(0.14)	+	7	(0.09)	+	64	(0.80)	+	71	(0.89)	+	3.28
<u>Serrat Kanat (mwh/TM3)</u>																	
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 EMS	80	34	(0.43)	+	12	(0.15)	+				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
1 DMSO	80	16	(0.20)		4	(0.05)					20	(0.25)		20	(0.25)		1.02
10 FA	80	9	(0.11)	-	2	(0.03)	-				11	(0.14)	-	11	(0.14)	-	0.56
1 KS	80	16	(0.20)	-	5	(0.06)	i				21	(0.26)	-	21	(0.26)	-	1.08
3 KS	80	27	(0.34)	i	5	(0.06)	i				32	(0.40)	i	32	(0.40)	i	1.64
5 KS	80	38	(0.48)	+	8	(0.10)	i				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
10 KS	80	51	(0.64)	+	6	(0.08)	i				57	(0.71)	+	57	(0.71)	+	2.92

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würdler (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçların gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı (10^5 hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m, çarpım faktörü; b, dengeleyici *TM3* kromozomu, flr^3 mutasyonu taşımaz. KS, kuersetin; FA, Folik asit; Olasılık düzeyi= 0.05.

Diğer uygulama gruplarında toplam klon sayısının 33-55, KİF değerlerinin de 1.54-2.46 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Dengeleyici kromozom taşıyan serrat kanat preparatlarından elde edilen sonuçlar ile normal kanat preparatlarından elde edilen sonuçlar birbirinden farklılık göstermektedir (Çizelge 4.6). Özellikle serrat kanatlarda büyük tek tip klon oluşumunda açıkça bir azalma görülmektedir. Örneğin, 10µM normal kanat fenotipinde büyük tek tip klon frekansı, %0.14 iken, serrat kanat fenotipinde bu frekans %0.08 olarak hesaplanmıştır. Ancak, özellikle 5 ve 10µM uygulama gruplarında küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon tiplerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak klon oluşumu, pozitif fark ($P<0.05$) göstermiştir (Çizelge 4.6).

4.1.7. Zearalenon'un genotoksik etkisinin araştırılması

Bir çeşit mikotoksin olan zearalenon da *Drosophila* larvalarına aşırı toksik etki göstermiştir (Şekil 4.7). Bu nedenle, genistein, daidzein ve kuersetinde olduğu gibi 1, 3, 5 ve 10µM dozlar ile çalışılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan distile suda kendiliğinden oluşan (spontan) toplam klon frekansı *mwh/flr³* genotipindeki normal kanatlı bireyler için 0.15, *mwh/TM3* genotipindeki serrat kanatlı bireyler için ise 0.23 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Zearalenonun artan konsantrasyonuna bağlı olarak (1-10µM) gerek *mwh/flr³* ve gerekse *mwh/TM3* genotipindeki bireylerde gözlenen toplam klon sayısı artmıştır (Çizelge 4.7). Bu sayı normal kanat fenotipinde 1µM ZN uygulamasında 41, 10µM ZN uygulamasında 51, serrat kanat fenotipinde ise 1µM ZN'de 22 ve 10µM ZN'de 48 olarak gözlenmiştir. Bu artışın sonucu olarak da çalışılan tüm derişimlerde hem *mwh/flr³*, hem de *mwh/TM3* genotipindeki bireyler istatistiksel olarak pozitif sonuçlar vermiştir ($P<0.05$). Ancak her iki fenotipte de tüm dozlar DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *mwh/flr³* genotipindeki bireylerde 1µM ZN hariç büyük tek tip klonlarda önemsiz fark gözlenmiştir. *mwh/TM3* genotipindeki bireylerde de özellikle büyük tek tip klon sonuçları istatistiksel olarak önemsiz ($P>0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Zearalenon'un *Drosophila melanogaster*'in mwh/flr^3 ve $mwh/TM3$ hatlarına etkileri

Uygulama Dozu (μM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (≥2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar(m=5)			Σ mwh klonlar (m=2)			Σ klonlar(m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
<u>Normal Kanat (mwh/flr³)</u>																	
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 EMS	80	31	(0.39)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
1 DMSO	80	13	(0.16)		1	(0.01)		0	(0.00)		14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
10 FA	80	14	(0.18)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	17	(0.21)	i	18	(0.23)	i	0.87
1 ZN	80	29	(0.36)	+	11	(0.14)	+	1	(0.01)	i	40	(0.50)	+	41	(0.51)	+	2.05
3 ZN	80	32	(0.40)	+	6	(0.08)	i	6	(0.08)	+	38	(0.48)	+	44	(0.55)	+	1.95
5 ZN	80	37	(0.46)	+	8	(0.10)	i	6	(0.08)	+	45	(0.56)	+	51	(0.64)	+	2.31
10 ZN	80	42	(0.53)	+	6	(0.08)	i	3	(0.04)	i	48	(0.60)	+	51	(0.64)	+	2.46
<u>Serrat Kanat (mwh/TM3)</u>																	
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 EMS	80	34	(0.43)	+	12	(0.15)	+				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
1 DMSO	80	16	(0.20)		4	(0.05)					20	(0.25)		20	(0.25)		1.02
10 FA	80	9	(0.11)	-	2	(0.03)	-				11	(0.14)	-	11	(0.14)	-	0.56
1 ZN	80	17	(0.21)	i	5	(0.06)	i				22	(0.28)	-	22	(0.28)	-	1.13
3 ZN	80	24	(0.30)	i	7	(0.09)	i				31	(0.39)	i	31	(0.39)	i	1.59
5 ZN	80	27	(0.34)	i	5	(0.06)	i				32	(0.40)	i	32	(0.40)	i	1.64
10 ZN	80	40	(0.50)	+	8	(0.10)	i				48	(0.60)	+	48	(0.60)	+	2.46

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würdler (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçların gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı (10^5 hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m, çarpım faktörü; b, dengeleyici *TM3* kromozomu, flr^3 mutasyonu taşımaz. ZN, zearalenone; FA, Folik asit; Olasılık düzeyi= 0.05.

Uygulama gruplarına ait klon indüksiyon frekansı incelendiğinde, artan doza bağlı olarak bu frekansın arttığı gözlenmiştir. Örneğin, 10µM ZN uygulama grubu için hem normal kanat fenotipinde, hem de serrat kanat fenotipinde klon indüksiyon frekansı 2.46 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). Yine aynı çizelgede *mwh/flr³* ve *mwh/TM3* genotipindeki bireylerden elde edilen sonuçlar *mwh* klonları ve toplam klon sayıları açısından karşılaştırıldığında, normal kanat fenotipinde meydana gelen pozitif farkın ($P<0.05$), serrat kanat fenotipli bireylerde negatif ya da önemsiz farka ($P>0.05$) dönüştüğü (10µM uygulama hariç) görülmektedir. Bu nedenle, artan doza bağlı olarak, mutasyon oranıyla birlikte rekombinasyon oranı da artmaktadır diyebiliriz. Konsantrasyona bağlı olarak, mutant klon frekansı arttığı gibi, *mwh/flr³* ve *mwh/TM3* genotipindeki bireylerde klon indüksiyon frekansı da artış göstermiştir (Çizelge 4.7).

4.1.8. Folik asit'in etkisinin araştırılması

Çalışmamızda B vitamini ailesinin bir üyesi olan folik asidin (folasin, folat), 10µM'lık tek dozu 72±4 saatlik trans-heterozigot larvalara uygulanmış ve elde edilen bireylerin kanatları incelenmiştir. Normal kanat fenotipine sahip bireylerden elde edilen sonuçlar, distile su ile gerçekleştirilen negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, sonuçların önemsiz olduğu görülmüş (Çizelge 4.1 – Çizelge 4.9) ve klon indüksiyon frekansı da 0.87 olarak hesaplanmıştır. Serrat kanat fenotipine sahip bireylerden elde edilen sonuçlar ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tüm klonlar için negatif olarak tespit edilmiştir. Klon indüksiyon frekansı da 0.56 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, tüm uygulama grupları için en düşük değerdir. Elde edilen sonuçlar, hem distile su ile hem de kullanılan bitkisel östrojenlerin 10µM uygulama grubuyla karşılaştırmalı olarak normal kanat için Çizelge 4.8'de, serrat kanat için de Çizelge 4.9'da verilmiştir.

4.1.9. Folik asit + bitkisel östrojenlerin birlikte trans-heterozigot larvalara uygulanması

Folik asidin 10µM dozu trans-heterozigot larvalara, 6 bitkisel östrojenin en yüksek dozuyla (10µM) birlikte uygulandı. Uygulama yapılan cam şişelerde bulunan 4.5g

Drosophila instant mediuma, 4.5ml 10µM folik asit çözeltisi + 4.5ml çalışılan bitkisel östrojenin 10µM çözeltisi (toplam 9 ml) karıştırılarak deney grupları oluşturuldu. Sonuçlar, normal kanat ve serrat kanatlar için ayrı ayrı değerlendirildi.

4.1.9.a. Folik asit + bitkisel östrojenlerin *Drosophila melanogaster*'in *mwh/flr³* hatlarına anti-genotoksik etkisinin araştırılması

Çizelge 4.8'de folik asidin çalışmamızda kullanılan tüm bitkisel östrojenlerle etkileşimi *mwh/flr³* hatları için gösterilmiştir. 10µM folik asit + 10µM genisteinin birlikte uygulamasından elde edilen sonuçlar, genisteinin 10µM'lık doz uygulaması ile karşılaştırıldığında, *mwh/flr³* genotipine göre küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klon sayılarında azalma görülmekte ve sonuç istatistik anlamda pozitif etkiliden önemsiz etkiliye dönüşmektedir. Klon indüksiyon frekansının 2.05'den 1.02'ye kadar azaldığı görülmüştür. Ancak, bu değer folik asidin tek başına kullanıldığı durumda 0.87 olarak hesaplanmıştır.

Aynı dozlarda (10µM) folik asit ve daidzeinin birlikte uygulamasının sonuçları, daidzeinin tüm klonlarda oluşturduğu etkinin kısmen giderildiğini göstermektedir. Küçük tek tip klon frekansı 0.44'den 0.29'a, toplam *mwh* klon frekansı 0.49'dan 0.30'a ve toplam klon frekansı 0.53'den 0.33'e gerilemiştir (Çizelge 4.8) Ancak, bu sonuçlar kontrol grubu (distile su) ile karşılaştırıldığı zaman, daidzeine bağlı pozitif sonuçların tam anlamıyla giderilemediğini göstermektedir.

10µM folik asit + glisitein deney grubunda elde edilen sonuçlar ile 10 µM glisiteinin tek başına uygulandığı deney sonuçları karşılaştırıldığında, iki grup arasında önemli bir farkın olmadığı açıkça görülebilir (Çizelge 4.8). Bu gruba ait toplam klon frekansları incelendiğinde, yalnızca glisitein uygulamasında 0.19 iken, folik asit + glisiteinin birlikte uygulandığı grupta 0.16 olarak hesaplanmıştır.

Folik asit + koumestrol uygulaması sonucu elde edilen değerler, folik asit + glisteine uygulamasında olduğu gibi, önemsiz fark göstermiştir ($P>0.05$). Toplam klon frekansı yalnızca koumestrol kullanımı ile 0.20 iken, bu değer folik asit + koumestrol kullanımı ile 0.18'e gerilemiştir (Çizelge 4.8).

Deneylerimizde kullanılan bitkisel östrojenler arasında en yüksek genotoksik etkiyi kuersetin göstermiştir. Folik asidin koruyucu etkisi Çizelge 4.8'de açık bir şekilde görülmektedir. Özellikle, büyük tek tip klon frekansı 10 μ M kuersetin uygulamasında 0.14 iken, kuersetin + folik asit uygulamasında bu değer 0.06'ya, ikiz klon frekansında yalnızca kuersetin uygulanmasında 0.09 iken kuersetin + folik asit uygulamasında 0.05'e gerilemiştir. Bu durum istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$). Ayrıca, küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon sayıları önemli oranda düşüş göstermiştir. Klon indüksiyon frekansı da 3.28'den 1.69'a gerilemiştir.

Deneylerimizde kullandığımız bir diğer bitkisel östrojen olan zearalenon da larvalara toksik etki göstermiştir. Normal kanat fenotipinde zearalenon + folik asit uygulaması sonucu elde edilen bulgular, folik asidin zearalenonun toksik etkisini önemli ölçüde engellediğini göstermektedir. Özellikle, küçük tek tip, ikiz klon, toplam *mwh* ve toplam klonlarda belirgin azalışlar tespit edilmiştir. Zearalenonun tek başına uygulandığı durumda, klon indüksiyon frekansı 2.46 iken, folik asit + zearalenon uygulaması sonucu klon indüksiyon frekansı 1.18'e gerilemiştir.

