

***Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia*'dan Elde Edilen Apigenin-7-O- glukozit ve Apigenin-7-O-rutinozit'in Genotoksik Potansiyelleri**

Selçuk ÇEKER¹, Furkan ORHAN², Medine GÜLLÜCE³, Güleray AĞAR³

¹ Eczacılık Fakültesi Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Ağrı, Türkiye

² Meslek Yüksekokulu Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Ağrı, Türkiye

³ Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Atatürk Üniversitesi

✉: selcukceker06@gmail.com

Geliş (Received):20.02.2017

Düzeltilme (Revision):13.05.2017

Kabul (Accepted): 25.05.2017

ÖZ

Bitkilerden elde edilen, özellikle fenolik yapıdaki kimyasal maddeler, antioksidan özellikleri sayesinde reaktif oksijen türlerini inaktive ederek oksidatif hasarın önlenmesinde ve giderilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Buna karşın günümüzde, bitkisel ürünlerin çoğunun yapıları ve biyolojik etkinlikleri yeterince aydınlatılmamış olup, birçok bitkisel antioksidan maddenin toksisitesi ve insan sağlığına olan zararlarıyla ilgili çalışmalar yeterli değildir. Bu çalışma, *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden izole edilen iki fenolik bileşik olan Apigenin-7-O-glikozit (A7G) ile Apigenin-7-O-rutinozit (A7R)'in genotoksik ve anti-genotoksik etkilerinin belirlenmesi üzerine tasarlanmıştır. İki fenolik bileşiğin, insan lenfosit hücrelerinde aflatoxin B₁'e (AFB₁) karşı genotoksik ve anti-genotoksik etkileri kardeş kromatid değişimi testi ile araştırılmıştır. Çalışma sonuçları A7G ve A7R'nin güçlü anti-genotoksik özelliklerinin olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Mentha longifolia*, Apigenin-7-O-glikozit, Apigenin-7-O-rutinozit, Aflatoxin B₁, Kardeş Kromatid Değişimi

Genotoxic potentials of apigenin-7-O-glucoside and apigenin-7-O-rutinoside isolated from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *Longifolia*

ABSTRACT

Particularly the chemicals in phenolic structure obtained from plants play an important role in preventing and eliminating the oxidative damage by inactivating the reactive oxygen species due to their antioxidant properties. However, today the structures of the most herbal products and their biological activities have not been illuminated adequately; studies on the toxicity of the many herbal antioxidants and damage to human health are also not investigated properly. This study was designed to evaluate the genotoxic and anti- genotoxic effects of two phenolic compounds, Apigenin 7-O-glucoside (A7G) and Apigenin 7-O-rutinoside (A7R) which are isolated from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *longifolia*. The genotoxic and anti- genotoxic effects of two compounds in human lymphocytes cells were investigated by sister chromatid exchanges (SCEs) test system against aflatoxin B₁ (AFB₁). The results showed that A7G and A7R have strong anti-genotoxic properties.

Keywords: *Mentha longifolia*, Apigenin 7-O-glucoside, Apigenin 7-O-rutinoside, Aflatoxin B₁, Sister Chromatid Exchanges

GİRİŞ

Bütün bitkiler metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak, bitkileri bazı zararlılara karşı korumada görevleri olduğu düşünülen, çok sayıda fenolik madde oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, bitkisel kökenli bütün gıdalarda daima farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır [1]. Fenolik bileşikler bitkilerde yaygın bulunan maddeler olup, günümüzde çok sayıda fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır. Bunlara sürekli yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir [2]. Fenolik bileşiklerin birçoğunun en

önemli özelliklerinin antioksidan etkileri olduğu bildirilmiştir. Antioksidan aktivite esas olarak metal şelatlama, tekli oksijen giderme, hidrojen verici ve indirgeyici ajan olarak davranmalarını sağlayan redoks özelliklerinden kaynaklanır. Ayrıca fenollerin ROS (radikal oksijen süpürücü) özelliği, fenolik molekülün aromatik halkası üzerindeki hidrojen verici hidroksil grupların pozisyonuna ve sayısına, fenolik hidrojenlerin mevcudiyetine ve hidrojen vererek oluşan fenoksi radikallerinin kararlı hale geçebilmesine bağlıdır. Fenolik bileşiklerin yapılarında bulunan -OH sayısı arttıkça antioksidan etkileri de artmaktadır [3].

