

EĞRELTİ OTU İLE BESLENEN İNEKLERDEN ELDE EDİLEN SÜTÜN MUTAJENİK AKTİVİTESİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Ersin İstanbulluoğlu* Taner Pamukçu** Mahir Pamukçu***

Studies on Mutagenic Activity of Milk from Cows Fed Bracken Fern

Summary: *Mutagenicity of the milk of brocken fern fed cows were determined by two different bacterial test systems using Salmonella typhimurium (TA98, TA100) and Bacillus subtilis (17A, 45T) strains.*

Four organic solvent extract fractions of milk were prepared from bracken fern or normal diet fed cows and tested for mutagenicity.

The chloroform-methanol fraction from bracken fern fed cows demonstrated mutagenic activity for both TA100 and 45T strains.

Özet: *Eğrelti otu ve normal yemle beslenmiş ineklerden elde edilen sütlerin mutajenik aktiviteleri Salmonella typhimurium (TA98, TA100) ve Bacillus subtilis (17A, 45T) suşlarından yararlanılarak iki farklı test sistemi ile incelendi.*

Süt örneklerinin çıkartımında dört farklı organik eritici kullanıldı. Eğrelti otu ile beslenen hayvanların sütlerinin kloroform-metanol çıkartımı hem TA100 hemde 45T için mutajenik bulundu.

Giriş

Mutajenik ve dolayısı ile karsinojenik karakterdeki kimyasal maddelerin (organik veya inorganik) tanımlanmasında veya taran-

* Doç.Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakteriyoloji ve Salgınlar Birimi, Ankara-Türkiye.

** Kimya Mühendisi, A.Ü. Veteriner Fakültesi, F.K.B. Birimi Araştırma Görevlisi, Ankara-Türkiye.

*** Prof.Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Patolojik Anatomi Birimi, Ankara-Türkiye.

masında çeşitli bakteriyel test sistemleri son yıllarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır (1, 5, 7, 11). Bu yöntemlerin basit ve ekonomik olması, kısa zamanda sonuç vermesi klasik yöntemlere (yedirme deneyleri gibi) tercih edilmelerinin başlıca nedenleridir. Bakteriyel mutajenite test sistemlerinin ilki 1971 yılında Ames ve ark. (1) tarafından geliştirilmiş olup yöntem, histidin ve biotin oksotrof olan çeşitli *Salmonella typhimurium* mutantlarının mutajenik maddeler tarafından prototrofik suşlar haline dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Ames ve arkadaşları daha sonraki yıllarda yaptıkları çalışmalarda düşük konsantrasyonlardaki mutajenik maddelere bile duyarlı olan *Sal. typhimurium* mutantları elde etmişlerdir (4). Ayrıca, besi yerlerine memeli karaciğer enzim sistemleri ilave edilerek kendileri değil de metabolizma ürünleri mutajenik olan maddeleri saptamak mümkün olmuştur (2, 4).

Sal. typhimurium mutantlarının yanı sıra tiriptofan oksotrof olan *E.coli* ve *Rec-Bacillus subtilis* suşlarında aynı amaç için çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (6, 7, 11).

Bakteriyel mutajenite test sistemleri ile gen yapısında kimyasal maddeler (organik ve inorganik) tarafından oluşturulabilen "*Base pair substitution*", "*Frame shift*", "*Insertion ve deletion*", tipi mutasyonlar kolaylıkla saptanabilir (5).

Eğrelti otu (*Bracken fern*, *Pteridium aquilinum*) ülkemizin bilhassa Karadeniz bölgesinde yaygın olarak bulunan bir bitki türü olup hayvanlar için karsinojenik aktiviteye sahip olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından açıklanmıştır (12, 14). Pamukçu ve ark. (13) eğrelti otu ile beslenen ineklerden elde edilen sütlerin karsinojenik ve mutajenik maddeler taşıdıklarını deneysel çalışmalarla ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmanın amacı, eğrelti otu ile beslenmiş ineklerden elde edilen sütlerin mutajenik aktivitelerini iki farklı bakteriyel test sistemi ile incelemektir.