Çizelge 4.8. Folik asit'in *Drosophila melanogaster*'in mwh/flr^3 hatlarına anti-genotoksik etkileri

Uygulama Dozu (μM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (>2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar(m=5)			Σ mwh klonlar (m=2)			Σ klonlar(m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
		Normal Kanat (mwh/flr ³)															
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 DMSO	80	13	(0.16)	i	1	(0.01)	i	0	(0.00)	i	14	(0.18)	i	14	(0.18)	i	0.72
10 FA	80	14	(0.18)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	17	(0.21)	i	18	(0.23)	i	0.87
10 GN	80	33	(0.41)	+	7	(0.09)	i	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
10 GN + FA	80	19	(0.24)	i	1	(0.01)	i	2	(0.03)	i	20	(0.25)	i	22	(0.28)	i	1.02
10 DZ	80	35	(0.44)	+	4	(0.05)	i	3	(0.04)	i	39	(0.49)	+	42	(0.53)	+	2.00
10 DZ + FA	80	23	(0.29)	+	1	(0.01)	i	2	(0.03)	i	24	(0.30)	+	26	(0.33)	+	1.23
10 GL	80	11	(0.14)	i	4	(0.05)	i	0	(0.00)	i	15	(0.19)	i	15	(0.19)	i	0.77
10 GL + FA	80	9	(0.11)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	12	(0.15)	i	13	(0.16)	i	0.61
10 KM	80	15	(0.19)	i	0	(0.00)	-	1	(0.01)	i	15	(0.19)	i	16	(0.20)	i	0.77
10 KM + FA	80	12	(0.15)	i	1	(0.01)	i	1	(0.01)	i	13	(0.16)	i	14	(0.18)	i	0.67
10 KS	80	53	(0.66)	+	11	(0.14)	+	7	(0.09)	+	64	(0.80)	+	71	(0.89)	+	3.28
10 KS + FA	80	28	(0.35)	+	5	(0.06)	i	4	(0.05)	i	33	(0.41)	+	37	(0.46)	+	1.69
10 ZN	80	42	(0.53)	+	6	(0.08)	i	3	(0.04)	i	48	(0.60)	+	51	(0.64)	+	2.46
10 ZN + FA	80	15	(0.19)	i	8	(0.10)	i	1	(0.01)	i	23	(0.29)	+	24	(0.30)	+	1.18

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würzler (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçların gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı (10^5 hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m , çarpım faktörü; FA, folik asit; GN, genistein; DZ, daidzein; GL, glisitein; KM, Koumestrol; KS, Kuersetin; ZN, zearalenone; Olasılık düzeyi= 0.05.

4.1.9.b. Folik asit + bitkisel östrojenlerin *Drosophila melanogaster*'in *mwh/TM3* hatlarına anti-genotoksik etkisinin araştırılması

Çizelge 4.9'da folik asit ile çalışmalarımızda kullandığımız tüm bitkisel östrojenlerin etkileşimleri *mwh/TM3* hatları için gösterilmiştir. Bu çizelgede folik asidin serrat kanat fenotipine sahip bireylerde, bitkisel östrojenlerin sebep olduğu genotoksisteyi önemli ölçüde giderdiği görülmektedir.

10µM folik asit + 10µM genistein uygulamasından elde edilen sonuçlar, 10µM genistein uygulaması ile karşılaştırıldığında, serrat kanat fenotipine ait küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh*, ve toplam klon sayılarında azalma görülmektedir. Özellikle, büyük tek tip klon frekansındaki düşüş çok açıktır. Şöyle ki, genisteinin 10µM uygulamasında büyük tek tip klon frekansı %0,15 iken, bu değer genistein + folik asit uygulamasında %0.01'e kadar gerilemiştir. Klon indüksiyon frekansı da 1.84'den 1.08'e kadar azalmıştır (Çizelge 4.9).

Aynı dozlarda (10µM) folik asit + daidzeinin birlikte uygulanmasının sonuçları, daidzeinin tüm klonlarda oluşturduğu etkinin kısmen giderildiğini göstermektedir. 10µM daidzein uygulaması sonucu, toplam *mwh* klonları ve toplam klonlarda oluşan pozitif sonuçlar, folik asit kullanımıyla birlikte önemsiz farka dönüşmüştür. KİF değeri de 1.69'dan 1.23'e gerilemiştir (Çizelge 4.9).

10µM folik asit + glisiteinin birlikte uygulandığı deney grubunda elde edilen sonuçlar ile 10µM glisteinin tek başına uygulandığı deney sonuçları, serrat kanatlı bireyler için karşılaştırıldığında, iki grup arasında önemli bir farkın olduğu görülmektedir. 10µM glistein uygulaması sonucu elde edilen küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon sayıları önemsiz fark gösterirken, aynı klon sayıları için folik asit + glistein uygulaması sonucu elde edilen sonuçlar negatif ($P<0.05$) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.9).

Folik asit + koumestrol uygulaması sonucu elde edilen sonuçlar, folik asit + glistein uygulaması sonucu elde edilen sonuçlara benzemektedir. Elde edilen tüm klon sayılarında (küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon), folik asit uygulaması ile birlikte azalma meydana geldiği Çizelge 4.9'da görülmektedir. KİF değeri de 0.97'den 0.87'ye gerilemiştir.

Folik asidin *mwh/TM3* hatları için en iyi iyileştirici etkiyi kuersetin ile birlikte uygulandığı grupta gösterdiğini söyleyebiliriz. Folik asit + kuersetinin aynı dozlarda (10 μ M) uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar ile kuersetinin tek başına uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar birbiri ile karşılaştırıldığında, özellikle, küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon sayısında tek başına kuersetin uygulaması sonucu oluşan pozitif farkın, folik asit + kuersetin uygulaması sonucu önemsiz farka dönüştüğü görülür. Büyük tek tip klon sayısında ise önemsiz olan farkın negatif farka dönüştüğü tespit edilmiştir. Serrat kanat fenotipine ait sonuçlar için KİF değeri, tüm uygulama gruplarındaki en yüksek değer olan 2.92'den 1.18'e kadar gerilemiştir (Çizelge 4.9).

Folik asit + zearalenone uygulaması sonucu elde edilen değerler, folik asit + kuersetin uygulaması sonucu elde edilen değerlere benzemektedir. Elde edilen tüm klon sayılarında folik asit uygulaması ile birlikte bir azalmanın meydana geldiği Çizelge 4.9'da açıkça görülmektedir. En bariz azalış ise toplam *mwh* ve toplam klon frekasında gözlenmiştir. Serrat kanat fenotipine sahip bireylerden elde edilen toplam klon frekansı zearalenon uygulaması için 0.60, folik asit + zearalenon uygulaması için de 0.26 olarak bulunmuştur. KİF değeri ise aynı gruplar için 2.46'dan 1.08'e kadar gerilemiştir.

Çizelge 4.9. Folik asit'in *Drosophila melanogaster*'in *mwh/TM3* hatlarına anti-genotoksik etkileri

Uygulama Dozu (μM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (≥2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar(m=5)			Σ mwh klonlar (m=2)			Σ klonlar(m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
		Serrat Kanat (mwh/TM3)															
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
DMSO	80	16	(0.20)	i	4	(0.05)	-				20	(0.25)	i	20	(0.25)	i	1.02
10 FA	80	9	(0.11)	-	2	(0.03)	-				11	(0.14)	-	11	(0.14)	-	0.56
10 GN	80	25	(0.31)	i	12	(0.15)	+				37	(0.46)	+	37	(0.46)	+	1.84
10 GN + FA	80	20	(0.25)	i	1	(0.01)	-				21	(0.26)	i	21	(0.26)	i	1.08
10 DZ	80	25	(0.31)	i	8	(0.10)	i				33	(0.41)	+	33	(0.41)	+	1.69
10 DZ + FA	80	18	(0.23)	i	6	(0.08)	i				24	(0.30)	i	24	(0.30)	i	1.23
10 GL	80	15	(0.19)	i	5	(0.06)	i				20	(0.25)	i	20	(0.25)	i	1.02
10 GL + FA	80	14	(0.18)	-	3	(0.04)	-				17	(0.21)	-	17	(0.21)	-	0.87
10 KM	80	12	(0.15)	-	7	(0.09)	i				19	(0.24)	i	19	(0.24)	i	0.97
10 KM + FA	80	13	(0.16)	-	4	(0.05)	-				17	(0.21)	-	17	(0.21)	-	0.87
10 KS	80	51	(0.64)	+	6	(0.08)	i				57	(0.71)	+	57	(0.71)	+	2.92
10 KS + FA	80	20	(0.25)	i	3	(0.04)	-				23	(0.29)	i	23	(0.29)	i	1.18
10 ZN	80	40	(0.50)	+	8	(0.10)	i				48	(0.60)	+	48	(0.60)	+	2.46
10 ZN + FA	80	16	(0.20)	i	5	(0.06)	i				21	(0.26)	i	21	(0.26)	i	1.08

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würger (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçların gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı (10^3 hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*, çarpım faktörü; b, dengeleyici *TM3* kromozomu *flr*³ mutasyonu taşımaz. FA, folik asit; GN, genistein; DZ, daidzein; GL, glisitein; KM, Koumestrol; KS, Kuersetin; ZN, zearalenone; Olasılık düzeyi= 0.05.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın amacı, özellikle ülkemizde ve son zamanlarda tüm dünya ülkelerinde tüketimi artan bazı bitkisel gıdaların içeriğinde bulunan bitkisel östrojenlerin *Drosophila melanogaster*'de mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin olup olmadığını belirlemek ve bitkisel östrojenlerin biyolojik etki mekanizmasının işleyişi ve bu bitkisel östrojenlerin aynı yolla insanları etkileyip etkileyemeyeceği hakkında sonuca varabilmektir. Diğer bir amacımız ise bitkisel östrojenlerin olası mutajenik ve rekombinojenik etkilerine karşı folik asit vitamininin koruyucu etkisinin olup olmadığını tespit etmektir.

Ökaryotik bir organizma olan *D. melanogaster* ile gerçekleştirilen testler, genotoksisite testleri içinde önemli bir yere sahiptir. Gen mutasyonları (cinsiyete bağlı resesif letal test, somatik göz mutasyon testi, kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi) ile kromozom hasarlarının (aneuploidi belirleme ve kısmi kromozom kaybı testleri ile somatik mutasyon ve rekombinasyon testi) belirlenmesi için *Drosophila*'da değişik genetik özellikte hatlar oluşturulmuştur (IPCS 1985).

Uygulamalarımız sonucunda, glisitein (Çizelge 4.4) ve koumestrol (Çizelge 4.5) tüm dozlarda genotoksik açıdan negatif ya da önemsiz genotoksisite, diğer dört bitkisel östrojen ise doz artışına bağlı olarak genellikle pozitif genotoksisite göstermiştir. En etkili genotoksisite sıralaması da kuersetin (Çizelge 4.6), zearalenon (Çizelge 4.7), genistein (Çizelge 4.2) ve daidzein (Çizelge 4.3) olarak belirlenmiştir. Bitkisel östrojenlerin olası mutajenik ve rekombinojenik etkilerine karşı folik asit vitamininin koruyucu etkisinin araştırılması ile elde edilen sonuçlarda folik asidin antimutajenik etkili olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9).

Çalışmalarımızda en etkili genotoksik etkiyi gösteren kuersetin (=quercetin), IARC (Uluslararası Kanseri Araştırma Kurumu) tarafından kanser yapıcı maddeler sıralamasında 3. grupta yer almaktadır. Deneylerimizde kullandığımız kuersetinin

hemen tüm dozlarında (1-10 μ M) normal kanat fenotipinde (*mwh/flr³*) pozitif fark gözlenmiştir. Bu durum kuersetinin genotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Serrat kanat fenotipinde (*mwh/TM3*) ise elde ettiğimiz sonuçlara göre, yine aynı maddenin rekombinojenik etkiye de sahip olduğunu söyleyebiliriz (Çizelge 4.6).

Yaptığımız literatür çalışmaları sonucu kuersetinin genotoksitesisi üzerine çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır. Kuersetin, *Salmonella typhimurium*'da 60nM konsantrasyonda mutajenik etki göstermiştir (Czeczot *et al.* 1990). Buna ilaveten, hem 19.8-49.6 μ M konsantrasyon aralığında, hem de 66.2-165.4 μ M konsantrasyonlarda Chinese hamster ovaryum hücrelerinde kardeş kromatid değişimine yol açmıştır (Carver *et al.* 1983). Yine 66.2-165.4 μ M konsantrasyonlarda kuersetin, insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimlerine sebep olmuştur (Popp and Schimmer 1991). Başka bir *in vivo* çalışmada, kuersetin fare kemik iliğinde 1250mg/kg uygulama dozu ile genotoksik hasara yol açmıştır (da Silva *et al.* 2002). Ancak, bazı uzun süreli çalışmalar, kuersetinin karsinojenik olmadığını (Stoewsand *et al.* 1984; Formica and Regelson 1995), aynı zamanda antioksidatif özelliklere sahip olduğunu da göstermiştir (Satyanarayana *et al.* 2001). Kuersetin ve rutin gibi major flavonoidlerin, serum trigliserit seviyesini ve plateletagregasyonunu azaltarak antitrombolitik etki göstermeleri yanında, meme kansinomunda p53 tümör supressör geninde down-regülasyon yaptığı (Avila *et al.* 1994), ayrıca ovaryum kanser hücrelerinde değiştirici büyüme faktörü-B1 üretiminin düzenlenmesinde de inhibitör aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (Scambia *et al.* 1994).