Diğer taraftan fenolik bileşiklerin, bakteri ve memeli sistemlerinde mutajen ve genotoksik özellik gösterdiği belirlenmiştir [4]. Fenolik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda DNA delesyonlarını teşvik ettikleri ve enzim aktivitelerini inhibe ettikleri bildirilmiştir [5]. Yapılan araştırmalarda, fenolik bileşiklerin biyolojik ve farmakolojik etkilerinin, antioksidan ve prooksidan davranışlarına bağlı olduğu bildirilmiştir [6,7]. Örneğin, fenolik bileşikler serbest radikallere karşı antioksidan olarak davranırlar ama bir geçiş metali varlığında prooksidan aktivite gösterirler. Bir fenolik bileşik olan Kuersetin'in prooksidan etki göstererek DNA'ya zarar veren serbest radikal oluşumunu teşvik ettiği gözlenmiştir [4]. Ayrıca, replikasyon sürecinde DNA'nın birbiri üstüne dönerek gerginliğinin artmasını önleyen topoizomeraz enzimlerini de inhibe ettiği ifade edilmiştir [4]. Bundan dolayı, bazı araştırmacılar biyolojik moleküllerde fenolik antioksidanların, prooksidan etkilerinin mutlaka göz önüne alınması gerektiğini bildirmektedirler [6,8].

Fenolik bileşiklerin belirtilen pek çok olumlu özelliklerine rağmen, bilinçsizce ve aşırı tüketilmesi insan sağlığı için tehlike oluşturabilmektedir. Buradan hareketle çalışmamızda; hem prooksidan hem de antioksidan özellik sergileyebilmeleri, apoptotik ve antiapoptik aktiviteye sahip olabilmeleri, antimutajen özelliklerinin yanı sıra mutajen madde varlığında mutajen madde ile sinerjistik etki göstererek mutajeniteyi artırabilmelerinden dolayı tartışma konusu olan fenolik bileşiklerden Apigenin'in türevlerinden; *Apigenin-7-O-glikozit* ile *Apigenin-7-O-rutinozit*'in, genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, *Apigenin-7-O-glikozit* (A7G) ile *Apigenin-7-O-rutinozit* (A7R)'in, *invitro* olarak insan lenfosit hücrelerinde aflatoxin B₁ (AFB₁)'e karşı anti-genotoksik etkisi, kardeş kromatid değişimi (KKD) yöntemi ile araştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

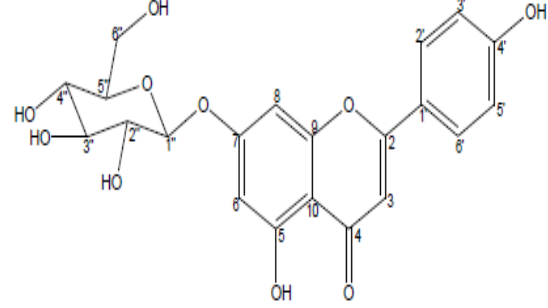
Bitkilerin toplanması ve adlandırılması

Mentha longifolia L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisi Palandöken-Erzurum (1400 m) bölgesinden, 2007 yılı Temmuz-Ağustos aylarında, bitkilerin çiçeklenme dönemlerinde toplanmıştır. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* türünün tanılanması Davis (1988) [9] "in "Flora of Turkey and The Aegean Islan" adlı eserinden yararlanılarak Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi-Biyoloji Bölümü) tarafından yapılmıştır. Tanılanan bitkiye ait bu örnek Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda (ATA HERB 9732) mevcuttur.

Genotoksik potansiyeli araştırılan etken maddeler

Çalışmamızda genotoksik potansiyelleri araştırılan etken maddeler *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden, Atatürk üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı tarafından izole edilip tarafımıza sağlanmıştır. *Mentha longifolia* L.

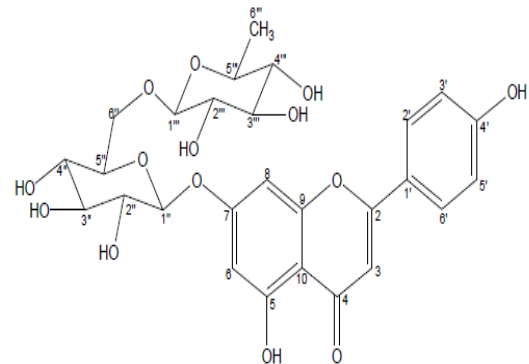
Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden izole edilen bileşiklerin moleküler ağırlıkları, açık ve kimyasal formülleri Şekil 1 ve Şekil 2'de belirtilmiştir.