Materyal ve Metod

Bakteri suşları: *Sal. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları Dr. M.Pamukçu (Wisconsin, U.S.A.) ve *B.subtilis* 17A ve 45T suşları Dr. Kada (Mishima, Japonya)'dan sağlandı. *Salmonella* suşları %1 maya çıkartımı içeren nutrient broth (Difco, U.S.A.) besi yerinde üretildikten sonra 0.8 ml.miktarında ağzı vida kapaklı steril şişelere dağıtıldı;

ve üzerlerine 0.07 ml. Dimethylsulfoxide (Aldrich Chemical, U.S.A.) ilave edilerek kullanılıncaya kadar -70°C de muhafaza edildi. B. subtilis suşları içeriğinde %1 et çıkartımı (Difco, U.S.A.), %1 neopepton (Difco, U.S.A.) ve % 0.5 tuz bulunan sıvı besi yerinde üretildikten sonra 3 ml. miktarında içinde 1 ml. % 50'lik gliserin bulunan steril vida kapaklı şişcelere dağıtılarak kullanılıncaya kadar -70°C de saklandı.

Test ortamları: Sal.typhimurium TA98 ve TA100 suşları için test ortamları Ames ve ark. (4) göre hazırlandı. B.subtilis suşları için test ortamları ise Kaada (10) tarafından bildirilen yöntemle göre hazırlandı.

Mutajenite testleri: TA98 ve TA100 Sal. typhimurium suşları Ames ve ark. (4) bildirdiği yöntemle göre mutajenite testlerine tâbi tutuldu. Üst katmanında TA98 ve TA100 suşlarını içeren çift katmanlı agar plaklarına süt çıkartım örnekleri otomatik pipet yardımı ile damlatma (50 mikro.l. miktarında) şeklinde uygulandı. İnoküle edilen petri kutuları 37°C de 36 saat etüvde bırakıldı. Negatif kontrol olarak eğrelti otu yedirilmemiş hayvanların sütlerinden elde edilen çıkartımlar kullanıldı. Pozitif test kontrol olarakta % 0.1 lik 2-(2-Furyl)-3-(5-Nitro-2-Furyl) Acrylamide emdirilmiş kâğıt disklerden yararlanıldı. İnkübasyon süresinin sonunda gerek test, gerekse kontrol plaklarında oluşan his⁺ revertant kolonilerin sayıları ayrı ayrı sayılarak belirlendi. Kontrollere oranla 2 kat veya daha fazla his⁺ koloni oluşumuna neden olan çıkartımlar mutajenik olarak kabul edildi.

Rec Assay testlerinde, Rec⁺ ve Rec⁻ B.subtilis suşlarınının 24 saatlik buyyon kültürlerinden steril iğne uçlu özeler yardımı ile agar plakları üzerine aralarında 45 derecelik bir açı oluşacak şekilde (kesişen uçlar birbirine değmeyecek şekilde) ayrı ayrı ekimler yapıldı. İki farklı suşun oluşturduğu açı köşesine süt çıkartım örneklerinin emdirildiği (50 mikro.l. miktarında) kâğıt diskler (6 mm. çapında) ayrı ayrı yerleştirildi. Tüm agar plakları $+4^{\circ}\text{C}$ de 6 saat bekletildikten sonra 37°C de 12-18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda teşekkül eden inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirildi. Rec Assay testlerinde kontrol olarak yine % 0.1 lik 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-Furyl) Acrylamide kullanıldı (8, 9, 10).

Süt çıkartımlarınının hazırlanması: Gerek eğrelti otu gerekse normal yemle beslenmiş ineklerden elde edilen sütler liyofilize edilerek (Virtis, Uni-trap Model 10-100) süt tozu haline getirildi. Her örnekten 200

g. 500 ml. steril distile su içinde 37°C de 10 dakika devamlı karıştırılarak eritildi. Elde edilen sıvıya 1.5 l. metanol (Merck) ilave edilerek iyice karıştırıldıktan sonra, karışım 1500 dev./dak 15 dakika santrifüj edildi. Her örneğin santrifüj çöktürmeleri (üst sıvıları atıldıktan sonra) ayrı ayrı 500 ml. lik balonlara toplanıp metanol ile iki defa yıkandı. İkinci yıkamadan sonra çözelti kaba filtre kâğıdından süzülerek partikül kısmı ayrıldı. Elde edilen süzüntü sıvısı birinci metanol çıkartım sıvısı ile birleştirilerek 400 ml. miktarına düşünceye kadar düşük basınç altında evapore edildi. Konsantre sıvı pentan (Merck) ile 3 defa çıkartıma tâbi tutuldu. Su fazı ayrılarak kalan pentan rezidüleri düşük basınç altında uçuruldu. Elde edilen sıvı dietil eter (Merck) ile 3 defa çıkartıma tâbi tutuldu (Çıkartım-1). Son çıkartımdan sonra su fazı ayrılarak pH sı 9,5 oluncaya kadar NH⁴OH ilave edildi; daha sonra da ikinci bir eter çıkartımına tâbi tutuldu (Çıkartım-2). Her iki çıkartım sıvısı ayrı ayrı silika jel (Sigma, U.S.A.) doldurulmuş kolanlardan (1,5 × 40) geçirildi. Eritici olarak klorofom ve klorofom-metanol (1:1) kullanıldı.