Çalışmamızda kullandığımız bitkisel östrojenlerden bir diğeri olan zearalenon, *Drosophila* larvalarına aşırı genotoksik etki gösteren ikinci madde olmuştur. Hem normal, hem de serrat kanat sonuçları göz önüne alındığı zaman, kullandığımız tüm dozlarda zearalenonun genotoksik ve rekombinojenik olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Aynı zamanda, bir mikotoksin olan zearalenon ile ilgili geçmişte birçok çalışma yapılmıştır. Zearalenon *D. melanogaster*'de metamorfoz süresini uzatmış ve yeni birey oluşumunu engellemiştir (Aşkın *et al.* 2008). Östrojen benzeri anabolik bir etkiye sahip olan zearalenon, süt sığırları, tavuk ve hindilerde infertilite, fetal absorpsiyon ve abort (düşük) meydana getirmektedir (Fink-Gremmels 1999). Bir östrojen agonisti gibi

davranarak 17- β östradiol ile östrojen reseptörlerine bağlanmak üzere yarışır, zayıf mitojen (mitoz bölünmeyi tetikleyen) maddeler gibi davranarak meme ve uterus kanserine yol açar. Farelere 10ppm zearalenon verildiğinde onlarda da meme kanseri oluşumu gözlenmiştir. Kanatlılarda yapılan çalışmalarda ise ibik, ovaryum ve testis ağırlığında artışa, ovidukt kisti oluşumuna, yüksek dozlarda fertilite ve spermatogenezisde azalmaya, ayrıca, kalıcı östrusa neden olduğu bildirilmektedir (Fink-Gremmels 1999). Ames testi ile zearalenonun mutajenik olmadığı (Bartholomew and Ryan 1980), ancak Chinese hamster V79 hücrelerinde kardeş kromatid değişimini uyardığı ve hücre siklusunu geciktirdiği belirlenmiştir (Thust *et al.* 1983). Ayrıca, zearalenone sığır lenfosit ve oositlerinde de kromozomal aberasyonları ve kardeş kromatid değişimlerini önemli derecede artırmıştır (Minervini *et al.* 2001; Lioi *et al.* 2004).

Tüm mikotoksinler gibi çalışmalarımızda kullandığımız zearalenon, DNA, RNA ve protein gibi hücresel makromoleküllere afinite gösterirler ve onların sentezini inhibe ederler. DNA'ya bağlı RNA polimeraz aktivitesi de bloke edilir (McLean and Dutton 1995). Allison and Paton (1965)'un hipotezine göre ise sekonder metabolitler, lizozomal enzimlerin aktivitesini engelleyerek kromozomal hatalara sebep olurlar. Makromoleküllerin bu inhibisyonundan, sitokrom p-450 ve aril hidrokarbon hidroksilaz gibi bir takım enzimlerin etkisi sonucu ortaya çıkan metabolitlerin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Iwaki *et al.* 1990, Cavin *et al.* 1998). Moleküler düzeyde yapılan araştırmalar, mikotoksin metabolitlerinin hücre DNA'sında guanine bağlanarak form değişikliğine sebep olduğunu göstermiştir (Benasutti *et al.* 1988). Bu form, mikotoksin-DNA kompleksinin %90'ını oluşturmakta ve böylece DNA'da promutajenik alanın artmasıyla tümör oluşumu başlamış olmaktadır. Bir başka araştırmaya göre, değişen mikotoksin formu protein biyosentezini azaltır, RNA ve DNA sentezini etkiler ve endoplazmik retikulumdaki RNA polimeraz aktivitesini de durdurur. Ayrıca, süksinik dehidrogenaz aktivitesini etkileyerek dokulara oksijen taşınmasında aksaklıklara yol açar. Alkalın fosfataz enzimini de etkileyen mikotoksinler, hücredeki pasif taşınmanın bozulmasına neden olurlar (Verma and Nair 2001). Etkin mikotoksin metabolitleri, hepatik mikrozomal sitokrom p-450 enzimlerine bağımlı multi fonksiyonel oksijenaz

sistemi (MFO) tarafından sentezlenmektedir. Karaciğerde GSH-S-transferaz enzimi tarafından katalizlenen tepkimeler sonucunda, GSH ile konjuge edilerek veya epoksit hidrataz enzimi tarafından başka bir forma dönüştürülerek nisbeten zehirsiz metabolitlere çevrilir. Ancak, uzun süre veya fazla miktarlarda mikotoksin alınması halinde, tahmin edilen detoksifikasyon mekanizmasının yetersiz kaldığı bildirilmektedir (Betina 1989). Multi fonksiyonel oksijenaz sistemi, ksenobiotik metabolizmanın temel yapı taşı olarak kabul edilmekte ve memelilerin karaciğerinde, sirke sineklerinde ve mantarlarda bulunmaktadır. Böceklerde bu sistemdeki enzimlerin pek çoğu gastrointestinal sistem, malpigi tüpleri ve vücudun yağ dokusuna yerleşmiştir (Casida 1969). Çeşitli organizmalarda mikotoksinlerin absorpsiyonu (=emilimi), deri ya da mukoza yoluyla gerçekleşmekte ve çoğunlukla gastrointestinal kanaldan emilen toksin, karaciğer, akciğer, böbrek ve yağ dokusunda birikmektedir (Leeson *et al.* 1995). Özellikle, gastrointestinal kanaldan emilen toksinin düşük yoğunluklu lipoproteinlere (LDL: Low Density Lypoprotein) bağlanarak portal dolaşıma geçtiği ve bu şekilde hepatositlere (karaciğer hücreleri) taşındığı gösterilmiştir. Bu nedenle, çeşitli memelilerde karaciğer ve akciğer kanserini tetiklemektedir (Busbee *et al.* 1990).

Deneylerimizde kronik olarak zearalenon muamelesine tabi tutulan bireylerde de muhtemelen bu detoksifikasyon mekanizmasının yetersiz kaldığını, bu nedenle mutajenik ve rekombinojenik etkiye sebep olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmalarımızda kullandığımız bitkisel östrojenlerden genisteinin de kuersetin ve zearalenon kadar olmasa da yine de genotoksik ve rekombinojenik etkili olduğu belirlenmiştir. Genisteinin, özellikle doz artışına bağlı olarak bu etkilerinin arttığı KİF değerlerine bakıldığı zaman açıkça görülebilmektedir. Örneğin bu değer normal kanat fenotipinde en düşük uygulama grubunda (1 μ M) 0.82 iken, en yüksek uygulama grubunda (10 μ M) 2.05; benzeri şekilde serrat kanat fenotipinde de 1 μ M uygulama grubunda 0.72, 10 μ M uygulama grubunda ise 1.84 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Bu değerler genisteininde mutajenik etkisinin olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar bizim bu sonuçlarımızı desteklemektedir.

Aşkın *et al.* (2008), genisteinin *Drosophila melanogaster*'de ömür uzunluğu ve fertilité üzerine olumsuz etkiye neden olduğunu bildirmişlerdir. Stopper *et al.* (2005), genisteine (1,5-100nM) maruz bırakılan fare lenfoma hücrelerinde, Virgilio *et al.* (2004) da yine fare V79 hücrelerinde mikronükleus oluşumunu rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada, 12,5–100µM genistein, insan tümör hücrelerinde DNA kırıkları oluşturmuştur (Pool-Zobel *et al.* 2000). Anderson *et al.* (1997b) insan sperm ve periferal lenfositleriyle yaptıkları deneylerde, genisteinin (10–400µM) genotoksik bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, bu maddenin tümör oluşumuna sebep olduğu da bildirilmektedir (Newbold *et al.* 2001; Thigpen *et al.* 2001). Giri and Lu (1995), farelere 50 mg/kg genisteini 3 gün süreyle 12 saat aralıkla uygulamış ve kontrol gruplarıyla karşılaştırdıklarında, uygulama gruplarının kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatid değişiminde bir artışın olduğunu belirlemişlerdir. Genistein, *in vitro*'da dişi fare (Jefferson *et al.* 2007) ve sıçanlarda (Nagao *et al.* 2001) fertilité azalması, östrus döngüsünde bozulma, ovaryum büyüklüğünde azalma ve ovaryum işlevini bozma gibi etkiler de göstermiştir. *In vivo* şartlarda, domuzlarda (Jung *et al.* 1993) ve farelerde (Van Cauwenberge and Alexandre 2000) oosit olgunlaşmasını engellemiştir. Ji *et al.* (1999)'a göre, farelerde genistein, *in vitro*'da DNA topoizomerez ve protein tirozin kinaz aktivitesini engelleyerek hücre proliferasyonunu inhibe eder. Böylece sitotoksik etkide bulunur. Genistein özellikle kas hücre proliferasyonunu kuvvetli bir şekilde inhibe ederek kaslardaki protein üretimini de engellemektedir. Lazzari *et al.* (2008), aralarında genisteinin de bulunduğu 15 farklı kimyasal maddenin toksik etkilerini sıgırlar üzerinde gözlemişler ve genisteinin 0.4 - 40µM dozlarda fertilizasyon ve oosit olgunlaşması üzerine olumsuz etkilerini rapor etmişlerdir. Ancak genistein uygulaması, 7,12 - dimethylbenz(a)anthracene (50 mg/kg i.p) uygulaması sonucu oluşan kardeş kromatid değişimine karşı kısmen de olsa koruyucu etki göstermiştir (Giri and Lu 1995).

Çalışmalarımızda kullandığımız bir diğer bitkisel östrojen olan daidzeinin de uygulama dozlarına bağlı olarak kısmen genotoksik etkili olduğu gözlenmiştir. Normal kanat fenotipi için, özellikle en yüksek uygulama gruplarında (5 ve 10µM) küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klonlarda pozitif sonuçlar; serrat kanat fenotipinde ise yalnızca

10µM uygulama grubunda toplam *mwh* ve toplam klonlar için genotoksik etkileri belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Literatür bilgilerine göre, bakteriyel gen mutasyon testlerinde (Ames testi) 10µM daidzein (Bartholomew and Ryan 1980), L5178Y mouse lenfoma hücreleri (Schmitt *et al.* 2001, 2003) ve Chinese Hamster V79 hücrelerinde (Kulling *et al.* 2002) mikronükleus oluşturmazken, 75µM daidzein V79 hücrelerinde mikronükleus artışı meydana getirmiştir (Virgilio *et al.* 2004). Anderson *et al.* (1997b), insan sperm hücrelerinde ve periferik lenfosit hücrelerinde 100-400µM daidzeinin genotoksik etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Farelerin içme sularına daidzein ilave edildiği zaman, kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatid değişiminde artışın meydana geldiği belirlenmiştir (Giri and Lu 1995).

Yaptığımız literatür çalışmaları, bitkisel östrojenlerin çok çeşitli zararlı sonuçlarının yanı sıra bazı faydalarının olduğunu göstermiştir. Literatür bilgilerine göre, bitkisel östrojenlerin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla antioksidan ve antikarsinojen özelliklerinin de var olduğu sonucuna varılmıştır. Toda and Shirataki (1999)'nin yaptıkları araştırmada, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonuna dört farklı bitkisel östrojenin etkileri incelenmiş, izoflavonların kimyasal yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasında ilişki gösterilmiştir. Araştırmacılar, izoflavonların serbest radikalleri doğrudan veya antioksidan süpürücü enzimleri etkileyerek oksidatif DNA hasarını önleyebileceğini ileri sürmüşlerdir. İzoflavonların anjiogenez (kılcal damar oluşumu) ve hücre siklusunun inhibisyonunu da içeren potansiyel antikarsinojenik etkileri, bugüne kadar birçok kez kaydedilmiştir. Özellikle, bitkisel östrojenlerin DNA topoizomera 1 ve 2, tirozin kinaz, ribozomal S6 kinaz, 5α-redüktaz gibi tümör oluşumunda önemli rol oynayan bazı enzimlerin etkinliklerini baskılayabildiklerini gösteren çalışmalardan sonra, bu bileşiklerin potansiyel antikarsinojenik etkilerine odaklanılmıştır (Davis *et al.* 1999). Bu bileşiklerin aynı zamanda, antioksidan ve antiproliferatif özelliklerinin varlığı da kansere karşı koruyucu rollerini desteklemektedir. Zira fitoöstrojenler, antiproliferatif özellikleri ile hücrelerin bölünerek çoğalmasını önler, antianjiogenetik etki ile de anjiogenezi baskılayarak tümör hücrelerinin metastaz yapmalarını azaltırlar. Ancak bazı

araştırmacılara göre, bitkisel östrojenlerin metabolizmaları, emilimleri, potansiyel yararlı etkileri ile ilgili mekanizmalar, bu etkiler için gerekli optimal ve toksik dozlar ile ilgili bilinenler yetersiz olduğu için, bitkisel östrojenlerle ilgili çelişkili sonuçların giderilebilmesi maksadıyla yeni araştırmalar yapılması gerekmektedir (Adlercreutz and Mazur 1997; Davis *et al.* 1999; Cassidy *et al.* 2000).

Östrojen, başta ovaryum folikülleri olmak üzere, birçok dokudan (plasentadan, surrenal korteksten ve testislerden) salgılanabilen ve diğer hormonlarla birlikte dişilerde genital siklusu oluşturan bir steroid hormondur. Kimyasal olarak farklı formları vardır. Fizyolojik olarak en aktif formu 17 β - östradiol'dur. Östrojenlerin en önemli etkileri, genital organlar üzerinedir. Kapillar damarların kanla dolmalarını sağlayarak uterusun ağırlık ve hacminin artmasına sebep olur. Ovaryumun gelişmesinde görev alır. Protein ve RNA sentezini uyarak doku ve organların gelişmesini sağlar. Memelerin gelişmesinde progesteron ile birlikte sinerjik etki yapar. Bitkilerin de östrojenik aktiviteye sahip oldukları ilk olarak 1942 yılında Emmens tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacı, "Progöstrojen" olarak tanımladığı bir kısım bileşiklerin hayvanlar tarafından alındıktan sonra metabolize edilerek aktif hale geçtiklerini ve östrojen benzeri etki gösterdiklerini belirtmiştir (Emmens 1942). Daha sonra bu bileşiklere kısaca "fitoöstrojenler" adı verilmiştir.