Apigenin-7-O-glikozit - C₂₁H₂₀O₁₀, M.A: 432

Şekil1. A7G 'nin kimyasal formülü ve açık yapısı [10]

İkinci adımda göz bebeğinin merkez noktası bulunur. Denklem (1) yardımıyla, bu merkez kullanılarak, R+(n*r) şeklinde artan yarıçaplarda çemberler belirlenir. Burada R gözbebeğinin yarıçapı, n=1,2,.. şeklinde artan bir tam sayı, r ise çemberler arasındaki uzaklığı tanımlayan bir sabittir. En içte bulunan çemberden sıralı şekilde alınan pikseller bir dizi halinde sıralanır. Ardından, bir sonraki çemberdeki pikseller bir önceki çemberden elde edilen dizinin devamına eklenir. Bu şekilde irisün tamamındaki dairesel pikseller tek-boyutlu bir dizi olarak elde edilir (Şekil.2). İkinci adımda göz bebeğinin merkez noktası bulunur. Denklem (1) yardımıyla, bu merkez kullanılarak, R+(n*r) şeklinde artan yarıçaplarda çemberler belirlenir. Burada R gözbebeğinin yarıçapı, n=1,2,.. şeklinde artan bir tam sayı, r ise çemberler arasındaki uzaklığı tanımlayan bir sabittir. En içte bulunan çemberden sıralı şekilde alınan pikseller bir dizi halinde sıralanır. Ardından, bir sonraki çemberdeki pikseller bir önceki çemberden elde edilen dizinin devamına eklenir. Bu şekilde irisün tamamındaki dairesel pikseller tek-boyutlu bir dizi olarak elde edilir (Şekil.2).



Apigenin-7-O-rutinozit - C₂₇H₃₀O₁₄, M.A:578

Şekil2. A7R 'nin kimyasal formülü ve açık yapısı [10]

Kardeş kromatid değişimi testi (KKD)

Genotoksisite testleri arasında en sık kullanılanlardan biri olan KKD, replikasyon esnasında bir metafaz kromozomunda kromozom morfolojisini değiştirmeden kardeş kromatidler arasında değişimi ifade etmektedir. KKD testi hızlı ve güvenilir olmasının yanında duyarlı ve basit bir testtir. KKD genetik hasarlar hakkında bilgi verebilen ve sitogenetik çalışmalarında da oldukça yaygın bir kullanıma sahip olan hassas bir testtir [11]. Bu çalışmada 25 - 30 yaş aralıklarında, sigara kullanmayan ve son 6 ay içerisinde her hangi bir nedenle antibiyotik almayan, X-Ray uygulanmayan, akut veya kronik bir rahatsızlıklarının olmadığı sözlü beyanları ile kabul edilen 2 erkek ve 2 kadından oluşan gönüllü olarak deneye katılmak isteyen toplam 4 donör seçildi. Donörlerden deneye başlanacağı saatte 5'er ml kan alındı.

Deney düzeneğinin oluşturulması

Karyotip medyum periferik besiyerine (100 ml); fetal sığır serumu (10 ml), fitohemaglutinin (2 ml), L-glutamin (2 ml) ile penisilin + streptomisin (1 ml) eklenmesiyle hazırlanan besiyerinden, herbir deney tüpüne 6'şar ml konuldu. Ayrıca her bir tüpe kan (0,5 ml) ve son konsantrasyonu 10^{-4} M olacak şekilde bromodeoxyuridine (BrdU) eklendi. Daha sonra aşağıda belirtilen kimyasallar, belirlenen oranlarda steril (filtre) edilerek eklendi. Bu deney düzeneği toplam 4 donör için tekrarlandı.

