

# Antioksidan Maddelerin Mutajenite Üzerine Etkilerinin Ames Testi ile İncelenmesi

Ayfer Beceren, Betül Sarıkaya, Eşref Tatlıpınar, Gülden Z. Omurtag, Semra Şardaş

## ÖZ

Günümüzde insan sağlığında önemli rol oynayan kimyasal ajanların mutajenik etkilerinin gözlem altına alınmasını sağlayan çeşitli test sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerden biri de Ames testidir. Ames testi ile kimyasalların mutajenik etkilerinin belirlenmesi için çeşitli mutant bakteriler geliştirilmiştir. Bunun için de *Salmonella typhimurium* bakterisinin çeşitli suşları kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Salmonella*/mikrozom Ames test kiti ile metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda, gen mutasyonlarına sebep olan karsinojenik madde olan 2-Aminoflorene karşı antioksidan etkiye sahip *Pelargonium sidoides*'in muhtemel antimutajenik etkisinin araştırılması

amaçlanmıştır. Yöntemde *Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA 98 suşları ile çalışılmıştır. TA 100 baz çifti değişimine, TA 98 ise çerçeve kaymasına yol açan mutajenlerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olmak üzere iki grup halinde gerçekleştirilmiştir. Test sonuçlarının ortalaması alınarak, pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, *Pelargonium sidoides*'in TA 100 ve TA 98 suşları ile S9 yokluğunda 2-aminoflorene karşı antimutajenik aktiviteye sahip olduğu ( $p \geq 0.05$ ) S9 varlığında ise antimutajenik aktiviteye sahip olmadığı ( $p \leq 0.05$ ) gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ames Testi, antioksidan, *Pelargonium sidoides*, S9 fraksiyonu, mutajenisite

Ayfer Beceren, Betül Sarıkaya, Semra Şardaş  
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Eşref Tatlıpınar, Gülden Z. Omurtag  
İstanbul Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

## Sorumlu Yazar:

Ayfer Beceren  
e-posta: ayfer.tozan@marmara.edu.tr

Submitted / Gönderilme: 03.02.2017 Revised / Düzeltilme: 14.02.2017

Accepted / Kabul: 14.02.2017

## GİRİŞ

Günümüzde insanlarda, kalıtsal hastalıkların ve kanser riskinin önlenmesi amacıyla genetik toksikoloji alanında çeşitli test sistemleri geliştirilmiş ve bu sistemler ile insan sağlığında önemli rol oynayan kimyasal ajanların mutajenik etkileri gözlem altına alınmıştır (1-5). Mutajenite ile karsinojenite arasındaki ilişki anlamlı olduğu için karsinojen maddelerin araştırılmasında mutajenite esas alınmaktadır (6). Mutajenite testlerinin önemi, yapılan çalışmalarla da gözlemlenmiştir (7).

1972 yılında mutajenik etkilerin belirlenmesi amacıyla Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilen Ames testi günümüzde ilaçlar, ilaç ham maddesi olarak kullanılmak istenen test maddeleri, kozmetikler, gıda katkı maddeleri gibi insanların kullanımına sunulan ksenobiyotiklerin mutajenitelerinin saptanmasında oldukça geniş bir uygulama alanı olan hızlı sonuç veren ve güvenilir bir bakteriyel test sistemidir (8, 9).

Bu test sisteminde kimyasalların mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılmak üzere bakteriyel mutantlar (bakterilerin yaşaması için gerekli olan aminoasit üretimini

yapan histidin geni mutasyonuna uğratılmış) geliştirilmiştir. Bunun için de *Salmonella typhimurium* bakterisinin çeşitli suşları kullanılmaktadır (TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 gibi). Bakterilerde gerekli aminoasitin yani histidinin sentezi olmadığında büyüme olmaz ve koloni formu oluşamaz. Suşlar şüpheli kimyasal (test bileşeni) ile muamele edildikten sonra histidin üretebilir (his<sup>-</sup> his<sup>+</sup>) hale gelir ve büyüyerek koloni formu oluştururlar (7, 10).

*Salmonella*/mikrozom testi; kimyasallar ve çevresel örnekler için geniş ölçüde kullanılan bir tekniktir. Yakın zamanda yayınlanan derlemeler ile çevresel örneklerde yapılan mutajenite testlerinde tekniğin geniş ölçüde (yüzey suları (%37), su sedimenti (%41), toprak (%38) ve atmosferik örnekler) kullanıldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, çevresel düzenleyici yasalarla yönelik analizler, su kalite izleme programları ve etkiye yönelik analizlerde testin kullanımı her geçen gün artmaktadır.