Sentetik östrojen preparatlarının aşırı östrojen alınmasına yol açarak kanserlere yol açtığı bildirilmiştir (Hedelin *et al.* 2006). Diyetle fazla miktarda bitkisel östrojen içeren besinler alındığında, testosteron, 5-alfa redüktaz isimli enzim ile çevre dokularda kendisinden 5 kez daha güçlü etkiye sahip olan dehidrotestosterona (DHT) dönüşür. Aşırı DHT, hormona duyarlı organlardaki (meme, uterus, prostat vb.) hücrelerin denetimsiz bir şekilde çoğalmasına yol açar ve özellikle prostat kanseri riskini artırır (Hedelin *et al.* 2006).

Uzakdoğu ülkelerinde göğüs, prostat ve kalın bağırsak gibi kanserlerin daha az görülmesi, bu ülkelerdeki bitkisel östrojen miktarı çok fazla olan soya tüketimine bağlanmaktadır (Yuan *et al.* 1995). Bir varsayıma göre, soya izoflavonları zayıf

östrojenik etkiye sahiptir. Bu nedenle, belli miktarlarda tüketildiklerinde, vücutta yapılan östrojenlerin güçlü etkilerini zayıflatarak göğüs ve endometrium kanserlerinin tehlikesini azaltabilirler (Dees *et al.* 1997). Hâlbuki Uzakdoğu ülkelerinde yemek borusu, mide, tiroid, pankreas ve karaciğer kanserleri daha fazla görülmektedir (Nagata 2000). Soya tüketiminin bazı kanser çeşitlerini azaltırken bazılarını artırmasını izah etmek güçtür. Bu paradoksun bu ülkelerdeki diğer beslenme gelenekleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

26 fare üzerinde yapılan bir çalışmada, hayvanların % 65'inde fazla miktarda bitkisel östrojen içeren soyanın kansere karşı koruyucu olduğu, diğerlerinde ise etkisiz ya da kansere yol açtığı saptanmıştır (Messina *et al.* 1994). Aynı araştırmacılara göre, insanlar üzerindeki çalışmaların sonuçları hala belirsizliğini korumaktadır.

Sonuç olarak, bitkisel östrojenler ile kanser arasındaki ilişki günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Son on yıl içinde yapılan birçok çalışma, bitkisel östrojen zengin gıdalar ile beslenmenin meme, mide, kalın bağırsak ve uterus (döl yatağı) gibi kanserlere karşı koruyucu olmadığını hatta bu organlardaki kanserleri arttırdığını göstermektedir (Newbold *et al.* 2001). Bu konu hakkında literatürde mevcut olan çelişkilerin, yaptığımız araştırmanın önemini arttırdığı kanaatindeyiz.

Kanser, çoğu kez tek bir hastalık gibi görünse de gerçekte hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur. Kanser genetikle bağlantılı olabileceği düşüncesi ilk kez 20. yüzyılın başlarında ortaya atılmış ve bu fikir kanser araştırmalarının kaynağı olarak rol oynamıştır. Kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleri ile gelecek nesillere aktarılamaz. Ancak, kanser vakalarının %1'inde eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar, sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur. Her ne kadar bu tip vakaların sıklığı düşükse de bu tip mutasyonlarla yapılan çalışmalar kanserin kökeninin anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır. Bazen, kalıtsal mutasyonlar kanser oluşumunda tek başına yetersiz kalır. Kanser oluşumunun tamamlanması ve homozigot genlerin oluşması için homolog

lokuslarda ilave somatik mutasyonlar gerekir. Hangi durumda olursa olsun kanser, hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir (Klung and Cummings 2002).

Genomik değişiklikler kanser ile ilişkilidir. Örneğin, tek nükleotid değişimi gibi küçük ölçekli veya kromozom kazanımı ya da kaybı, viral genomun hücre genomuna katılımı, kromozomun yeniden düzenlenmesi gibi büyük ölçekli değişiklikler, kanserle ilişkili genomik değişikliklerdir. Büyük ölçekli genomik değişiklikler, kanserin genel özelliğidir. İnsan tümörlerinin büyük çoğunluğu gözle görülür kromozomal değişikliklerle karakterize edilmektedir.

İyonize radyasyon, kimyasallar ve virüsler gibi çevresel karsinojenler (kansere neden olan ajanlar) genelde etkilerini DNA hasarı yaparak ve mutasyonları uyararak gösterirler (IPCS 1985). Oluşan bu mutasyonlar kanserde merkezi rol oynar. Ayrıca, östrojenler gibi, hormonlar da insan kanserlerinin gelişiminde önemli tümör kamçılayıcılarıdır. Örneğin, aşırı östrojen kadında endometrium kanseri gelişme olasılığını artırır. Özellikle menopoz sonrası uzun süre östrojen uygulamasına tabii tutulan kadınlar için bu risk mevcuttur. Östrojenin bu etkisini dengelemek için hastaya progesteron verilerek risk minumuma indirilir. Ancak, bu kez meme kanseri riskinin arttığı bildirilmektedir (Newbold *et al.* 2001).

Çok hücreli organizmalarda mutasyonlar, eşey hücreleri mutasyonları ve somatik hücre mutasyonları olarak ikiye ayrılırlar. Eşey hücresi mutasyonları gelecek nesillere aktarılabilen değişikliklerdir ve gelecek nesillere aktarıldığı için de kalıtsal hastalıkların oluşmasına sebep olurlar (Grifits *et al.* 2000; Malling 2004). Mutasyonlar somatik hücrelerde meydana geldiklerinde, somatik mutasyon olarak adlandırılırlar. Somatik mutasyonlar, oluştukları hücrelerden meydana gelen tüm hücrelerde olacaktır. Somatik mutasyonlar hücrelerin ölümünden veya hasar almasından, hücrelerin malign hale dönüşüp kanser oluşumundan ve yaşlanmadan sorumludurlar (Smith and Wood 1991; Grifits *et al.* 2000; Malling 2004). Mutajenlerin neden olduğu mutajenik değişiklikler, fonksiyonel proteinlerin sentezini engelleyebilir veya modifiye yapıdaki proteinlerle,

aktivitesi ve özellikleri değişmiş enzimlerin sentezlenmesini sağlayabilir. Mutasyonlar somatik hücrede oluştuklarında, hücrelerde geriye dönüşümü olmayan değişiklikler oluştururlar ve bu da genel olarak kanser oluşumunu ortaya çıkarır (IPCS 1985).

DNA’da meydana gelen hasarlar kromozom düzeyinde (kromozomal aberasyon veya kromozomal mutasyon) veya gen düzeyinde (gen veya nokta mutasyonu) mutasyonlar olarak ortaya çıkmaktadırlar. Nokta mutasyonları da tüm genetik ve evrimsel değişikliklerin nedeni olarak gösterilmektedir (Natarajan and Obe 1986). Nokta mutasyonlar, sıklıkla kimyasalların etkileri ve DNA replikasyonundaki hatalar ile oluşurlar. Nokta mutasyonlar, tek veya birkaç nükleotidi etkileyen mutasyonlar olup bir nükleotidin diğerine değişmesi veya nükleotid eklenmesi (insersiyon) ya da nükleotid kaybı (delesyon) ile meydana gelirler (IPCS 1985). Kromozomal mutasyonlar, kromozomların yapısında (yapısal aberasyonlar) veya sayısında (sayısal aberasyon veya aneuploidi) meydana gelen değişiklikler olarak gözlenirler. Hem yapısal, hem de sayısal kromozom aberasyonları içsel ve dışsal faktörlerden dolayı meydana gelebilir (Natarajan and Obe 1986). Yapısal aberasyonlar, DNA’da hasar meydana getirirlerken, sayısal değişiklikler de hücre bölünmesi sırasında kromozomların düzenli dağılımına engel olurlar (IPCS 1985). Ayrıca, organizmadaki normal aerobik metabolizma sonucunda oluşan süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türevleri de DNA’da oksidatif hasar meydana getirebilirler (Collins *et al.* 1996). Yine mutajenler endojen olaylar sonucunda da oluşabilir. Örneğin, lipid peroksidasyonu, mutajenik türlerin oluşumuna öncülük edebilir. Mutajenik nitrozaminler, sekonder aminler ve nitritler endojen olarak da oluşturulabilirler (Venitt and Phillips 1995).

DNA’da hasar oluşturabilen mutajenler arasında baz analogları, alkilleyici ajanlar, akrinin oranj gibi maddeler sayılabilir. DNA ile doğrudan ilişkiye giren baz analogları DNA bazlarına benzer moleküller olup DNA sentezi esnasında analog oldukları bazların yerine DNA’nın yapısına girebilirler. Baz analoglarına 5- brom urasil örnek verilebilir. Nükleotidlerdeki amino veya keto gruplarına bir alkil grubu ekleyerek hatalı baz eşleşmelerine sebep olurlar (Klung and Cummings 2002; Maki 2002). DNA ile

doğrudan ilişkiye giren kimyasal maddelerin bir grubu da deneylerimizde pozitif kontrol olarak kullandığımız etil metan sülfonattır (EMS). Çizelge 4.1 incelendiği zaman EMS'nin distile su ve DMSO'ya göre normal ve serrat kanatlarda küçük tek tip, büyük tek tip klonları uyardığı, toplam klon sayısını arttırdığı yani genotoksik etkiye sebep olduğu görülmektedir. Alkilleyici ajanlar, çeşitli hücresel moleküllere bağlanırlar. Bu moleküllerin en önemlisi DNA'dır. Nükleik asitlerin temel yapısını oluşturan fosfat, hidroksil ve amino gruplarına kovalent bağlanan alkil grupları DNA'da zincir kırıkları, mikronükleus oluşumuna ve hücre ölümüne neden olurlar (Mazur and Blawat 1999). Akridin oranj, etidium bromide gibi kimyasal mutajenler, bazlar arasına girerek çerçeve kayması mutasyonlarını oluştururlar. Bu şekilde etki eden ajanlar bir azotlu baz çifti boyutunda olup pürin ve pirimidinler arasına sıkışarak interkalasyon yaparlar. DNA'daki okuma çerçevesini değiştirirler (Klung and Cummings 2002).

Bitkisel östrojenlerin üreme sağlığı ve akut toksisiteyi üzerine araştırmalar da yapılmıştır. Bakırel ve Keleş (2002), fareleri bitkisel östrojenlerce zengin *Trifolium pratense* (üç gül) ile beslemişler ve %20-%40 oranında *T. pratense* içeren yemlerle beslenen farelerde epididimisten alınan spermatozoonların motilite (hareket) ve morfolojisinin bozulduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, testiste primer spermatositlerin sayısı ve tubulus seminiferusların çapında kontrol grubuna göre önemli olmayan değişimler belirlenmiştir. Akut toksisite ile ilgili incelemelerde ise intraperitoneal LD₅₀ değerinin 4237mg/kg olduğu bulunmuştur. LD₅₀ değeri bakımından *T. pratense* bitkinin düşük toksisiteye sahip olduğu ancak sayı, yapı ve canlılık bakımından, sperma parametrelerini olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır.

Farelere eksojen kaynaklı bitkisel östrojenin uygulanması ile sertoli hücrelerinin azaldığı buna bağlı olarak testosteron miktarının azaldığı bildirilmektedir. (Sharpe *et al.* 1999, 2000).

Çalışmalarımızın ikinci kısmında bitkisel östrojenlerin sebep olduğu mutajenik ve rekombinojenik etkilerin giderilebilmesi için B vitamini türevi olan folik asit kullanılmıştır. Kullandığımız bitkisel östrojenlerden glisitein ve koumestrolün negatif

ya da önemsiz olarak tespit edilen genotoksik etkileri folik asit kullanılarak çok daha indirgenmiştir. Bu durum hem normal kanat, hem de serrat kanat fenotipi için, 10µM glistein ve 10µM glistein + folik asit uygulamasının KİF değeri ile 10µM koumestrol ve 10µM koumestrol + folik asit uygulamasının KİF değerlerine bakıldığında açıkça görülmektedir (Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9). Ancak, folik asidin iyileştirici ve mutajeniteyi engelleyici etkileri kuersetin, zearalenon, genistein ve daidzein (Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9) uygulamalarında daha çarpıcı şekilde gözlenmiştir. Bu bitkisel östrojenlere ait en yüksek uygulama grubunda (10µM) hem normal kanat (*mwh/flr³*), hem de serrat kanat (*mwh/TM3*) oluşumlarına ait KİF değerleri, folik asit uygulama grubuna ait KİF değerleriyle karşılaştırıldığı zaman, iyileştirici etki belirgin biçimde görülmektedir (Çizelge 4.8). Bu çizelgede 10µM genistein uygulamasında KİF 2.05 iken, 10µM genistein + folik asit uygulamasında bu değer 1.02'ye gerilemiştir. Yine kuersetin uygulamasında, 10µM kuersetin için KİF değeri 3.28, folik asit ile birlikte kuersetin uygulanınca bu değer 1.69 olarak tespit edilmiştir. 10µM daidzein uygulaması için KİF değeri 2.00, 10µM daidzein + folik asit uygulamasında ise 1.23 olarak hesaplanmıştır. 10µM zearalenon uygulaması için KİF değeri 2.46 iken, 10µM zearalenon + folik asit uygulamasında 1.18 olarak bulunmuştur.

Normal kanat için gözlenen bu iyileştirici etki, serrat kanat fenotipinde de gözlenmiştir (Çizelge 4.9). Bu çizelgedeki KİF değerlerine bakıldığında, 10µM genistein uygulamasında KİF 1.84 iken, 10µM genistein + folik asit uygulamasında bu değer 1.08'e gerilemiştir. Yine kuersetin uygulamasında, 10µM kuersetin için KİF değeri 2.92, folik asit ile birlikte kuersetin uygulanınca bu değer 1.18 olarak tespit edilmiştir. 10µM daidzein uygulaması için KİF değeri 1.69, 10µM daidzein + folik asit uygulamasında ise 1.23 olarak hesaplanmıştır. 10µM zearalenon uygulaması için KİF değeri 2.46 iken, 10µM zearalenon + folik asit uygulamasında 1.08 belirlenmiştir.