Kültür 1: Besi yeri + BrDU + Kan

Kültür 2: Besi yeri + BrDU + 5 µM AFB₁ + Kan

Kültür 3: Besi yeri + BrDU + 10 µg/mL A7G/A7R + Kan

Kültür 4: Besi yeri + BrDU + 5 µM AFB₁ + 5 µg/mL A7G/A7R + Kan

Kültür 5: Besi yeri + BrDU + 5 µM AFB₁ + 10 µg/mL A7G/A7R + Kan

Kültür 6: Besi yeri + BrDU + 5 µM AFB₁ + 20 µg/mL A7G/A7R + Kan

Kültür 7: Besi yeri + BrDU + 5 µM AFB₁ + 40 µg/mL A7G/A7R + Kan

Kültür 8: Besi yeri + BrDU + 5 µM AFB₁ + 80 µg/mL A7G/A7R + Kan

Lenfosit kültürü

Hazırlanan hücre kültür tüpleri 72 saat 37°C'de kapalı hücre kültürüne alındı. Kültür tüpleri alüminyum folya ile sarılarak karanlık ortam sağlandı. Kültürün 69. saatinde her bir kültür tüpüne 5 damla kolşisin solüsyonu eklendi. 72. saatte kültüre edilen tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Pellet üzerine hipotonik solüsyonu (0,075 M KCl) eklendi ve tüpler 25 dakika 37°C'lik etüvde bekletildi. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1:3 oranında soğuk asetik asit metanol karışımı eklenerek tespit işlemi

gerçekleştirildi. Tespit işlemi toplam üç kez tekrarlandı. Tespit işlemi sonunda süpernatantın 1-1,5 mL'lik alt kısmı hariç diğer bölümü atıldı. Dipte kalan pellet çalkalanarak tekrar süspansiyon edilmeden sonra soğuk tespit içinde bekleyen lamaların her birine 5-6 damla bu süspansiyondan damlatılarak 5 lam hazırlandı. Hazırlanan preparatlar üç gün oda sıcaklığında bekletilerek yaşlandırıldı. Bu süre sonunda her bir preparat floresan plus giemsa tekniği ile boyandı [12].

Floresan plus giemsa tekniği ile boyama

Üç gün oda ısısında kurutulan preparatlar 100 mL PBS tampon çözeltisi bulunan alüminyum folyoya sarılı temiz bir şalede 5 dakika oda ısısında bekletildi. Süre sonunda şaleden çıkarılan preparatlar 0,5 µg/mL konsantrasyondaki stok Hoechst 33258 solüsyonundan 1/100 oranında PBS tampon çözeltisi içerisinde hazırlanarak bu solüsyonda 10 dakika karanlık ortamda bekletildi. 1-2 saniye PBS'te yıkanan preparatlar bir kaba horizontal olarak dizilip üzerlerine lamel kapatıldı. Hazırlanan preparatlar 13 cm yükseklikte bulunan UV lambasının altında 25 dakika bekletildi. Preparatlardan lameller kaldırılarak 65°C'deki 2XSSC solüsyonu içinde 15 dakika bekletildi. 2XSSC solüsyonundan çıkartılan preparatlar distile su ile yıkandı. Preparatlar 5 dakika giemsa boyasında tutularak boyandı ve incelemeye alındı. [13].

KKD sayımı

Her bir donör için en az 60 metafaz mikroskopta (Olympus BX50 100x büyütmede) değerlendirildi. Her kromozomda koyu boyalı KKD bölgelerinin bir kromatitten diğerine atladığı bölgeler bir adet değişim olarak kabul edildi. Aynı kromozom üzerinde 1 den fazla geçiş görüldüğü durumlarda bunların her biri ayrı ayrı sayıldı. Sentromerden geçiş gösteren bölgeler değerlendirmeye alınmadı. Planlanan deney düzeneğine uygun olarak her bir donörden alınan kan örnekleri ve uygulanan kimyasalların farklı konsantrasyonları için ayrı ayrı olmak üzere ortalama KKD sıklığı belirlendi.

İstatistiksel değerlendirme

Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi Duncan testi kullanılarak hesaplandı. Apigenin türevi etken maddelerin ve AFB₁'in KKD test sisteminde etkilerini belirlemek için SPSS 18,0 analiz programında varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Apigenin türevi etken maddelerin konsantrasyonları arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %5 önem seviyesinde belirlendi.