Ames microplate fluctuation (MPF) testi temelde geleneksel Ames testi ile aynı ilkelere sahiptir, ama bu test türü için yeni standartlar kurulmuştur. Geleneksel Ames testine göre birçok avantajı vardır ve OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) ve FDA (Food and Drug Administration: İlaç ve Gıda Dairesi) kılavuzlarına uygundur. Ames MPF testi kit sistemindeki basit protokoller ve otomasyon ile *Salmonella*/mikrozom testinin önemli bir araç olarak tüm dünyada etkili kullanımı sağlanmaktadır (11).

Kado ve ark. tarafından 1983 yılında idrar örneklerini ve sıklıkla kullanılan çevresel örnekleri test etmek için kullanılan *Salmonella*/mikrozom testinin mikrosüspansiyon versiyonu geliştirilmiştir (12). Bu teknik ile düzenli plak ya da preinkübasyon testi karşılaştırıldığında daha az örnek miktarı yeterlidir. Ames MPF test kitleri geleneksel *Salmonella* testinin (13-15) sıvı mikropalak modifikasyonudur. Bu kitlerin kullanılması, madde tüketimini ve harcanan zamanı azaltmakta ve aynı zaman aralığında daha çok kimyasal incelenme imkanı sağlamaktadır. Kit içeriğinde, kullanıma hazır medyumlar ve performans testleri yapılmış *Salmonella* mikrozom suşlarını (fenotip: *uvrB*, *rfa*,  $\Delta$ *bio*, Ampisilin direnci ve his<sup>-</sup> genotip sekanslaması yapılmış) içermektedir.

Bu çalışma ile ilaç geliştirilmesinde prelinik çalışmalarda mutajenite testi olarak yaygın kullanıma sahip *Salmonella*/mikrozom Ames test kiti ile gen mutasyonlarına sebep olan karsinogenik madde olan 2-aminoflorene karşı *Pelargonium sidoides*'in muhtemel antimutajenik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Ames testinde, *in vitro* mutasyonlar sonucu histidin amino asidini sentezleme yeteneğini kaybetmiş mutant *Salmonella typhimurium* suşları (his<sup>-</sup>) bulunmaktadır ve bu nedenle harici bir histidin kaynağı olmadan bu suşlar koloniler oluşturamazlar. Mutajenik bir madde varlığında mutasyon tersine çevrilirse sorumlu gen bölgesinde fonksiyon düzenlenir ve histidin, bakteriler tarafından üretilebilir böylece koloni büyümesi devam eder. Çalışmamızda uygulanan Ames MPF™ testi Xenometrix'ten (Allschwil, İsviçre) temin edilen kit içeriğindeki yöntem esas alınarak yürütülmüştür. Ames MPF™ test kiti, geleneksel Ames analizinin sıvı mikropalak modifikasyonudur. Testin bu modifikasyonunda, geri dönüşüm hücrelerinin katabolik aktivitesi bir inkübasyon solüsyonunun pH'sını düşürür ve mordan sarıya renk değişimi elde edilir. Sonuçlar, pozitif (sarı) ve negatif (mor) kuyuları sayarak değerlendirilir (13). Testte kullanılan *Salmonella* mutant suşları, histidin operonunun çeşitli genlerinde farklı mutasyonlara sahiptir. Testte çerçeve kayması ve baz çifti değişimi mutasyonlarının saptanması amacıyla, *Salmonella typhimurium* sırasıyla, TA98 ve TA100 bakteri suşları ile çalışılmıştır. Metabolik aktivasyon sistemi (S9 karışımı) için, Araklor 1254 ile indüklenen liyofilize sıçan karaciğeri S9 mikrozomal fraksiyonu kullanılmıştır. Ekstraktların mutajenik potansiyelleri, S9 karışımının varlığında ve yokluğunda değerlendirilmiştir. Testlerde %30'luk S9 karışımı kullanılmıştır. S9 karışımının hazırlanması için gerekli kofaktör çözeltilerinin hazırlanışları ve saklama koşulları Xenometrix'ten temin edilen kit içinden çıkan prosedüre uygun olarak deney sırasında taze olarak steril tüp içerisinde hazırlanmış ve deney süresince buz içerisinde bekletilmiştir. Deneydeki S9 karışımının nihai konsantrasyonu % 4.5 v/v idi. Deneyde pozitif kontrol olarak, S9 karışımı yokluğunda 2-nitrofluoren (2 µg/mL) ve 4-nitrokinolin-N-oksit (0.1 µg/mL) ile, S9 karışımı varlığında ise 2-aminoantrasen (5 µg/mL) ile inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır.