Vücuttaki hemen hemen tüm biyolojik olaylarda yer alan folik asit, DNA tamir ve sentezi, amino asit metabolizması, hücre büyüme ve yenilenmesi için zorunlu olan bir vitamindir (Teo and Fenech 2008). Bu vitaminin yetersizliği, kolon kanseri, kalp hastalığı, beynin görev yapamaması ve doğum kusurları gibi gelişimsel ve dejeneratif

hastalıkların riskini arttırmaktadır (Ames 2001). Ayrıca, DNA replikasyonu, DNA tamiri ve DNA'da metilasyonun sürdürülmesi için gerekli olan S-adenozil metiyonin, nükleotidlerin ve metiyoninin biyosentezinde bir metil vericisi olarak genomun bütünlüğünün sürdürülmesi için önemlidir (Fenech 2001). Eksikliği durumunda DNA hipometilasyonu ile kromozomal kırıklar ve mikronükleus oluşumlarındaki artış DNA'nın urasil sıralanışında hatalara ve bu da DNA hasarına yol açabilmektedir (Fenech 2001).

Genel olarak hücre koruyucu ve antigenotoksisite mekanizmasının işleyişi, serbest radikallerin süpürülmesi, DNA'nın kimyasal onarımına katılma, endojen antioksidanları koruma, oto oksidasyon süreçlerden oluşan hücreler arası hipooksik durumları teşvik etme, DNA'yı koruma ve dengede tutma şeklindedir (Nebel *et al.* 2002).

Folik asit organizmada etkisini sistem, organ, doku, hücre ve subselüler düzeylerde kimyasal değişiklikler yaparak gösterir. Folik asit ya hücrelerde çeşitli endojen maddelerin olumsuz etkilediği reseptörlere bağlanarak koruma görevi yapabilmekte ya da vücutta çeşitli yapılarda belirli enzimleri inhibe veya aktive ederek bu fonksiyonların değişmesi sonucu etki oluşturabilmektedir (Trust 2008). Bazı araştırmacılara göre de folik asit, DNA senteziyle ilişkili olan timidilat sentetaz aktivitesini (Glover 1982) ve hücresel nükleotid birleşimini değiştirerek (Kunz 1988) hücresel düzeyde iyileştirici etkili olmaktadır.

Steinmetz and Potter (1996)'a göre, fitokimyasal maddelerin koruyucu ve iyileştirici etkileri bir takım mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonları şöyle sıralayabiliriz; fitokimyasallar, sahip oldukları antioksidant etkileri sayesinde birçok olumsuz duruma karşı koruyucu ve iyileştirici etkide bulunurlar. Aynı zamanda, bu maddeler segmentasyonun son basamağında, özellikle sinir sistemi oluşumdaki hücre farklılaşmasını olumlu yönde etkilemeleri ile konjenital malformasyonların meydana gelme yüzdesini önemli derecede azaltmaktadır. Ayrıca, fitokimyasallar, karsinogen özelliği gideren enzimlerin aktivitesini arttırarak tümör oluşumu ve kanserleşmede önemli rol oynayan nitrozamin oluşumunu engelleyerek etkilerini gösterirler. Fitokimyasallar, barsak florasını, safra asitlerini ve pH'yı düzenledikleri gibi,

intraselüler matrikslerin bütünlüğünün korunmasını üstlenerek hücrenin dış etkenlere karşı korunmasını da sağlarlar. DNA'nın tamirinde de önemli işlevlere sahip olan çeşitli fitokimyasallar, bu özelliklerinden dolayı, DNA'da meydana gelebilecek hasarlara karşı önemli bir rol üstlenirler. Kansere hücrelerinde apoptosisi (programlanmış hücre ölümleri) artırma özelliklerinin yanı sıra, hücre poliferasyonunu (çoğalmasını) önleyerek kanserleşmiş dokulardaki yayılımı azaltırlar. Folik asit özellikle DNA, RNA ve protein sentezinde tek karbon ünitelerinin taşınmasında da kilit rol oynamaktadır.

Folik asidin antimutajenik özellikleri, *in vitro* ve *in vivo*'da birçok çalışma ile gösterilmiştir. Kültür ortamında veya dalağı alınmış insanların kanlarında folik asit eksikliğinin, lenfositlerde kromozomal aberasyonları arttırdığı ancak, bu eksikliğin giderilmesi ile kromozomal aberasyonların oranında gerilemenin meydana geldiği bildirilmiştir (Everson *et al.* 1980; Reidy *et al.* 1983; Dai *et al.* 1986; Li *et al.* 1986; Chen *et al.* 1989; Silva *et al.* 1992). Bhattacharya *et al.* (1987), folik asidin, AFB₁ uygulamasına karşı koruyucu etkili olduğunu, Fenech (2005) ise DNA hasarlarının folik asit ile giderilebildiğini rapor etmişlerdir.

Perry and Miller (1965), ev sineği larvalarını folik asit ile beslemişler ve folik asidin normal gelişim ve metamorfoz için önemli olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, folik asit eksikliğinde bu larvalarda DNA ve RNA sentezinin azaldığı da belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar, ev sineği larvalarını önce bir folik asit analogu olan 5-fluorurasil kullanarak beslemişler ve bu şekilde larval gelişiminin inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Bu madde, folik asit yokluğunda folik asidin tetrafolik aside indirgenmesini katalizleyen folik asit redüktaz enziminin geri dönüşümlü bir şekilde engellenmesine neden olmakta ve bu da larval gelişim ve metamorfozu zayıflatmaktadır.

Folik asit, hem tek başına, hem de bir multi vitamin içerisinde çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etki göstermektedir. Bu vitamin, özellikle spina bifida olarak bilinen ve yeni doğan ölümlerini arttıran nöral tüp defektlerini önleyici etkisiyle bilinmektedir (Czeizel and Dudas 1992). Ayrıca, kalp anomalileri (Botto *et al.* 2000), yarı damak (orafacial cleft) (Werler *et al.* 1999) ve üriner sistem anomalileri (Li *et al.* 1995)'ne karşı da koruyucu ve iyileştirici özellikleri bulunmaktadır.

Ruan *et al.* (2000), toksik etkisi bilinen sodyum arsenite karşı folik asidin SWV/Fnn (bir sıçan çeşidi) embriyo fibroblastlarında koruyucu etkili olduğunu göstermiştir. Daly *et al.* (1997) ise yiyeceklere çok az miktarlarda folik asidin eklenmesinin nöral tüp defektlerine karşı en etkili çözüm olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle kolon, prostat ve göğüs kanserlerinin beslenme alışkanlıklarındaki bozukluklar ile ortaya çıktığı ve çeşitli enzim sistemlerinin çalışmamasının mutasyonları tetikleyeceği belirtilmektedir (Ferguson *et al.* 2004). Bu enzim sistemlerinden birisi olan xeneobiotik metabolizma enzim sistemleri, bitkisel östrojenler tarafından inhibisyona uğrasalar da diyetle folik asit alınması sonucu, yeniden aktivite kazanabilmektedirler. Hibbard and Smithells (1965), folik asit eksikliği olan insanlarda merkezi sinir sistemine ait defektlerin, Daniel *et al.* (1971) ise yeni doğanlarda anneye bağlı folat eksikliğinde önemli konjenital malformasyonların (doğuştan meydana gelen fizyolojik ve morfolojik bozukluklar) meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ancak, hamileliğin erken dönemlerinde anne tarafından folik asit alınması ile nöral tüpün kapanmaması sonucu meydana gelen konjenital anormallikler önemli ölçüde önlenabilmektedir (Kalter 2000). Pamukçu *et al.* (2004), fareleri kullanarak yaptıkları çalışmalarında, 300 mg/kg valporik asiti gebeliğin 8. 9. ve 10. günlerinde uygulamışlar ve onların karaciğer kesitlerinde çeşitli hücresel dejenerasyonlar (perivenüler dilatasyon, kupffer hücre şişmesi, mikroveziküler steatozis) gözlemişlerdir. Valporik asit+folik asit içeren deney grubunda ise folik asidin hepatotoksik etkiyi azalttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak diyebiliriz ki, çalışmalarımızda kullandığımız bitkisel östrojenlerden glisitein ve koumestrol, negatif ya da önemsiz genotoksik etkiye sahipken, kuersetin, zearalenon, genistein ve daidzein, hem pozitif genotoksik, hem de rekombinojenik etkilidirler. Çok düşük dozlarda bile etkili oldukları gözlenmiştir. Bu maddeler, deneysel organizmamız *D. melanogaster*'de DNA'nın hipometilasyonuna neden olarak somatik mutasyonları oluşturmuştur. Ancak, folik asit ile bu tip mutasyonların meydana gelişi önemli ölçüde önlenmiştir. Kısa süreli test tekniklerinden birisi olan *D. melanogaster* ile yapılan bu çalışmada, bitkisel östrojenlerin geri dönüşümsüz etkileri ile vitaminlerin organizmaların normal gelişimi için özellikle erken gelişim dönemlerinde gerekli olduğu gösterilmeye çalışılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adlercreutz, H., 1995. Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environmental Health Perspectives*, 7, 103-112.
- Adlercreutz, H. and Mazur, W., 1997. Phytoestrogens and Western diseases. *Annals of Internal Medicine*, 29, 95-120.
- Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., Höckerstedt, K., Hämäläinen, E., Wähälä, K., Mäkelä, T. and Hase, T., 1992. Dietary phytoestrogens and cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 331-337.
- Akaza, H., Miyanaga, N., Takashima, N., Naito, S., Hirao, Y., Tsukamoto, T., Fujioka, T., Mori, M., Kim, W.J., Song J.M. and Pantuck, A.J., 2004. Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 34, 86-39.
- Akingbemi, B.T., Braden, T.D., Kemppainen, B.W., Hancock, K.D., Sherrill, J.D., Cook, S.J., He, X. and Supko, J.G., 2007. Exposure to phytoestrogens in the perinatal period affects androgen secretion by testicular Leydig cells in the adult rat. *Endocrinology* 148, 4475-4488.
- Aksoy, M., 2000. Beslenme Biyokimyası. Hatipoğlu Yayınevi, 126/42.
- Allison, A.C. and Paton, G.R., 1965. Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. *Nature (London)*, 207, 1170.
- Alonso- Moraga, A. and Graf, U., 1989. Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis*, 4, 105-110.
- Amaral, V.S., Silva, R.M., Reguly, M.L. and Andrade, H.H.R., 2005. *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutation Research*, 583, 67-74.
- Amaral, V.S., Sinigaglia, M., Reguly, M.L. and Andrade, H.H.R., 2006. Genetic Toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* Wing-Spot Test. *Environmental Pollution*, 139, 469-476.
- Ames, B.N., 2001. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research*. 475, 7-20.
- Ames, B.N., Mc Cann, J. and Yamasaki, E., 1975. Models for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31, 347-364.
- Anderson, D., Basaran, N., Dobrzynska, M.M., Basaran, A.A. and Yu, T.W., 1997a. Modulation effects of flavonoids on food mutagens in human blood and sperm samples in the comet assay, Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 17, 45-58.
- Anderson, D., Dobrzynska, M. and Basaran, N., 1997b. Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the comet assay. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 17, 29-43.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Hughes, C.L. Jr., Morgan, T.M. and Burke, G.L., 1996. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factor without affecting the

- reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. The Journal of Nutrition, 126, 43-50.
- Aşkın, H., Uysal, H. and Altun, D. 2007. Preventive role of folic acid on the developmental toxicity of phenol in *Drosophila melanogaster*. Toxicology and Industrial Health, 23, 591-598.
- Aşkın, H., Uysal, H. ve Altun, D. Zearalenonenin toksik etkilerine karşı *Drosophila melanogaster*'de folik asidin iyileştirici etkileri. Türkiye 10.Gıda Kongresi, Erzurum, 21-23 Mayıs 2008.
- Aşkın, H., Uysal, H. ve Altun, D. Kronik genistein uygulamasının *Drosophila melanogaster*'de fertilite ve ömür uzunluğu üzerine etkileri". 19.Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, 23- 27 Haziran 2008.
- Auroma, O.I. and Murcia, A., 1993. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 1880-1885.
- Avila, M.A, Velasco, J.A, Cansado, J. and Notario, V., 1994. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast-cancer cell line MDA-MB468. Cancer Research, 54, 2424-2428.
- Bakırel, T. ve Keleş, O. 2002. Farelerde *Trifolium pratense*'nin spermatogenezis üzerine etkisi ve akut toksisitesi. The Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 26, 555-559.
- Bartholomew, R. and Ryan, D., 1980. Lack of mutagenicity of some phytoestrogens in the *Salmonella*/mammalian microsome assay, Mutation Research, 78, 317-321.
- Başaran, A.A., 2002. Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir. ISMN 975-94077-2-8.
- Batiste-Alentorn, M., Xamena, N., Creus and Marcos, R., 1995. Genotoxicity testing of five compounds in three *Drosophila* short-term somatic assay. Mutation Research, 341, 161-167.
- Baysal, A., 1990. Beslenme, Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara.
- Benasutti, M., Ejadi, S., Whitlow, M.D. and Loechler, E.L., 1988. Mapping the binding site of aflatoxinB₁ in DNA: Systematic analysis of reactivity of aflatoxin B₁ with guanines in different DNA sequences. The Biochemical Journal, 27, 472-481.
- Betina, V., 1989. Biological effect of mycotoxins. Mycotoxins: Chemical. Ed: Betina, V., Biological and Environmental Aspects. Elsevier, Amsterdam, 42- 58.
- Billing, H., Fuerta, I. and Hsueh, A.J.W., 1993. Estrogens inhibit and androgen enhance ovarian granulosa cell apoptosis. Endocrinology, 133, 2204-2212.
- Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L. and Coward, A., 1998. Phytoestrogens: Where are we now? The British Journal of Nutrition, 79, 393-406.
- Bhattacharya, R.K., Francis, A.R. and Shetty, T.K., 1987. Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B₁: In vitro effect of vitamins. Mutation Research, 188, 121-128.
- Bonet, B., Otero, P., Viana, M. and Herrera, E., 1996. Antioxidant and prooxidant effects of vitamin C and flavonoids on LDL oxidation. Abstracts of papers, VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research, University of Barcelona, Spain, 75.
- Botto, L.D., Mulinare, J., and Erickson, J.D., 2000. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use. American Journal of Epidemiology, 151 (9), 878-884.