BULGULAR

Kültür ortamlarına sadece AFB₁ verildiğinde KKD frekansı 8.46 ± 0.14 olarak gözlemlenmiş olup bu değer kontrol ile kıyaslandığında AFB₁'in KKD'yi indüklediği belirlenmiştir. AFB₁ ile birlikte A7G'nin farklı konsantrasyonları (5, 10, 20, 40 ve 80 µg/mL) verildiğinde A7G'nin 5, 10 ve 20 µg/mL

uygulamalarının AFB₁'in KKD'yi artırıcı etkisini engellediği gözlemlenmiştir. AFB₁'in KKD'yi artırıcı etkisini engellemesi açısından dozlar arasında kıyaslama yapıldığında, A7G'nin 20 µg/mL'lik dozunun en etkili sonucu verdiği görülmüştür. Bununla birlikte A7G'nin 40 ve 80 µg/mL'lik yüksek konsantrasyonları AFB₁ mutajen maddesinin etkisini artırmıştır (Tablo 1). AFB₁'in artırdığı KKD frekanslarında A7R'nin 5, 10, 20 ve 40 µg/mL'lik konsantrasyonları anti-genotoksik

özellik göstermiş ve sırasıyla 8.12 ± 0.25, 7.73 ± 0.16, 7.64 ± 0.35 ve 7.08 ± 0.49 sonuçlar elde edilmiştir. A7R'nin 40 µg/mL dozlarındaki uygulamalarında AFB₁'in KKD frekansını artırıcı etkisini engellemesi açısından diğer dozlardan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, A7R'nin 80 µg/mL'lik konsantrasyonunun ise AFB₁'in genotoksik etkisini artırdığı gözlemlenmiştir. (Tablo 1).

Tablo 1. A7G, A7R ve AFB₁ uygulandığında belirlenen KKD frekansları

Sıra No	Uygulama Grupları	Konsantrasyonlar	Metafaz	KKD Aralığı	KKD/Hücre ± S.hata
1.	Kontrol		80	2-7	5.62 ± 0.32 ^a
2.	AFB ₁	5 µM	80	5-14	8.46 ± 0.14 ^e
3.	A7G	10 µg/mL	80	2-8	5.78 ± 0.28 ^a
4.	AFB ₁ + A7G	5 µM + 5 µg/mL	80	3-11	8.34 ± 0.09 ^{de}
5.	AFB ₁ + A7G	5 µM + 10 µg/mL	80	3-12	7.90 ± 0.19 ^d
6.	AFB ₁ + A7G	5 µM + 20 µg/mL	80	5-13	6.70 ± 0.41 ^b
7.	AFB ₁ + A7G	5 µM + 40 µg/mL	80	5-13	8.54 ± 0.52 ^e
8.	AFB ₁ + A7G	5 µM + 80 µg/mL	80	6-14	8.68 ± 0.18 ^e
1.	Kontrol		80	2-7	5.62 ± 0.32 ^a
2.	AFB ₁	5 µM	80	5-14	8.46 ± 0.14 ^e
3.	A7R	10 µg/mL	80	2-7	5.69 ± 0.03 ^a
4.	AFB ₁ + A7R	5 µM + 5 µg/mL	80	4-11	8.12 ± 0.25 ^d
5.	AFB ₁ + A7R	5 µM + 10 µg/mL	80	4-11	7.73 ± 0.16 ^{cd}
6.	AFB ₁ + A7R	5 µM + 20 µg/mL	80	5-12	7.64 ± 0.35 ^c
7.	AFB ₁ + A7R	5 µM + 40 µg/mL	80	3-13	7.08 ± 0.49 ^{bc}
8.	AFB ₁ + A7R	5 µM + 80 µg/mL	80	4-13	8.84 ± 0.74 ^b

*Farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Hastalıkların tedavisinde ilaç olarak bitkilerin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir [14]. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı sentetik ilaçların hızlı gelişimine rağmen önemini hala korumaktadır. Doğal kaynaklı ilaçların kullanım oranı gelişmiş ülkelerde %60, gelişmekte olan ülkelerde ise %4 civarındadır [15]. Halk arasında bu kadar fazla kullanılmalarıyla bilim dünyasının da dikkatini çeken bitkisel ilaçların; kanser dâhil çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir [16]. Buna bağlı olarak günümüz antikanser ilaçlarının %60'ından fazlası ve bulaşıcı hastalıklarda kullanılan ilaçların %75'i direk veya dolaylı olarak doğal kaynaklardan üretilmektedir [16]. Diğer taraftan Ülkemizin florasında 9000'in üzerinde bitki türü olduğu ve bu bitkilerin yaklaşık 1000 tanesinin ilaç ve baharat bitkileri olduğu belirtilmiştir [15]. Bu bitkilerin etkinliklerinin araştırılması; hem ülkemiz ekonomisi hem de halk arasındaki kullanımlarının güvenilirliğinin değerlendirilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Flavonoidlerin flavon alt grubunda yer alan Apigenin (AP); maydanoz, papatya, kereviz portakal, çay gibi gündelik olarak tükettiğimiz fazla sayıda meyve ve