Bulgular ve Tartışma

Test sonuçları Tablo - 1 ve Tablo - 2 de özetlenmiştir.

Farklı eter çıkartımlarından klorofom ve klorofom-metanol eritkenleri ile elde edilen 4 süt fraksiyonunun mutajenik aktiviteleri TA98, TA100 ve 17A, 45T bakteriyel test suçları ile ölçüldü. Bütün fraksiyonlar *Sal.typhimurium* TA98 ve *B.subtilis* 17A için negatif bulundu. Eğrelti otu ile beslenmiş ineklerden elde edilen sütlerin her iki çıkartımındaki CHCl₃/ MeOH fraksiyonları TA100 ve 45T suç-

Tablo 1. Bakteriyel mutajenite test sonuçları.

Test Materyali	S.typh.		B.subt.	
	TA98	TA100	17A	45T
Eğrelti otu yedirilmiş inek sütü				
Çıkartım-1				
a) Eter-I, CHCl ₃	—	—	—	—
b) Eter-I, CHCl ₃ /MeOH	11*	35	—	+
Çıkartım-2				
a) Eter-II, CHCl ₃	14	38	—	+
b) Eter-II, CHCl ₃ /MeOH	13	205	—	+++
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-Furyl)Acrylamide	200	305	+	+++

* Revertant koloni sayılarını göstermektedir.

Tablo 2. Normal yemle beslenmiş ineklerden elde edilen süt çıkartmalarının bakteriyel mutajenite test sonuçları.

Test Materyali	S.typh.		B.subt.	
	TA98	TA100	17A	45T
Normal yem yedirilmiş inek sütü				
Çıkartım—1				
a) Eter—I,CHCl ₃	—	—	—	—
b) Eter—I,CHCl ₃ / MeOH	6	7	—	—
Çıkartım—2				
a) Eter—II,CHCl ₃	7	6	—	—
b) Eter—II,CHCl ₃ /MeOH	8	8	—	—

larına karşı mutajenik aktivite gösterdiler. Kloroform fraksiyonlarında çok düşük sayıda his⁺ koloni elde edilmesi ve aynı durumun Rec-Assay denemelerinde de görülmesi, aktif maddenin bir kısmının kloroformla yıkama sırasında kolondan dışarı atıldığı izlenimini vermektedir. 2 nolu eter çıkartımının 1.den daha kuvvetli mutajenik aktivite göstermesi çıkartımın yüksek pH da (9,5) daha iyi olduğunu ortaya koymaktadır. Yaptığımız ön çalışmalar sırasında mikrosomal aktivatöre (S-9) gereksinim olmadanda mutajenik aktivitenin meydana geldiğini saptadığımız için, test ortamlarına S-9 ilave edilmiştir.

Sal. typhimurium testlerinden elde ettiğimiz sonuçlar Pamukçu ve ark. (12, 13) bulgularını doğrulamaktadır. Rec Assay sistemi Sal. typhimurium sistemi kadar mutajenik aktiviteye karşı duyarlı bulunmuştur. Rec Assay sistemi nazırlanış bakımından daha kolay Sal. typhimurium sistemi ise daha kantitatif sonuçlar veren sistemler olarak belirlenmiştir.

Ekosistem'deki mutajen maddelerin hücre DNA'sı üzerine olan zararlı etkileri sonucu insan ve hayvanlarda çeşitli tür kanserlerle teratojenik bozukluklar meydana gelmektedir. Çeşitli bitkilerin, sentetik maddelerin (polycyclic hydrocarbon'lar gibi..), endüstriyel artıkların, kozmetiklerin, bazı ilaçların (nitrofuran'lar) mutajenik ve teratojenik etkiye sahip oldukları son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur (3, 10).

İnsan ve hayvanlar daha genel bir deyimle memeliler için mutajenik ve karsinojenik olan maddelerin tanımlanmasında son yıllara kadar çeşitli güçlüklerle karşılaşmıştır. Yedirme deneylerinin pahalı ve zaman alıcı olması nedeniyle mutajenik veya karsinojenik özellik-

lere sahip maddeler hakkındaki bilgiler çoğunlukla epidemiyolojik çalışmalardan elde edilmekte idi; fakat son on yıl içinde bilhassa Ames ve arkadaşlarının öncülük ettiği çalışmalarla hem ucuz hemde kısa zamanda sonuç veren çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (5). Tarama testleri olarak kullanılan sistemlerle, ortaya konan mutasyon türleri Tablo-3'de gösterilmiştir.