- Breinholt, V. and Larsen, J., 1998. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chemical Research in Toxicology*, 11, 622-629.
- Burak, M. ve Çimen Y., 1999. Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 296-304.
- Busbee, D.L., Norman, J.O. and Ziprin, R.L., 1990. Comparative uptake, vascular transport and cellular internalization of aflatoxin B1 and benzo(a)pyrene. *Archives of Toxicology*, 64, 285-290.
- Büyüktuncer, Z. ve Başaran, A., 2005. Fitoöstrojenler ve Sağlıklı Yaşamdaki Önemleri. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 25 (2), 79-94.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22 (5), 749-60.
- Carver, J., Carrano, A. and Gregor, M.J., 1983. Genetic effects of the flavonols quaresetin, kaempferol and galangin on Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*, 113, 45-60.
- Casida, J.E., 1969. Insect microsomes and insecticide chemical oxidations. Eds: Gillette, J.R., Conney, A.H., Cosmides, G.J., Estabrook, R.W., Fouts, J.R. and Mannering, G.J., *Microsomes and drug oxidations*. Academic Press. New York, 517-531.
- Cassidy, A., Hanley, B. and Raventos, R., 2000. Isoflavones, lignans and stilbens-origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1044-1062.
- Cavin, C., Holzhauser, D., Constable, A., Huggett, A.C. and Schilter, B., 1998. The coffee spesific diterpens cafestol and kahweol protect against aflatoxin-induced genotoxicity through a dual mechanism. *Carcinogenesis*, 19 (8), 1396-1375.
- Chen, A.T.L., Reidy, J.A., Annest, J.L., Welty T.K. and Zhou, H.G., 1989. Increased chromosome fragility as a consequence of blood folate levels, smoking status and coffee consumption, *Environmental Molecular Mutagenesis*, 13, 319-324.
- Cholbi, M., Paya, M. and Alcaraz, M., 1991. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄ microsomal lipid peroxidation. *Experienta*, 47, 195-199.
- Clark, A.M. and Rockstein, M., 1964. Aging in insects. *Physiology of insecta*, 1, 227-281.
- Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers J.P., 1996. *Our Stolen Future*, 76 p. New York, Penguin Books.
- Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M. and Stetina, R. 1996. Oxydative damage to DNA, Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*, 104 (3), 465-469.
- Collins, B.M., Mc Lanchlan, J.A. and Arnold, S.F., 1997. The estrogenic and antiestrogenic activites of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids*, 62, 365-372.
- Coşkun, B. ve İmir, M., 1991. Yem maddelerindeki östrojenik etkili maddeler ve hayvanlar üzerindeki etkileri. *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi*, 11, 21-24.
- Crotta, J.W., Choia, S.W., Branda, R.F. and Masona, J.B., 2005. Accumulation of mitochondrial DNA deletions is age, tissue and folate-dependent in rats. *Mutation Research*, 570, 63-70.
- Cunha, K.S., Regulý, M.L., GRAF, U. and Andrade, H.H.R., 2002. Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolitic

- chemotherapeutic drugs in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research, 514, 95-103.
- Czeczot, H., Tudek, B., Kusztelak, J., Szymczyk, T., Dobrowolska, B., Glinkowska, G., Malinowski, J. and Strzelecka, H., 1990. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs, Mutation Research, 240, 209-216.
- Czeizel, A.E., and Dudas, I., 1992. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. The New England Journal of Medicine, 327, 32-35.
- Çakır, Ş. and Sarıkaya, R., 2005. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. Food and Chemical Toxicology, 43, 443-450.
- Çetin, N.D., 2005. X-bandındaki elektromanyetik alanın *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon oluşumuna etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Dai, X.D., Chen, A.T.L., Reidy, J.A., Annest, J.L. and Gren, R.L., 1986. Folic acid and chromosome breakage. IV. Variance estimates from longitudinal studies of normal individuals and their implications for sample size and power to detect differences between populations. Mutation Research, 174, 115-119.
- Daly, S., Mills, J.L., Molloy, A.M., Conley, M., Lee, Y.J., Kirke, P.N., Weir, D.G. and Scott, J.M., 1997. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. Lancet, 350, 1666-1669.
- Daniel, W.A., Mounger, J.R. and Perkins, J.C., 1971. Obstetric and fetal complications in folate-deficient adolescent girls. American, 111, 233-238.
- da Silva, J., Herrmann, S.M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marroni, N., Gonzalez-Gallego, J. and Erdtmann, B., 2002. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. Food and Chemical Toxicology, 40, 941-947.
- Davis, S., Dalais, F., Simpson, E. and Murkies, A., 1999. Phytoestrogens in health and disease. Recent Progress in Hormone Research, 54, 185-211.
- Dees, C., Foster, J.S., Ahamed, S. and Wimalasena, J., 1997. Dietary estrogens stimulate breast cells to enter the cell cycle. Environmental Health Perspectives, 105 (3), 633-636.
- Domon, O.E., McGarrity, L.J., Bishop, M., Yoshioka, M., Chen, J.J. and Morris, S.M., 2001. Evaluation of the genotoxicity of the phytoestrogen, coumestrol, in AHH-1 $TK^{+/-}$ human lymphoblastoid cells. Mutation Research, 474, 129-137.
- Donnelly, J.G., 2001. Folic acid. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 38 (3), 183-223.
- Ecobichon, D.J., 1997. The basis of toxicity testing, CRC Press, New York, 1-7.
- Egel, C., Bilaloglu, R. and Aydemir, N., 2002. Inhibitory effects of ascorbic acid and folic acid on chromosome aberrations induced by pyrimethamine *in vitro*. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 22 (5), 353-362.
- Emmens, C.W., 1942. Oestrogens and pro-oestrogens related to stilbene and triphenylethylene. Journal of Endocrinology, 3, 168-173.
- Eroğlu, A., 1993. Fitoöstrojenler ve fertilite. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1 (12): 119-126.

- Everson, R.B., Wehr, C.M., Erexson, G.L. and MacGregor, J.T., 1980. Association of marginal folate depletion with increased human chromosomal damage in vivo: demonstration by analysis of micronucleated erythrocytes, *Journal of National Cancer Institution*, 80, 525-529.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The Comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.
- Fenech, M., 2001. The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells, *Mutation Research*. 475, 57-67.
- Fenech, M., 2005. The genome health clinic and genome health nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis*, 20, 255-269.
- Ferguson, L.R., Philpott, M. and Karunasinghe, N., 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198, 147-159.
- Fırat, D., Kuntsal, L. and Şirin, Y., 2005. Protective effects of prenatal administration of folic acid on retinoic acid-induced cellular damages of Meckel's cartilage in rats. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 205, 27-36.
- Fimognari, C., Berti, F., Cantelli-Forti, G. and Hrelia, P., 2004. Effect of cyanidin 3-O-beta-glucopyranoside on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four different mutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43, 45-52.
- Frei, H. and Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Frei, H. and Würgler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*, 334, 247-258.
- Frei, H. and Würgler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 11 (4), 315-325.
- Frei, H., Clements, J., Howe, D. and Würgler, F.E., 1992. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *D. melanogaster*. *Mutation Research*, 279, 21-33.
- Formica, J.V. and Regelson, W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080.
- Frankenfeld, C.L., Mc Tiernan, A., Aiello, E.J., Thomas, W.K., La Croix, K., Schramm, J., Schwartz, S.M., Holt, V.L. and Lampe, J.W., 2004. Mammographic density in relation to daidzein-metabolizing phenotypes in overweight, postmenopausal women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 13, 1156-1162.
- Frankenfeld, C.L., Atkinson, C., Thomas, W.K., Gonzalez, A., Jokela, T., Wahala, K., Schwartz, S.M., Li, S.S. and Lampe, J.W., 2005. High concordance of daidzein-metabolizing phenotypes in individuals measured 1 to 3 years apart. *The British Journal of Nutrition*, 94, 873-876.
- Gaivao, I.L., Sierra, M., and Miguel, A., 1999. The w/w⁺ SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reactive oxygen species inducing compounds. *Mutation Research*, 440, 139-145.
- Giri, A.K. and Lu, L.J., 1995. Genetic damage and the inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genetic damage by the phytoestrogens, genistein and daidzein, in female ICR mice. *Cancer Letters*, 95 (1-2), 125-133.

- Glover, T.W., 1982. FUdR induction of the X chromosome fragile site; evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *American Journal of Human Genetics*, 33, 234-242.
- Gotoh, T., Yamada, K., Yin, H., Ito, A., Kataoka, T. and Dohi, K., 1998. Chemoprevention of N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis by soy foods or biochanin. A. *Japanese Journal of Cancer Research*, 89 (2), 137-142.
- Gould, E.M., Rembold, C.M. and Murphy, R.A., 1995. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, reduces Ca^{2+} mobilization in swine carotid media. *The American Journal of Physiology*, 37, 1425-1429.
- Graf, U., 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experimentia*, 51, 168-173.
- Graf, U. and Singer, D., 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 8, 15-27.
- Graf, U. and Van Schaik, N., 1992. Improved high bioaktivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 271, 59-67.
- Graf, U. and Würgler, F.E., 1996. 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, 219-226.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzman-Rincon, J. and Würgler, F.E. 1998, Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 402, 203-209.
- Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A.J. and Würgler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 222, 359-373.
- Graf, U., Hall, C.B. and Van Schaik, N., 1990. On the use of excision repair of detective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16, 225-237.
- Graf, U., Moraga, A.A., Castro, G.U.R. and Carrillo, E., 1994. Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Food and Chemical Toxicology*. 32, 423-430.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G., 1984. Somatic mutation test in *Drosophila melanogaster*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 6, 153-188.
- Grifits, A.J., Miller, J.H. Suzuki, D.T., Lewantin, R.C. and Gelbart, W.M. 2000. An introduction to genetic analysis. Seventh Edition, W.H. Freeman XVII, 860, New York.
- Güler, N. and Liman, B.C. 2005. The investigation of vitamin B₁₂, folic acid and biotin content of different plant species by enzyme immuno assay. *Journal of Health Sciences*, 14 (3), 184-190.
- Gültekin, E. and Yıldız, F. 2002. Phytoestrogens in functional foods. 270 Madison Avenue New York, NY 10016. ISBN L-57444-508-L.
- Güney, O., Canbilen, A., Konak A., and Acar, O., 2003. The effects of folic acid in the prevention of neural tube development defects caused by phenytoin in early chick embryos. *Spine*, 28 (5), 442-445.

- Hancock, K.D., Coleman, E.S., Tao, Y.X., Morrison, E.E., Braden, T.D., Kemppainen, B.W. and Akingbemi, B.T., 2008. Genistein decreases androgen biosynthesis in rat Leydig cells by interference with luteinizing hormone-dependent signaling. *Toxicology Letters*, in press.
- Harris, R.M., Waring, R.H., Kirk, C.J. and Hughes, P.J., 2000. Sulphation of oestrogenic alkylphenols and 17- β -estradiol by human platelet phenol sulphotransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 159-166.
- Hedelin, M., Klint, A., Chang, E.T., Bellocchio, R., Johansson, J.E., Andersson, S.O., Heinonen, S.M., Adlercreutz, H., Adami, H.O., Grönberg, H. and Bälter, K.A., 2006. Dietary phytoestrogen, serum enterolactone and risk of prostate cancer: the cancer prostate Sweden study (Sweden). *Cancer Causes & Control*, 17 (2), 169-180.
- Herepuldito, M.E., Duenas, G.I., Partida, L.C., Garcia, A.S., Sousa, M.C., Diaz, A.D. and Graf, U., 2004. Genotoxicity of tamoxifen citate and 4-nitroquinolin-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 19, 187-193.
- Hibbard, E.D. and Smithells, R.W., 1965. Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet*, 1, 1254-1255.
- Hoffman, G.R., 1991. Casarett and Doull's toxicology the basic science of poisons, Pergamon Press, New York, 201-217.
- Houk, V.S., 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research*, 277, 91-138.
- Huges, C.R., 1988. Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environmental Health Protection*, 78, 171-175.
- IPCS, 1985. Guide to Short-term Test for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemicals. World Health Organization. Pp 208, Geneva.
- Iwaki, M., Kitagawa, T., Akamatsu, Y. and Aibara, K., 1990. Cytotoxic effects of aflatoxin B₁ and its association with cellular components in chicken embryo Primary cultured cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1035, 146-153.
- Iwonna, R.S., 2002. The inhibitory effect of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases in vitro and lack of recombinagenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 518, 205-213.
- Janssen, M.M.T., Put, H.M.C. and Nout, M.J.R., 1997. Natural Toxins , In: Vries J. (Ed) Food Safety and Toxicology, CRC Press, USA.
- Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Newbold, R.R., 2007. Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: genistein as an example. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (7), 832-844.
- Jensen, S.R. and Schripsema, J., 2002. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. *Gentianaceae-Systematics and Natural History*, Ed: Struwe, L. and Albert, V., Cambridge University Press.
- Ji, S., Willis, G.M., Frank, G.R., Cornelius, S.G. and Spurlock, M.E., 1999. Soybean isoflavones, genistein and genistin, inhibit rat myoblast proliferation, fusion and myotube protein synthesis. *Journal of Nutrition*, 129, 1291-1297.
- Jung, T., Fulka, J., Lee, C. and Moor, R.M., 1993. Effects of the protein phosphorylation inhibitor genistein on maturation of pig oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98 529-535.