sebze de bulunur [17]. AP'ı içeren besinlerin alınmasından sonra AP'nin farklı dokulara dağıldığı ve yararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir [18]. İnsan lenfosit hücreleri [19] ve fare kemik iliği hücreleriyle yapılan çalışmalarda AP, anti-kanser ilaçlara karşı anti-genotoksik etki göstermiştir [20]. Ayrıca fareler üzerinde yapılan başka bir deneyde ise oksidatif stres sonucunda aort endotelinde meydana gelen gevsemeye karşı AP'nin koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir [21]. AP'nin etinil estradiolün indüklediği kromozom anormalileri ve KKD oranlarını önemli bir şekilde azalttığı gösterilmiştir [22]. Sharma [23] insan lenfosit hücrelerinde mitomisin C tarafından artırılan KKD ve Mikroçerdek (MÇ) frekanslarının AP tarafından düşürüldüğünü ve AP'nin hücreleri mitomisin C'nin genotoksik etkilerine karşı koruduğunu bildirmiştir. Ali et al. [24] çalışmalarında AP'nin karaciğerde ROS'ları temizleme özelliği ile lipid peroksidasyonunu azalttığını belirterek AP'nin anti-genotoksik ve hepatoprotektif madde olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, AP'nin anti-oksidan, anti-mutajenik, anti-karsinojenik, anti-viral, anti-enflamatuar, anti-proliferatif ve anti-progresyon özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir [25-28]. Bununla birlikte; Rithidech et al. [29]. AP'nin, insan lenfosit

hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarının genotoksik olmadığını ancak kontrol grubuna oranla MÇ frekanslarında artışa neden olduğunu bildirmiştir. Diğer bir çalışmada AP'in Çin hamsteri V79 hücrelerinde 100 µM'lık uygulamalarının klastojenik etki sergilediği ve AP'in, klastojenik etkisinin DNA'ya interkalasyon yapabilme özelliğinden kaynaklandığı rapor edilmiştir [30]. Literatürde çoğu ökaryotik ve prokaryotik sistemde birçok flavonoidin genetik hasarı indüklediği [31] ve flavonoidlerin tüketim seviyelerine bağlı olarak pro-apoptotik aktivite sergileyebilecekleri bildirilmiştir [32].

Bu çalışmada, *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia* bitkisinden izole ettiğimiz Apigenin türevi etken maddelerimizin, A7G ve A7R, genotoksik potansiyelleri araştırılmıştır.

A7G'yi de içeren *Scutellaria pinnatifida* bitki ekstresinin serbest radikalleri süpürme ve insektisidal etkilerinin olduğu rapor edilmiştir [33]. A7G'yi içeren yabani zeytin ağacı yaprakları ile yapılan bir çalışmada bu bitki ekstresinin antioksidan ve sitotoksik etkisi gösterilmiştir [34]. Benzer şekilde *Thymus praecox subsp grossheimii* ekstresinin sitotoksik ve antiproliferatör aktiviteleri gösterilmiştir [35]. Ames ve Maya delesyon testi (Yeast Del assay) kullanılarak yapılan mutajenite ve antimutajenite testlerinde A7G'nin mutajen etki göstermediği, buna karşın söz konusu test sistemlerinde kullanılan mutajen ajanlara antimutajen etki gösterdiği rapor edilmiştir [36].

Elde ettiğimiz bulgulara göre sadece A7G verilen kültür ortamlarında ve AFB₁ ile birlikte muamele edilen A7G'nin 5, 10 ve 20 µg/mL'lik dozlarında herhangi bir genotoksik etki görülmemiştir. A7G, AFB₁'in neden olduğu genotoksisiteyi engelleyerek anti-genotoksik özellik sergilemiştir (Tablo 1). Bununla birlikte, A7G'nin 40 ve 80 µg/mL'lik dozlarının AFB₁'in neden olduğu genotoksisiteyi engellemeyip artırdığı gözlenmiştir (Tablo 1).