Çalışmamızda TA 98, TA 100 ve negatif kontrol olarak etiketlenen bir gecelik bakteri kültür örneklerinin optik yoğunluğu OD<sub>600</sub> değerleri negatif kontrolün 0.02 (≤0.05), TA98 için OD<sub>600</sub> değeri 2.36 ve TA100 için OD<sub>600</sub> değeri 2.87 olarak ölçülmüştür.

Ames testine başlamadan önce tayin edilecek örneğin (*Pelargonium sidoides*) test ortamındaki çözünürlüğü ve çalışılacak konsantrasyon aralığının bakteri suşu

üzerine sitotoksik etkisi ön deneyle incelenmiş olup, test prosedüründe olduğu gibi, öncelikle 96 kuyucuklu mikrolakada test maddeleri için seyreltme işlemi yapılır ve 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasına aktarılmıştır. Mikrolakalar, maruziyet besiyeri ve bir gecelik bakteri kültürü eklendikten sonra, 37°C ve 250 rpm'de 90 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Buna göre yapılan inceleme sonrasında, sitotoksisite gösteren en düşük doz, testte kullanılan en yüksek konsantrasyon (0.2484 µg/mL) olarak seçilmiştir. Deney sonunda mikrolaka kuyucuğundaki test maddesi 25 kat oranında seyrelmiş olup test maddesinin deneydeki en yüksek konsantrasyonunun 25 kat konsantre çözeltisi hazırlanmıştır. 6 numaralı kuyucuğa 25 kat konsantre test maddesinden 300 µL konulmuştur. 300 µL içeriğinde 294 µL Maruziyet besiyeri + 3 µL *Pelargonium sidoides* (0.2484 µg/mL) +3 µL 2-aminofluoren (0.1 µg/µL) %1 DMSO içinde hazırlanmış olarak eklenmiştir. Çalışmamızda, *Pelargonium sidoides*'in 2-aminofluoren (Alpha Aesar, B22769) varlığında koruyucu etkisi Ames MPF™ testi ile 6 farklı konsantrasyonda (0.00776, 0.015525, 0.03105, 0.0621, 0.1242, 0.2484 µg/mL) incelenmiştir. Her şuş için 3 farklı plağa ekim yapılmış ve ortalama değerler istatistik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca *Pelargonium sidoides*'in antimutajenik aktivitesinin değerlendirilmesinde S9 varlığında TA98 ve TA100 suşları ile Ames MPF™ testi uygulanmıştır.

### *Pelargonium sidoides* kökü sıvı ekstresi

Türkiye'de *Pelargonium sidoides* Umca adı ile 11.03.2008 yılında 2008/10 numarası ile ruhsat almıştır. Solüsyonun piyasada eşdeğeri olan bir ilaç bulunmamaktadır. İçeriğinde 100g çözelti etken madde olarak 80g *Pelargonium sidoides* kökü sıvı ekstresi, çözücü ve koruyucu olarak eser miktarda etanol ve gliserol içermektedir.

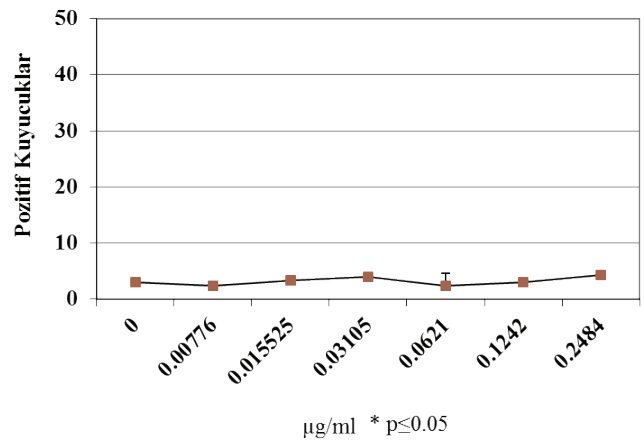
### İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel karşılaştırma kit ile birlikte sunulan programın içinde hazır olarak verilen Excel programında yapılmıştır. Excelde sonuçlar ayrıca grafik (revertant sayısı-konsantrasyon) olarak da gözlenmiştir. Kuyulardan pozitif (sarı) kuyuların sayısı sayılmış ve negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır. Ames sonuçlarının değerlendirilebilmesi için, çözücü kontrol başlangıcına kıyasla pozitif kuyucuk sayısındaki artış ve doz bağımlılığı, kriter olarak