Bu testlerde mutajenik maddeler veya bunların metabolitleri prokaryotik hücrelerin veya eukaryotik hücrelerin kromozomlarında yaralama veya onarım işlemleri ile mutasyonlara neden olmaktadır.

Tablo 3. Mutajenik aktivitenin saptanmasında kullanılan test sistemleri.

Organizma/test sistemi	Nokta mutasyonlar	DNA veya kromozom onarımı	Kromozomal mutasyonlar
A) Prokaryotikler			
Sal. typhimurium	+	+	
E.coli	+	+	
B.subtilis	+	+	
S.cerevisiae	+	+	
B) Eukaryotikler			±
Fungi	+		+
Drosophila	+		+
Mikronüklous test	+		+
Sperm morfolojisi	+		+

Bugün birçok ülkede kurulan mutajenite test laboratuvarlarında ekosistemde bulunan, insan ve hayvanlar için büyük olasılıkla mutajenik ve karsinojenik olan maddeler Tablo - 3'de gösterilen testlerin biri veya birkaçı ile incelenmekte ve bu testlerde müsbet sonuç veren örnekler yedirme deneylerine tâbi tutularak karsinojenik karakterleri incelenmektedir. Ülkemizde de bu tür çalışmalar yapacak bir laboratuvarın vakit geçirilmeden kurulmasının insan ve hayvan sağlığı yönünden faydalı olacağı kanısındayız.

Literatür

- 1- **Ames, B.N.** (1971): *The detection of chemical mutagens with enteric bacteria.* In A.Hollaender (Ed). *Chemical Mutagens: Principle and Methods for Their Detection.* Acad.Press. New York, U.S.A. 1:267.
- 2- **Ames, B.N., Lee, F.D., and Durston, W.E.** (1973): *An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70:782.

- 3- **Ames, B.N.** (1979): *Identifying enviromental chemicals causing mutations and cancer.* Science, 204:587.
- 4- **Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E.** (1975): *Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian micrososome mutagenicity test.* Mutation Res. 31:347.
- 5- **Anon.** (1978): *Mutagenicity screening, general principle and minimal criteria.* Report of a Committee of the European Enviromental Mutagen Society.
- 6- **Bridges, B.A.** (1972): *Simple bacterial systems for detecting mutagenic agents.* Lab.Pract. 21: 413.
- 7- **Hirano, K., Narui, K., Sadaie, Y., and Kada, T.** (1978): *Some improvements in the mutagenicity testing of chemicals with Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium and Escherichia coli; results with 500 chemicals.* Mutation Res. 53:200.
- 8- **Kada, T., Tutikawa, K., and Sadaie, Y.** (1972): *In vitro and host mediated "Rec-Assay" procedure for screening chemicals mutagens and phloxine, a mutagenic red dye detected.* Mutation Res. 16:165.
- 9- **Kada, T.** (1976): *Rec-Assay with cold incubation with and without metabolic reactivation in vitro.* Mutation Res. 38:340.
- 10- **Kada, T., Hirano, K., and Shirasu, Y.** (1980): *Screening of enviromental chemical mutagens by the Rec-Assay system with Bacillus subtilis.* In Chemical Mutagens, Vol.6. In Serres, J. F., and Hol-laender, A. (Eds). Plenum Publ. Corp. New York, U.S.A. 149.
- 11- **Pamukçu, A.M., Price, J.M., and Bryan, G.T.** (1976a): *Naturally occuring and bracken fern induced bovine bladder tumors.* Vet. Path. 13:110.
- 12- **Pamukçu, A.M., Ertürk, E., Yalçiner, Ş., Milli, Ü., and Bryan, T.G.** (1976b): *Carcinogenic activity of milk from bracken fern fed cows.* Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 17:14.
- 13- **Pamukçu, A.M., Ertürk, E., Yalçiner, Ş., Milli, Ü., and Bryan, T.G.** (1978): *Carcinogenic and mutagenic activity of milk from cows fed bracken fern.* Cancer Res. 38: 1556.
- 14- **Price, J.M., and Pamukçu, A.M.** (1968): *The induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and small intestine of the rat by feeding bracken fern.* C ancer Res. 28: 2247.

Yazı 30.12.1981 günü alınmıştır.