A7R'yi de içeren *Dracocephalum heterophyllum* bitki özütünün anti-hepatit, antioksidan, anti-lipidperoksidasyon ve apoptozis engelleme etkisi gösterilmiştir [37]. Ayrıca A7R'nin Yeast Del assay ve *E. coli* WP2 test sistemleri ile yapılan çalışmada mutajen olmadığı, akridin, etil metan sülfonat ve 4-nitrokuinolin 1-oksit gibi mutajenik ajanların etkisini engellediği rapor edilmiştir [38, 39]. A7R ile yaptığımız bu çalışmada da, AFB₁ kaynaklı genotoksisitenin A7R'nin 5, 10, 20 ve 40 µg/mL'lik uygulamalarıyla önlendiği ancak A7R'nin 80 µg/mL' uygulamasının AFB₁'in etkinliğini artırarak genotoksik özellik sergilediği belirlenmiştir (Tablo 1).

Elde ettiğimiz sonuçlar A7G ile A7R ile ilgili yapılan az sayıdaki çalışmalarla [36,38] ve Apigenin ile ilgili yukarıda verilen çalışmalarla paralellik göstermektedir. Fenolik bileşiklerin aracı olduğu genotoksik ve anti-genotoksik etkiler birçok farklı mekanizmayla gerçekleşebilir. Bu mekanizmaları belirleyebilmek için fenolik bileşiklerin yapılarının iyi bilinmesi gerekir [32]. Yaptığımız çalışmada kullanılan etkenlerin yapıları bilinmekle beraber, bu yapıların sahip oldukları

fonksiyonel gruplar ve bu fonksiyonel grupların etki mekanizmasıyla ilgili elimizde mevcut bilgi bulunmamaktadır. Bu konuyla ilgili daha kapsamlı bilgi elde etmek etken maddelerin etki mekanizmasının aydınlatılmasında faydalı olacaktır. Bununla birlikte, elde ettiğimiz sonuçlar ve literatürde yapılan farklı çalışmalar dikkate alındığında fenolik bileşiklerin birçok hastalık için alternatif tedavi etmeni veya koruyucu ya da destek etmeni olarak kullanılabilmesi; fenolik bileşiklerin optimum konsantrasyon ve sürelerde kullanılmasıyla, kanser başta olmak üzere çeşitli birçok hastalığın tedavisinde başarılı sonuçlar alınabileceği ön görülmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Saldamlı İ. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 463-492, 2007.
- [2] Cemeroglu B. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, No: 35, 77- 88, 2004.
- [3] Nizamlioglu N.M, Nas S. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5(1), 20-35, 2010.
- [4] Moskaug J. Ø., Carlsen H., Myhrstad M., Blomhoff R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. Mechanisms of ageing and development, 125(4), 315-324, 2004.
- [5] Czczot H., Bilbin M. Effect of flavones and their metabolites on induction of SOS repair in the strain PQ37 -E. coli K-12, Acta Biochim. Pol, 38, 71-74, 1991.
- [6] Cao G., Sofic E., Prior R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure- activity relationships. Free Radical Biology and Medicine, 22(5), 749-760, 1997.
- [7] Moran J.F., Klucas R.V., Grayer R.J., Abian J., Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. Free Radical Biology and Medicine, 22(5), 861-70, 1997.
- [8] Yen G. C., Chen H. Y., Peng H. H. Antioxidant and Pro-oxidant effects of various tea extracts. J Agric Food Chem, 45, 30-34, 1997.
- [9] Davis P. H. Flora of Turkey and the East Aegean Islands 1-9, 1988.
- [10] Orhan F. *Mentha longifolia* L. Hudson ssp. *longifolia*'dan Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/Salmonella ve Maya Delesyon Test Sistemleri ile Mutajen ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2010.
- [11] Öztürk A. Meme kanserli olguların lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi sıklığı. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Antalya, 1995.
- [12] Ceker S., Agar G., Alpsoy L., Nardemir G., Kizil H. E. Antagonistic effects of Satureja hortensis essential oil against AFB₁ on human lymphocytes in vitro. methods, 48, 65-71, 2014.
- [13] Perry P., Evans H. J. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature, 258, 121-125, 1975.