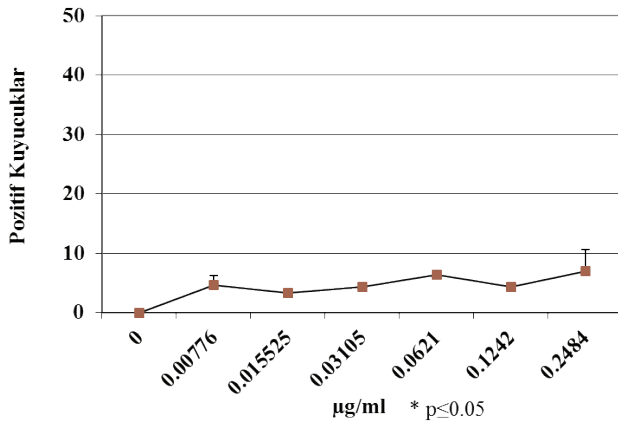
kullanılmıştır. Revertantların çözücü kontrolüne göre kat artışı, her dozdaki ortalama pozitif kuyucuk sayısının taban çizgisindeki çözücü kontrolündeki pozitif kuyu sayılarına bölünmesiyle tespit edilmiştir. Çözücü kontrol taban çizgisi, çözücü kontrolündeki pozitif kuyucukların + 1 standart sapma (SD) aralığı olarak tanımlanmıştır. Aynı koşullara (aynı gün, aynı bakteri kültürü, çözücü ve inkübasyon koşulları) sahip bir deneydeki tüm çözücü kontrolleri birleştirilmiştir. Tabana göre  $\geq 2$  kat artış o doz için pozitif olarak sınıflandırılmıştır. Bir test örneği, (başlangıçtan  $\geq 2$  kat) hiçbir yanıt alınmadığında negatif olarak sınıflandırılmış ve doza bağlı yanıt gözlenmedi olarak değerlendirilmiştir. Doza bağlı yanıtın değerlendirilmesi amacıyla Student *t*-testi (tek taraflı, eşleştirilmemiş) kullanılmıştır. P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ve her deney en az iki kez tekrarlanmıştır.

### BULGULAR

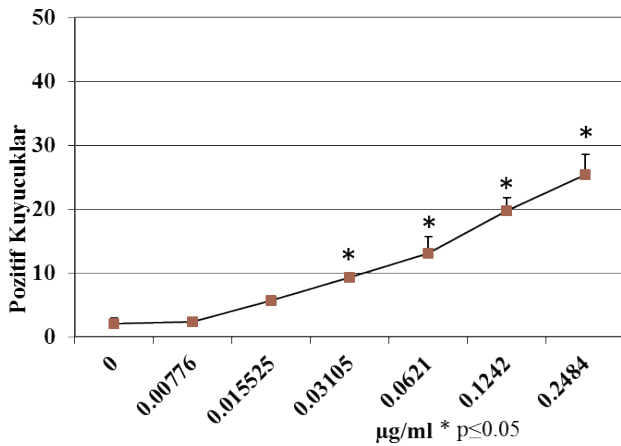
Sonuçlar, standart sapmaları ile birlikte ortalamaları alınarak student *t* testi ile pozitif ve negatif kontroller varlığında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. TA98 ve TA100 ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9 yokluğunda koruyucu etki gözlemlenirken ( $p \geq 0.05$ ) S9 varlığında istatistiksel olarak anlamlı değerler bulunmuştur ( $p \leq 0.05$ ). Bu da *Pelargonium sidoides*'in S9 varlığında yani metabolik aktivasyon sonrası parçalandığında oluşan metabolitlerinin 2-Aminofluoren'e karşı koruyucu etkisi olmadığını göstermektedir. Şekil (1-4)' de istatistiksel tablolar ile sonuçlar gösterilmektedir.