- Kalter, H., 2000. Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. *Reproductive Toxicology*, 14, 463–476.
- Karekar, V., Joshi, S. and Shinde, S.L., 2000. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 468, 183-194.
- Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, 9, 527-549.
- Kaur, S. and Srivastava, B.G., 1991. Effect of B-vitamins on various parameters of reproductive potential of *Dacus cucurbitae* (Coquillett). *Indian Journal of Entomology*, 53, 543-547.
- Kaya, B., 2000. Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Antalya, Türkiye.
- Kaya, B., 2003. Askorbik Asitin Üç Alkilleyici Ajanın Mutajenik Dozuna Anti-Genotoksik Etkisi. *Türk Journal of Biology*, 27, 241-246.
- Kaya, B., Markos, R., Yanıkoglu, A. and Creus, A., 2004. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation Research*, 557, 53-66.
- Kaya, B., Kocaoğlu, S. and Demir, E., 2006. Analysis of UV-stimulated recombination in the *Drosophila* SMART assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, 357-361.
- Kelly, G., Husband, A. and Waring, M., 1998a. Monograph: Phenolic Phytoestrogens. Natural Product Research Consult, 11 pp.
- Kelly, G., Husband, A. and Waring, M., 1998b. Monograph: Phenolic Phytoestrogens. Natural Product Research Consult, 9 pp.
- Kelly, G., Husband, A. and Waring, M., 1998c. Monograph: Phenolic Phytoestrogens. Natural Product Research Consult, 8 pp.
- Klung, W.S. and Cummings, M.R. 2002. Genetik Kavramlar, xxv, 816, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Koch, H., 1981. Leitfaden der Medizinischen Mykologie, Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 150 pp.
- Kunz, B.A., 1988. Mutagenesis and deoxyribonucleotide pool imbalance, *Mutation Research*, 200, 133-147.
- Kuiper-Goodman T., Scott, P.M. and Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7, 253-306.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138, 863-870.
- Kulling, S.E. and Metzler, M., 1997. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 605-613.
- Kulling, S.E., Lehmann, L. and Metzler, M., 2002. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *Journal of Chromatography B*, 777, 211-218.

- Lamartiniere, C.A., Moore, J., Holland, M. and Barnes, S., 1995. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proceed Society Experimental Biology and Medicine*, 208, 120-123.
- Lamnaouer, D., 1999. Anticoagulant activity of coumarins from *Ferula communis* L. *Therapie*, 54 (6), 747-751.
- Lassmar, B. and Valadares, B., 2002. Antirecombinagenic activity of propolis against recombinagenic activity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 3-5.
- Latt, S.A., Allen, J., Bloom, S.E., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schreck, R., Tice, R., Whitfield, B. and Wolff, S., 1981. Sister-chromatid exchanges: A report of the Gene-tox Program. *Mutation Research*, 57, 17-62.
- Lazzari, G., Tessaro, I., Crotti, G., Gali, C., Hoffmann, S., Bremer, S. and Pellizzer, C., 2008. Development of an in vitro test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233, 360-370.
- Lee, H., Kim, J.M., Kim, H.J., Lee, I. and Chang, N., 2005. Folic acid supplementation can reduce the endothelial damage in rat brain microvasculature due to hyperhomocysteinemia. *The Journal of Nutrition*, 135 (3), 544-548.
- Leeson, S., Diaz, G. and Summers, J.D., 1995. Aflatoxins, In "Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins", Eds: Leeson, S., Gonzala, J.D.G. and Summers, J.D., University Books, 249-298, P Box: 1326, Guelph, Canada.
- Lewis, E.B. and Bacher, F., 1968. Methods of feeding ethylmethanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Information Service*, 43, 193.
- Levan, A., 1938. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, 24, 471-486.
- Li, X.Z., Reidy, J.A., Wheeler, V.A. and Chen, A.T.L., 1986. Folic acid and chromosome breakage. III. Types and frequencies of spontaneous chromosome aberrations in proliferating lymphocytes, *Mutation Research*, 173, 131-134.
- Li, D.K., Daling, J.R., Mueller, B.A., Hickok, D.E., Fantel, A.G., and Weiss, N.S., 1995. Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. *Epidemiology*, 6, 212-218.
- Lindsley, D.L. and Zimm, G.G. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, 1133 pp. San Diego, CA.
- Lioi, M.B., Santoro, A., Barbieri, R., Salzano, S. and Ursini, M.V., 2004. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research*, 557, 19-27.
- Mac Gregor, J. and Jurd, L., 1978. Mutagenicity of plant flavanoids: Structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 54, 297-309.
- Mac Gregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M. and Margolin, B.H., 1987. Guide lines for the conduct of micronucleus assay in bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, 189, 103-112.
- Magdalena, R.J., Juan, C.S., Mohamed, A., Andres, M.S. and Angeles, A.M., 2005. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Research*, 585, 147-155.

- Maki, H., 2002. Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequens-substitution mutagenes. *Annual Review of Genetics*, 36, 279-303.
- Malling, H.V., 2004. Incorporation of mammalian metabolism into mutagenicity testing. *Mutation Research*, 566, 183-189.
- Marec, F. and Gelbic, I., 1994. High recombinogenic activities of three antiviral agents, adenine derivatives in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 311, 305- 317.
- Mazur, L. and Blawat, A., 1999. Effects of GSH and WR-2721 on induction of micronuclei by cyclophosphamide. *Toxicology Letters*, 110, 67-72.
- McClain, R.M., Wolz, E., Davidovic, A. and Bausch, J., 2006. Genetic toxicity studies with genistein. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 42-55.
- McLean, M. and Dutton, M.F., 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology & therapeutics*, 65, 163-192.
- Meloni, F., Ballabio, P., Gorrioni, M., De Amici, M., Marena, C. and Malandrino, S., 1995. Effects of 3'-hydroxyfarrerol(IdB 1031), a novel flavonoid agent, on phagocyte products. *Inflammation*, 19(6), 689-699.
- Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D. and Barnes, S., 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutrition and Cancer*, 21, 113-131.
- Milligan, S.R., Kalita, J.C., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L. and De Keukeleire, D., 1999. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 2249-2252.
- Minervini, F., Dell'Aquila, M.E., Maritato, F., Minoia, P. and Visconti, A., 2001. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on *in vitro* maturation of bovine oocytes and 17 β -estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in vitro*, 15, 489-495.
- Mitchell, H.K., Snell, E.E. and Williams, R.J., 1941. The concentration of folic acid. *Journal of the American Chemical Society*, (63), 2284.
- Munoz, E.R. and Barnett, B.M., 2002. The rodent carcinogens 1,4-dioxane and thiourea induce meiotic non-disjunction in *D. melanogaster* females. *Mutation Research*, 517, 231-238.
- Müller, H.J., 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66, 84-87.
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K. and Ono, H., 2001. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology*, 15 (4), 399-411.
- Nagata, C., 2000. Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan. *International Journal of Epidemiology*, 29 (5), 832-836.
- Natarajan, A.T. and Obe, G., 1986. How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens. *Mutation Research*, 167, 189-201.
- Nation, N.P., 1989. Alsike clover poisoning: A review. *The Canadian Veterinary Journal*, 30, 410-413.
- Nebel, M.C., Larripa, I. and González-Cid, M., 2002. Differential antigenotoxic and cytoprotective effect of amifostine in idarubicin-treated mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 39, 3-9.

- Negishi, T., Negishi, K., Ryo, H., Kando, S. and Hayatsu, S., 1988. The genotoxicity of N⁴-aminocytidine in the *Drosophila* wing spot test. *Mutagenesis*, 3 (1), 11-13.
- Newbold, R.R., Banks, E.P., Bullock, B. and Jefferson, W.N., 2001. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Research*, 61 (11), 4325-4328.
- Noroozi, M., Angerson, W.J. and Lean, M.E.J., 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 1210-1218.
- Ososki, A.L. and Kennelly, E.J., 2003. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research*, 17, 845-869.
- Özata, L., 2006. Bazı tekstil boyalarının *Drosophila melanogaster* üzerine toksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, Türkiye.
- Pagliacci, M.C., Smacchia, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi, C. and Nicoletti I., 1994. Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Cancer*, 30A (11), 1675-1682.
- Pamukçu, Ö.B., Yıldırım, A. and Akkuş, M., 2004. The protective role of folic acid and vitamin E against toxic effects of valproic acid on liver tissue during period of gestation. *Dicle Tıp Dergisi*, 31(4), 17-23.
- Pantaleao, S.M., Alcantara, A.V., Alves, J.P.H., Pavanin, L.A., Graf, U., Rezende, A.A.A., Valadares, B.L.B., Fragiorgo, E.J., Souza, N.C., Gutierrez, Z.R. and Spano, M.A., 2007. Assessing the impact of pollution on the Japarutaba river in Brazil using the *Drosophila* wing spot test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48, 96-105.
- Park, C., So, H.S., Shin, C.H., Baek, S.H., Moon, B.S., Shin, S.H., Lee, H.S., Lee, D.W. and Park, R., 2003. Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1287-1295.
- Perry, A.S., and Miller, S., 1965. The essential role of folic acid and the effect of antimetabolites on growth and metamorphosis of housefly larvae *Musca domestica* L. *Journal of Insect Physiology*, 11, 1277-1287.
- Peterson, G., 1995. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumour cells. *The Journal of Nutrition*, 125, 7845-7895.
- Petersson, H. and Kiessling, K.H., 1984. Liquid chromatographic determination of the plant oestrogens coumestrol and isoflavones in animal feed. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 67, 503-506.
- Pimenta, V.M.S.D., Nepomuceno, J.C. and Pavanin, L.A. 2008. Genotoxicity of water from the Paraguay River near Cáceres-MT, Brazil in the *Drosophila* wing spot test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49, 458-466.
- Pool-Zobel, B.L., Adlercreutz, H., Gleis, M., Liegibel, U.M., Sittlington, J., Rowland, I., Wahala, K. and Rechkemmer, G., 2000. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis* 21, 1247-1252.
- Popp, R. and Schimmer, O., 1991. Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. *Mutation Research*, 246, 205-213.

- Prakash, A.O., Pathak, S. and Mathur, R., 1991. Postcoital contraceptive action in rats of a hexane extract of the aerial parts of *Ferula jaeschkeana*. Journal of Ethnopharmacology, 4 (2-3), 221-234.
- Pratt, D.E., Di Pietro, C., Porter, W. L. and Giffey, J.W., 1981. Phenolic antioxidants of soy protein hydrolyzates. Journal of Food Science, 47, 24-25.
- Reidy, J.A., Zhou, X. and Chen, A.T.L., 1983. Folic acid and chromosome breakage. I. Implications for genotoxicity studies, Mutation Research, 122, 217-221.
- Reinli, K. and Block, G., 1996. Phytoestrogen content of foods- A compendium of literatura values. Nutrition and Cancer, 26, 123-148.
- Rincon, G.J. and Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. Ed: Butterworh, F.M., New York, 169-181.
- Rosenkranz, H.S. and Klogman, G., 1996. Relationship between electronegativity and genotoxicity. Mutation Research, 328, 215-227.
- Roy, D. and Liehr, J., 1999. Estrogen, DNA damage and mutations. Mutation Research, 424, 107-115.
- Ruan, Y., Peterson, M.H., Wauson, E.M., Gelineau, J., Waes, V., Finnell, R.H. and Vorce, R.L., 2000. Folic acid protects SWV : Fnn embryo fibroblasts against arsenic toxicity. Toxicology Letters, 117, 129-130.
- Sahu, R.K., Basu, R. and Sharrma, A., 1981. Genetic toxicological testing of some plant flavonoids by the micronucleus test. Mutation Research, 89, 69-74.
- Sam, K. and Chang, C., 2002. Isoflavones From Soybeans And Soy Foods. Functional Foods Biochemical And Processing Aspects, Eds: Gaza, M., de CRC Press, New York.
- Sarikaya, R. and Çakır, Ş., 2005. Genotoxicity of food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. Environmental Toxicology and Pharmacology, 20, 424-430.
- Satyanarayana, P., Singh, D. and Chopra, K., 2001. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cyclosporine in rats. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 23, 175-181.
- Scambia, G, Panici, P.B., Ranelletti, F.O., Ferrandina, G., De Vincenzo, R., Piantelli, M., Masciullo, V., Bonanno, G., Isola, G. and Mancuso, S., 1994. Quercetin enhances transforming growth factor beta 1 secretion by human ovarian cancer. International Journal of Cancer, 57 (2), 211-215.
- Schaik, V.N. and Graf, U., 1991. Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressant in the wing somatic mutation and recombination test in *D. melanogaster*. Mutation Research, 260, 99-104.
- Schlumpf, M. and Lichtensteiger, W., 1996. Sinkt die Fertilität? Verlag Kind und Umwelt, Zurich, Schweiz.
- Schmitt, E., Dekant, W. and Stopper, H., 2001. Estrogenic and genotoxic potential of phytoestrogens promoted as "natural" alternatives to estrogen-replacement therapy. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 363, R145.
- Schmitt, E., Metzler, M., Jonas, R., Dekant, W. and Stopper, H., 2003. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. Mutation Research, 542, 43-48.