- [14] Ramawat K.G., Dass S., Mathur M. The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine*. Springer, Berlin, 7-32, 2009.
- [15] TKB (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı). *Aromatik ve Tıbbi Bitkiler*, 2008.
- [16] Georgiev M. I., Weber J., Maciuk A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 809-823, 2009.
- [17] Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev.* 8(16), 122-146, 2014.
- [18] Gradolatto A., Basly J. P., Berges R., Teyssier C., Chagnon M. C. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metab. Dispos.* 33, 49-54, 2005.
- [19] Siddique Y. H., Beg T., Afzal M. Antigenotoxic effect of apigenin against anti-cancerous drugs. *Toxicology in vitro*, 22, 625-631, 2008.
- [20] Siddique Y. H., Afzal M. Antigenotoxic effect of apigenin against mitomycin C induced genotoxic damage in mice bone marrow cell. *Food Chem Toxicol.* 47, 536-539, 2009.
- [21] Jin B. H., Qian L. B., Chen S., Li J., Wang. H. P. Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur J Pharmacol*, 616, 200-205, 2009.
- [22] Siddique Y. H., Ara G., Beg T., Afzal, M. Anticlastogenic effect of apigenin in human lymphocytes treated with ethinylestradiol. *Fitoterapia*, 81, 590-594, 2010.
- [23] Sharma N. K. Modulation of radiation-induced and mitomycin C-induced chromosome damage by apigenin in human lymphocytes in Vitro. *Journal of radiation research*, 54, 789-797, 2013.
- [24] Ali F., Naz F., Jyoti S., Siddique Y. H. Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 767, 13-20, 2014.
- [25] Shukla S., Gupta S., Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther.* 5, 843-852, 2006.
- [26] Li R. R., Pang L. L., Du Q., Shi Y., Dai W. J., Yin K. S. Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 32, 364-370, 2010.
- [27] Estruch R., Ros E., Salas-Salvadó J., Covas M. I., Corella D., Arós, F., Gomez- Gracia E., Ruiz-Gutiérrez V., Lamuela-Raventos R. M. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine*, 368, 1279-1290, 2013.
- [28] Choi J. S., Islam M. N., Ali M. Y., Kim E. J., Kim Y. M., Jung H. A. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food Chem Toxicol.* 64, 27-33, 2014.
- [29] Rithidech K. N., Tungjai M., Whorton E. B. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585, 96-104, 2005.
- [30] Snyder R. D., Gillies P.J. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40, 266-276, 2002.
- [31] Stopper H., Schmitt E., Kobras K. Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutation Research*, 574, 139-155, 2005.
- [32] Noel S., Kasinathan M., Rath S. K. Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicology in Vitro*, 20, 1168-1172, 2006.
- [33] Delazar A., Nazemiyeh H., Afshar F.H., Barghi N., Esnaashari S., Asgharian P. Chemical compositions and biological activities of *Scutellaria pinnatifida* A. Hamilt aerial parts. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12, 187, 2017.
- [34] Makowska-Was J., Galanty A., Gdula-Argasinska J., Tyszka-Czochara M., Szewczyk A., Nunes R., Carvalho I. S., Michalik M., Pasko P. Identification of Predominant Phytochemical Compounds and Cytotoxic Activity of Wild Olive Leaves (*Olea europaea* L. ssp *sylvestris*) Harvested in South Portugal. *Chemistry Biodiversity*, 14, 3, e1600331, 2017.
- [35] Erenler R., Sen O., Yildiz I., Aydin A. Antiproliferative Activities of Chemical Constituents Isolated from *Thymus praecox* subsp *grossheimii* (Ronniger) Jasas. *Records of Natural Products*, 10, 766-770, 2016.
- [36] Gulluce M., Orhan F., Yanmis D., Arasoglu T., Guvenalp Z., Demirezer L. O. Isolation of a flavonoid, apigenin 7-O-glucoside, from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subspecies *longifolia* and its genotoxic potency. *Toxicology and industrial health*, 31, 831-840, 2015.
- [37] Shi Q. Q., Dang J., Wen H. X., Yuan X., Tao Y. D., Wang Q. L. Anti-hepatitis, antioxidant activities and bioactive compounds of *Dracocephalum heterophyllum* extracts. *Botanical Studies*, 57, 16, 2016.
- [38] Gulluce M., Orhan F., Adiguzel A., Bal T., Guvenalp Z., Demirezer L. O. Determination of antimutagenic properties of apigenin-7-O-rutinoside, a flavonoid isolated from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *longifolia* with yeast DEL assay. *Toxicology and Industrial Health*, 29, 534-540, 2013.