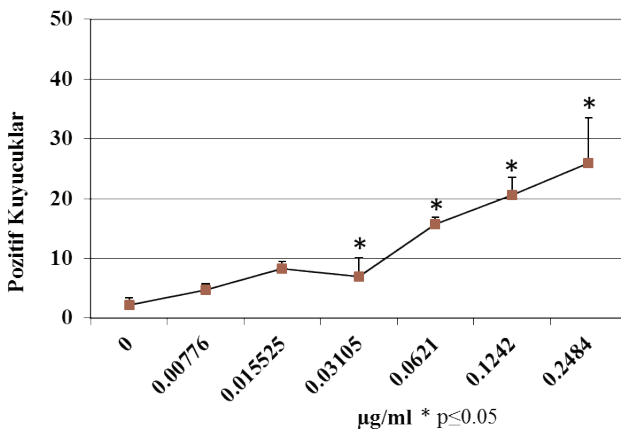
Şekil 1. Ames Testi sonucu TA98 grafiği



Şekil 2. Ames Testi sonucu TA100 grafiği



Şekil 3. Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği



Şekil 4. Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Kimyasalların ve ilaçların mutajenik aktivitesinin araştırılması amacıyla birçok genotoksisite testi kullanılmasına rağmen standart ve güvenilir sonuçlar sağlaması nedeniyle geleneksel Ames *Salmonella*/mikrozom testi sıklıkla tercih edilmektedir (10, 7).

Bu test sistemi, kimyasalların mutajenik özelliklerinin belirlenmesinden farklı olarak antimutajenik özelliklerinin de belirlenmesinde kullanılmaktadır (16, 17). İlaç geliştirme çalışmaları aracılığıyla yeni üretilen bileşiklerin oldukça küçük ve hassas ölçümler gerektirmesi, Ames test sistemine alternatif testler geliştirilmesi ile ilgili yeni çalışmaların yapılmasına neden olmuştur. Çünkü geleneksel Ames testinde çok fazla kimyasal, alet, iş gücü ve zamana ihtiyaç duyulmakta ve bu sebeple yeterli hizmet sağlanamamaktadır.

Ames MPF mutajenite testi, sıvı mikroplak modifikasyonu, yüksek hız, renkli ölçüm, kolay uygulama, düşük test kimyasalları kullanma olanakları sunmaktadır. Sıvı mikroplak versiyonu ile ağara uygulama yapılan geleneksel Ames testinin uyumluluğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (11, 13, 14, 18, 19).

*Pelargonium sidoides* kumarin, kumarin glikoziti, kumarin sülfat, flavonoid, proantosiyenid, fenolik asitler ve fenilpropanoid türevini içermektedir (20). Polifenollerin ve flavonoidlerin, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin olduğu ve pek çok dejeneratif hastalığın (kanser ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi) önlenmesinde katkı sağladığı yapılan son çalışmalar ile gösterilmiştir (21-23).

Farklı çözücüler yardımı ile hazırlanan bitki ekstralarında [*Myrtus communis*, *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*, Chaga mantarı (*Inonotus obliquus*), *Sisymbrium officinale*, yeşil çay polifenollerinde, *Origanum* yağı, karvakrol, hint tıbbi ilacı triphala (*Terminalia bellerica*, *T. chebula* ve *Embllica officinalis* kombinasyonu), iki flavonon *apigenin* ve *robinetin*, ve *indol-3-karbinol*] Ames tekniği ile gerek *Salmonella typhimurium*'un TA 98, TA100, TA102, TA1535 ve TA1538 farklı suşları üzerinde gerek *Escherichia coli*'nin WP2uvrA suşunda S9 varlığında ve yokluğunda baz değişimi ve çerçeve kaymasına neden olduğu ispatlanmış mutajenik ajanlara karşı antimutajenik aktivitelerinin incelenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu bitkilerin farklı çözücüler ile hazırlanan ekstralarında antimutajenik aktiviteye sahip oldukları raporlanmıştır (24-32).

Son zamanlarda, ilaç endüstrisi için alternatif bir teknoloji olarak sentetik kimyasal kütüphanelerin yüksek verimli taranması öncelik teşkil etmesine rağmen, doğal kaynaklı

ürünler ilaç keşfinde önemli bir bileşen olmaya devam etmektedir. Tıbbi bitkiler, özellikle, orijinal (yeni) kimyasal maddelere ve fitofarmasötiklere potansiyel kaynak olarak pek çok avantaj sunmaktadır. Çeşitli *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalar ile gösterilen farmakolojik aktiviteler, *Pelargonium sidoides*'in antibakteriyel, antiviral ve immünomodülatör aktivitelere sahip olduğunu gözler önüne sermektedir. Uzun yıllardan beri geleneksel tıpta kullanılmasına rağmen, *Pelargonium sidoides*'in toksikolojik özelliklerine ilişkin nihai veriler yeterli olmadığı savunulmuştur (33, 34).