- Selby, P.B. and Olsen, W.H., 1981. Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate in mice indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Sencer, E., 1991. Beslenme ve Diyet. Güven Matbaası, İstanbul, 195-214.
- Setchell, K.D.R., Gosselin, S.J. Welsh, M.B., Johnston, J.O., Balistreri, W.F., Kramer, L.W., Dresser, B.L. and Tarr, M.J., 1987. Dietary estrogens- A probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology*, 93, 225-233.
- Sevim, N., 2006. Değişik kimyasalların *Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde (SMART) amifostine ile etkileşimleri. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye.
- Sharpe, R.M., 1994. Regulation of spermatogenesis. The physiology of reproduction. Eds: Knobil, E., Neill, J.D., New York, 2nd Edition, Raven Press, 1363-1434.
- Sharpe, R.M., Turner, K.J., McKinnell, C., Groome, N.P., Atanassova, N., Millar, Buchanan, D.L. and Cooke, P.S., 1999. Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of sertoli cell number. *Journal of Andrology*, 20 (1), 94-101.
- Sharpe, R.M., Walker, M.R., Millar, M.R., Atanassova, N., Morris, K., McKinnell, Saunders, P.T.K. and Fraser, H.M., 2000. Effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist administration on sertoli cell number and testicular development in the marmoset: comparison with the rat. *Biology of Reproduction*, 62, 1685-1693.
- Shutt, D.A. and Cox, R.I., 1972. Steroid and phytoestrogen binding to sheep uterine receptors *in vitro*. *The Journal of Endocrinology*, 52, 299-305.
- Silva, A.E., Manzato, A.J. and Garcia, M.V., 1992. Sister chromatid exchanges in b-thalassaemic patients under conditions of in vivo and in vitro depletion of folic acid, *Mutation Research*, 282, 213-217.
- Singh, J., Hunt, P., Eggo, M.C., Sheppard, M.C., Kirk, C.J. and Michell, R.H., 1996. Thyroid-stimulating hormone rapidly stimulates inositol polyphosphate formation in FRTL-5 thyrocytes without activating phosphoinositidase C. *The Biochemical Journal*, 316, 175-182.
- Smith, C.A. and Wood, E.J. 1991. *Molecular Biology and Biotechnology*. First edition, Chapman and Hall Limited, London.
- Sohn, S., Huh, I., Au, W. and Heo, M., 1998. Antigenotoxicity of galangin against *N*-methyl-*N*-nitrosourea. *Mutation Research*, 402, 231-236.
- Spano, M.A., Frei, H., Würzler, F.E. and Graf, U., 2004. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, 16, 385-394.
- Spiegelstein, O., Gould, A., Wlodarczyk, B., Tsie, M., Lu, X., Le, C., Troen, A., Selhub, J., Piedrahita, J.A., Salbaum, J.M., Kappen, C., Melnyk, S., James, J. and Finnell, R.H., 2005. Developmental consequences of in utero sodium arsenate exposure in mice with folate transport deficiencies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203 (1), 18-26.
- Steinmetz, K.A. and Potter, J.D., 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 1027-1039.
- Stoewsand, G., Anderson, J., Boyd, J., Hrazdina, G., Babish, J., Walsh, K. and Losco, P., 1984. Quercetin: a mutagen, not a carcinogen, in Fischer rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 14 (2-3), 105-114.

- Stopper, H., Schmitt, E. and Kobras, K., 2005. Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutation Research*, 574, 139-155.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. and Hejia, G., 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mozaik and the sex-linked recessive letal test. *Mutation Research*, 113, 117-133.
- Taira, K., Miyashita, Y., Okamoto, K., Arimoto, S., Takahashi, E. and Negishi, T. 2005. Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Mutation Research*, 586, 115-123.
- Takao, K., Okada, M.O., Ikehata M. and Nakagawa, M. 1997. Increase in the mitotic recombination frequency in *Drosophila melanogaster* by magnetic field exposure and its suppression by vitamin E supplement. *Mutation Research*, 373, 55-60.
- Tang, B.Y. and Adams, N.S., 1980. Effects of equol on oestrogen receptors and on DNA and protein in the immature rat uterus. *The Journal of Endocrinology*, 85, 291-297.
- Teo, T. and Fenech, M., 2008. The interactive effect of alcohol and folic acid on genome stability in human WIL2-NS cells measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation Research*, 657, 32-38
- Thigpen, J.E., Locklear, J., Haseman, J.K., Saunders, H., Grant, M.F. and Forsythe, D.B., 2001. Effects of the dietary phytoestrogens daidzein and genistein on the incidence of vulvar carcinomas in 129/J mice. *Cancer Detection and Prevention*, 25 (6), 527-532.
- Thust, R., Kneist, S. and Huhne, V., 1983. Genotoxicity of *Fusarium* mycotoxins (nivalenol, fusarenon-X, T-2 toxin, and zearalenone) in Chinese hamster V79-E cells *in vitro*. *Archiv für Geschwulstforschung*, 53, 9-15.
- Tiburi, M., Reguly, M.L., Schwartzmann, G. and Cunha, K.S., 2002. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 1-9.
- Toda, S. and Shirataki, Y., 1999. Inhibitory Effects of Isoflavones on Lipid Peroxidation By Reactive Oxygen Species. *Phytotherapy Research*, 13, 163-165.
- Torres, C., Ribas, G., Xamena, N., Creus, A. and Marcos, R., 1992. Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 280, 191-295.
- Torres, C., Creus, A. and Marcos, R., 1998. Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cells of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay. *Mutation Research*, 413, 191-203.
- Trust, C.W., 2008. Eating well for under-5s in child care practical and nutritional guidelines, 2nd Edition (www.cwt.org.uk).
- Tripathy, N.K., Mishra, R.K., Anandkumar, A. and Sahu, G.P., 1994. Lack of genotoxicity of saccharin studied in the *Drosophila* wing spot and sex-linked recessive lethal tests. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 10, 89-98.
- Uysal, H., Altun, D., Aşkın, H. and Aslan, A. The Effects of Water Extract of *Usnea longissima* Ach. on Some Development Stages in *Drosophila melanogaster*. *Fresenius Environmental Bulletin*, (*in press*).
- Ünsal, Ç. ve Sarıyar, G., 2008. Antiaging için fitoöstrojenler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medicinal Science*, 28(Suppl), 160-165.

- Van Cauwenberge, A. and Alexandre, H., 2000. Effect of genistein alone and in combination with okadaic acid on the cell cycle resumption of mouse oocytes. *International Journal of Developmental Biology*, 44, 409–420.
- Venitt, S. and H. Phillips, D., 1995. The importance of environmental mutagens in human carcinogenesis and germline mutation. In PHILLIPS, D. H. and S. VENITT, *Environmental Mutagenesis*, pp 1-20, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.
- Verma, R. J. and Nair, A., 2001. Vitamin E ameliorates aflatoxin-induced biochemical changes in the testis of mice. *Asian Journal of Andrology*, 3, 305-309.
- Virgilio, A.L., Iwami, K., Watjen, W. Kahl, R. and Degen, G.H., 2004. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicology Letters*, 151, 151-162.
- Vogel, E.W., 1992. Tests for recombinogens in somatic *Drosophila*. *Mutation Research*, 284, 159-175.
- Werler, M.M., Hayes, C., Louik, C., Shapiro, S. and Mitchell, A.A., 1999. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *American Journal of Epidemiology*, 150 (7), 675–682.
- Whitten, P.L. and Naftolin, F., 1992. Effects of a phytoestrogen diet on estrogen-dependent reproductive processes in immature female rats. *Steroids*, 57, 56-61.
- Whitten, P.L., Lewis, C. and Naftolin, F., 1993. A phytoestrogen diet induces the premature anovulatory syndrome in lactationally exposed female rats. *Steroids*, 49, 1117-1121.
- WHO, 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Technical Report Series 4, 368-381.
- Wu, X., Liang, Z., Zou, T. and Wang, X., 2008. Effects of folic acid deficiency and *MTHFR* C677T polymorphisms on cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (in press) doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.130
- Würgler, F.E. and Vogel, E.W. 1986, In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In chemical mutagens, Principle and methods for their detection. Würgler, F.E. and Vogel, E.W. (Editors), Vol. 10, Plenum Press, pp 1-73. New York.
- Yeşilada, E., Özmen, M. and Yeşilada, Ö., 1999. Studies on the toxic and genotoxic effect of olive oil mill wastewater. *Fresenius Environmental Bulletin*, 8, 732-739.
- Yeşilada, E., 2001. Genotoxicity Testing of some Metals in the *Drosophila* Wing Somatic Mutation and Recombination Test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66, 464-469.
- Yuan, J.M., Wang, Q.S., Ross, R.K., Henderson, B.E. and Yu, M.C., 1995. Diet and breast cancer in Shanghai and Tianjin, China. *British Journal of Cancer*, 71 (6), 1353-1358.
- Zordan, M., Osti, M., Pesce, M. and Costa, R., 1994. Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 322, 111-116.
- www.biltek.tubitak.gov.tr

EK-1

Standart *Drosophila* besiyeri (SDB)'nin hazırlanışı

Gereken Malzemeler: 9 g agar, 60 g toz şeker, 19 g bira mayası, 50 g mısır unu, 565 cc saf su ve 3-3,5 cc propionik asit. 440 cc saf su temiz bir beherde kaynatılır. Kaynamaya başlayan saf suya önce 9 g agar, daha sonra 60 g şeker ilave edilip bir cam baget yardımıyla iyice karıştırılır. Bir başka beher içinde 125 cc saf suda 50 g mısır unu ve 19 g bira mayası ezilir. Karıştırılarak ezilen bu karışım kaynayan şeker-agar karışımına ilave edilerek karıştırmaya devam edilir. Karışım kaynamaya başladıktan sonra karıştırma işlemine 15 dk daha kısık ateşte devam edilmelidir. Bu safhada karışımın kıvamına dikkat etmek gerekir. Eğer karışım çok sıvı olursa besi ortamı soğuduğu zaman çok katılaşmayacak ve sinekler besi ortamına yapışacaktır. Karışım çok katılaşırse hem şişelere doldurmak hem de sineklerin beslenmesi güçleşecektir. Bu durumlar göz önüne alınarak hazırlanan besi ortamı ateşten indirilir. Karışım biraz soğuduktan sonra 3-3,5 cc propionik asit (küf indikatörü olarak kullanılır) ilave edilip hazırlanan besi ortamı daha fazla soğumadan temiz ve steril cam şişelere eşit miktarda (yaklaşık iki parmak yüksekliğinde) dökülür. Besi ortamının kültür şişelerinin ağzına ve kenarlarına bulaşmayacak şekilde konulmasına dikkat edilmelidir. Şişelerin ağzına bir filtre kâğıdı kapatılarak bir gün oda sıcaklığında bekletilir. Kontaminasyonu engellemek için şişelerin ağızlarının açılmamasına ve şişenin kenarında birikecek su buharının tümüyle çekilmiş olmasına dikkat etmek gerekir). Ertesi gün etrafı tülbentle sarılmış olan steril pamuk tıkaçlar ile kültür şişelerinin ağızları kapatılarak buzdolabında saklanır.

EK-2**Faure solüsyonunun hazırlanışı**

Faure solüsyonunun içeriği aşağıdaki gibidir.

Gam arabik : 30 g

Gliserol : 20 ml

Kloral hidrat : 50 g

Distile su : 50 ml

200 ml bir beher manyetik karıştırıcı üzerine konur. Hafif ısıtarak beherin içerisine 15 ml gliserol ilave edilir. Manyetik bar döndürme işlemine devam ederken üzerine yavaş yavaş gam arabik ilave edilir. Bir miktar gam arabik ilavesinden sonra, kalan 5 ml gliserol karışımın üzerine boşaltılır ve gam arabik ilavesine devam edilir. İlave işlemi çok yavaş gerçekleştirilmelidir. Karışım katılaşmaya başladıkça üzerine bu kez yavaş yavaş distile su katılır. Bu işlem distile su 10 ml kalıncaya kadar sürdürülür. Bu arada gam arabik bitecektir. Gam arabik bittikten sonra kloral hidrat karışıma katılmaya başlar. Katılaşma oldukça kalan 10 ml distile su tekrar ortama katılır. Tüm malzeme bittiğinde tüm çözünmelerin olabilmesi için manyetik karıştırıcı birkaç dakika daha çalıştırılır. Son olarak, süzme kâğıdı ile süzme yapılır. Bir gün süreyle süzme işlemi devam eder. Bir gün sonunda süzülmeyen solüsyon tekrar bir kaba boşaltılır ve manyetik karıştırıcıda ısıtılarak tekrar süzme işlemi gerçekleştirilir.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Çorum’da doğdu. İlkokulu İstanbul, orta öğrenimini Kahramanmaraş, lise öğrenimini ise Kayseri Lisesi’nde tamamladı. 1995 yılında Erciyes Üniversitesi Halil Bayraktar Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Biyomedikal Cihaz Teknoloji Bölümü’ne girdi ve bu bölümden 1997 yılında mezun oldu. 1997 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2001 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Yüksek lisans öğrenimine başladı. Ocak 2003’te Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. 2001-2005 yılları arasında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Zooloji Bilim Dalında Yüksek Lisansını tamamladı. Halen Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.