Çalışmamızda, *Pelargonium sidoides*'in 2-Aminofluoren varlığında koruyucu etkisi Ames MPF™ testi ile TA98 ve TA 100 suşları kullanılarak S9 varlığında ve yokluğunda 6 farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Çalışmamızda, *Pelargonium sidoides*'in TA 100 ve TA 98 suşları ile S9 yokluğunda

2-Aminofluorene karşı antimutajenik aktiviteye sahip olduğu ( $p \geq 0.05$ ) S9 varlığında ise antimutajenik aktiviteye sahip olmadığı ( $p \leq 0.05$ ) gösterilmiştir (Şekil 1-4).

Sonuç olarak farmakolojik araştırmalarla *Pelargonium sidoides* ile ilgili önemli kilometre taşlarına ulaşılmış olmasına rağmen, etki mekanizmasının ve terapötik kapasitenin altında yatan biyolojik prensiplerin tam olarak aydınlatılması için daha fazla çalışma gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, SAG-C-YLP-040712-0264 koduyla Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

### Investigation of Antioxidants's Antimutagenic Effects by The Ames Test

#### ABSTRACT

Nowadays, several test systems have been developed in order to observe the mutagenic effects of chemical agents which play crucial roles in human health. The Ames Test is one of these test systems. With the Ames Test, some bacterial mutants have been discovered to investigate the mutagenic effects of the chemicals. Various strains of *Salmonella typhimurium* are one of the groups of the bacterial mutants in question. The aim of this study is to investigate possible antimutagenic effect of *Pelargonium sidoides* which have an antioxidant effect towards carcinogenic substance called 2-aminofluorene by Ames/Salmonella/Microsome test

kit in the absence and presence of metabolic activation. TA 98 and TA 100 strains were used in these experiments. TA 98 is designed for frame-shift mutagens and TA 100 is designed for base-pair mutagens. The antimutagenic activity was screened in two groups with or without S9 metabolic activation. The results were evaluated the mean average values and compared with positive and negative controls. In conclusion, it was shown that *Pelargonium sidoides* have antimutagenic effect towards TA 98 and TA 100 without S9 metabolic activation ( $p \geq 0.05$ ) but have no antimutagenic effect towards TA 98 and TA 100 with S9 metabolic activation ( $p \leq 0.05$ ).

**Keywords:** Ames test, antioxidant, *Pelargonium sidoides*, S9 fraction, mutagenicity

## KAYNAKLAR

1. Barile FA. Principle of Toxicology testing page, Chapter 15. New York, USA. 2008, pp 209-228.
2. Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, Melcion C, Nohmi T, Ohta T, Venitt S, Zeiger E. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. Mutat Res 1994;312: 217-33.
3. Kier LE, Brusick DJ, Auletta AE, Von Halle ES, Brown MM, Simmon VF, Dunkel V, McCann J, Mortel-mans K, Prival M, Rao TK, Ray V. The *Salmonella typhimurium* mammalian microsomal assay: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat Res 1986;168: 69-240.
4. Pai CA. Foundation of genetics. Ascience for society. Keffort press, Singapur. 1985.
5. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, *Salmonella* mutagenicity tests V. Results from the testing of 311 chemicals. Environ Mol Mutagen 1992;19: 2-141.
6. Temizkan GO. Genetik. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul. 1994, s: 281.
7. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutat Res 2000;455: 29-60.
8. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975;31:347-64.
9. Regulatory Genetic Toxicology Tests. In: Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Editor: Choy WN. New York. 2001, pp 93-114.
10. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the mutagenicity test. Mutat Res 1983;113: 173-215.
11. Umbuzeiro Gde A, Rech CM, Correia S, Bergamasco AM, Cardenette GH, Flückiger-Isler S, Kamber M. Comparison of the *Salmonella*/microsome microsuspension assay with the new microplate fluctuation protocol for testing the mutagenicity of environmental samples. Environ Mol Mutagen 2010;51: 31-8.



12. Kado NY, Langley D, Eisenstadt E. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. *Mutat Res* 1983;121: 25-32.
13. Flückiger-Isler S, Baumeister M, Braun K, Gervais V, Hasler-Nguyen N, Reimann R, Van Gompel J, Wunderlich HG, Engelhardt G. Assessment of the performance of the Ames II assay: a collaborative study with 19 coded compounds. *Mutat Res* 2004;558: 181-97.
14. Gee P, CH. Sommers, A. S. Melick, X. M. Gidrol, M. D. Todd, R. B. Burris, M. E. Nelson & E. Zeiger. Comparison of responses of base-specific *Salmonella* tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study. *Mutat Res* 1998;412: 115-30.
15. Green MHL, Muriel WJ, Bridges BA. Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutat Res* 1976;38: 33-42.
16. Sghaiera MB, Boubakera J, Skandrani I, Bouhleb I, Limema I, Ghediraa K, Chekir-Ghedira L. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of phenolic-enriched extracts from *Teucrium ramosissimum*: Combination with their phytochemical composition. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010;31: 220-32.
17. Zegura B, Dobnik D, Niderl MH, Flipic M. Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2011;32: 296-305.
18. Gervais V, Bijot D, Claude N. Assessment of a screening experience with the Ames II test and future prospects. (servier) European Environmental Mutagen Society Annual Meeting: From Hazard to risk, Aberdeen Scotland (UK). 2003, pp 120.
19. Kamber M, Flückiger-Isler S, Engelhardt G, Jaeckkh R, Zeigerr E. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis* 2009;24: 359-66.
20. Kolodziej H, Kiderlen AF. *In vitro* evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation EPs 7630. *Phytomed* 2007;14: 18-26.
21. Ancos B, Gonzalez EM, Cano MP. Ellagic Acid, Vitamin C and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J Agric Food Chem* 2000;48: 4565-70.
22. Beudot C, De Me' o MP, Dauzonne D, Eliasc R, Laget M, Guiraud H, Balansard G, Dume' nil G. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames Test. *Mutat Res* 1998;417: 141-53.
23. Chai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. *Life Sci* 2004;74: 2157-84.
24. Hayder N, Skandrani I, Kilani S, Bouhleb I, Abdelwahed A, Ben Ammar R, Mahmoud A, Ghedira K, Ghedira L. Antimutagenic activity of *Myrtus communis L.* using the *Salmonella* microsome assay. *S Afr J Bot* 2008;74: 121-5.
25. Özbek T, Güllüce M, Şahin F, Sevsay S, Barış Ö. Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of *Origanum vulgare L. Subsp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Turk J Biol* 2008; 32: 271-6.
26. Ham S, Kim SH, Moon SY, Chung MJ, Cui CB, Han EK, Chung CK, Choe M. Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) Extract. *Mutat Res* 2009;672: 55-9.
27. Sotto AD, Vitalone A, Nicoletti M, Piccin A, Mazzanti G. Pharmacological and phytochemical study on a *Sisymbrium officinale Scop.* Extract. *J Ethnopharmacol* 2010;127: 731-6.
28. Santhosh KT, Swarnam J, Ramadasan K. Potent suppressive effect of green tea polyphenols on tobacco-induced mutagenicity. *Phytomed* 2005;12: 216-20.
29. İpek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tülyü B, Kürkcüoglu M, Can Baser KH. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. *Food Chem* 2005;93: 551-6.
30. Kaur S, Arora S, Kaur K, Kumar S. The *in vitro* antimutagenic activity of Triphala- an Indian herbal drug. *Food Chem Toxicol* 2002;40: 527-34.
31. Birt DF, Walker B, Tibbels MG, Bresnick E. Antimutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* 1986;7: 959-63.
32. Raucher R, Edenharder R, Platt KL. *In vitro* antimutagenic and *in vivo* anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutat Res* 1998;413: 129- 42.
33. Mativandlela SPN, Lall N, Meyer JJM. Antibacterial, antifungal and antitubercular activity of (the roots of) *Pelargonium reniforme* (CURT) and *Pelargonium sidoides* (DC) (Geraniaceae) root extracts. *S Afr J Bot* 2006;72: 232-7.
34. Moyo M, Van Staden J. Medicinal properties and conservation of *Pelargonium sidoides* DC. *J Ethnopharmacol* 2014;152: 243-55.