

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Esra ÖZDEMİR**

**1,8-CINEOLE (EUCALYPTOL) BİLEŞİĞİNİN IN VITRO GENOTOKSİK  
ETKİLERİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2015**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**1,8-CINEOLE (EUCALYPTOL) BİLEŞİĞİNİN IN VITRO GENOTOKSİK  
ETKİLERİ**

**Esra ÖZDEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez 18/09/2015 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....  
Prof. Dr. Hasan Basri İLA  
DANIŞMAN

.....  
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ  
ÜYE

.....  
Doç. Dr. Ahmet KAYRALDIZ  
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No:**

**Prof. Dr. Mustafa GÖK  
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.**

**Proje No: FEF2013YL37**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### 1,8-CINEOLE (EUCALYPTOL) BİLEŞİĞİNİN IN VITRO GENOTOKSİK ETKİLERİ

Esra ÖZDEMİR

#### ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Hasan Basri İLA

Yıl: 2015, Sayfa: 97

Jüri : Prof. Dr. Hasan Basri İLA

: Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

: Doç. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Bu çalışmanın amacı, *Eucalyptus globulus* (ökaliptus) bitkisi uçucu yağının ana bileşeni olan 1,8-Cineole (1,8-sineol, eucalyptol)'ün insan periferik lenfositlerinde in vitro genotoksik ve sitotoksik etkilerini araştırmaktır. Çalışmada 1,8-sineolün 0.07, 0.14, 0.21 ve 0.28 µg/mL'lik konsantrasyonları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir. 1,8-sineolün genotoksik etkisi, kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormalliği (KA) ve mikronükleus (MN) testleriyle, sitotoksik etkisi de replikasyon indeksi (RI), mitotik indeks (MI) ve nükleer bölünme indeksinin (NBI) saptanmasıyla belirlenmiştir. Ayrıca total oksidan ve total antioksidan seviyeleri spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. Çalışmamızda 1,8-sineol, sağlıklı insan periferik kan lenfositlerinde bütün konsantrasyon ve sürelerde KKD'yi önemli düzeyde etkilememiştir. 1,8-sineol kromozom aberasyonunu bir miktar arttırmış fakat bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Benzer şekilde test maddesi MN oluşumunu da indüklememiştir. 1,8-sineol her iki muamele süresinde (24 ve 48 saat) sadece en yüksek konsantrasyonda (0.28 µL/mL) proliferasyon indeksini kontrol ve çözücü kontrole göre önemli seviyede düşürmüştür. 1,8-cineole'ün 0.21 µL/mL konsantrasyonu 48 saatlik muamelede mitotik indeks çözücü kontrole göre önemli düzeyde azaltmışken, 0.28 µL/mL konsantrasyonu hem kontrol hem de çözücü kontrole göre önemli düzeyde düşürmüştür. Nükleer bölünme indeksleri (NBI) incelendiğinde 24 saatlik muamelede sadece en yüksek iki konsantrasyondaki (0,21 ve 0,28 µL/mL) NBI düşüşü kontrollere göre önemli bulunmuştur. Deneyin 48 saatlik muamelesinde en düşük konsantrasyon hariç tüm konsantrasyonlarda NBI kontrole göre azalmıştır. Test maddesi toplam oksidan ve toplam antioksidan seviyesine (24 saatlik en yüksek konsantrasyon hariç) etki etmemiştir. Sonuç olarak oksidatif stres indeksinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** 1,8-Cineole, Genotoksisite, Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Anormalliği, Mikronükleus

## ABSTRACT

### MSc THESIS

#### **IN VITRO GENOTOXIC EFFECTS OF 1,8-CINEOLE COMPOUND**

**Esra ÖZDEMİR**

**ÇUKUROVA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

Supervisor : Prof. Dr. Hasan Basri İLA  
Year: 2015, Pages: 97  
Jury : Prof. Dr. Hasan Basri İLA  
: Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ  
: Assoc. Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

The aim of this study was to investigate in vitro genotoxic and cytotoxic effect of 1,8-Cineole (eucalyptol) which is main compound of essential oils of *Eucalyptus globulus* plant in human peripheral blood lymphocytes. In the study, 0.07, 0.14, 0.21 and 0.28 µg/ml concentrations of 1,8-cineole were tested for 24 or 48 hours treatment periods. Genotoxic effect of 1,8-Cineole was determined with sister chromatid exchange (SCE), chromosome aberration (CA) and micronucleus tests and cytotoxic effect of 1,8-cineole was determined with replication index (RI), mitotic index (MI) and nuclear division index (NDI). Also, total oxidant and antioxidant values were determined by spectrophotometric method. In our study, 1,8-cineole did not affect SCE in human peripheral blood lymphocytes both all concentrations and treatment periods. 1,8-Cineole slightly increased CA but this increase was not statistically significant. Alike, the test substance did not induce formation of micronuclei. For two treatment periods, 1,8-cineole reduced RI significantly at highest concentration (0.28 µL/mL) when compared with control and solvent control. The highest two concentrations (0.21 and 0.28 µL/mL) of test chemical reduced MI significantly for 48 hours treatment period when compared with control and solvent control. Looking at NDI, the two highest concentrations of 1,8-cineole (0.21 and 0.28 µL/mL) reduced NDI for 24 hours treatment period when compared with control and solvent control. For 48 hours treatment period, NDI decreased at all concentrations (except the lowest) when compared with solvent control. 1,8-Cineole did not affect total oxidant (except the highest concentration for 24 hours treatment period) or total antioxidant values. As a result, there were not any significant changes in oxidative stress index.

**Keywords:** 1,8 Cineol, Genotoxicity, Sister Chromatid Exchange, Chromosome Aberration, Micronucleus.

## **TEŞEKKÜR**

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Hasan Basri İLA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarından dolayı Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a, laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Uzman Biyolog Taygun TİMOÇİN'e, Dr. Mehmet BÜYÜKLEYLA'ya, Uzman Biyolog Rima ÇELİK'e, Uzman Biyolog Tuba DÖRDÜ'ye, Uzman Biyolog Mostafa NOORİZADEH TAZEKAND'a, Uzman Biyolog Orkideh HAJİPOOR'a, Uzman Biyolog Saeid SADİGHAZADİ'ye ve Arş. Gör. Mehmet Tahir HÜSUNET'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince kendi laboratuvarının imkânlarını sunan sayın Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e ve projemi destekleyen Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ile Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsüne çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında manevi ve maddi açıdan bana her zaman destek olan annem Hatice ÖZDEMİR'e, babam Yaşar Kaya ÖZDEMİR'e ve kardeşim Emre ÖZDEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

ÖZ .....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	XII
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	9
2.1. Uçucu Yağların Ana Bileşenleri ile Yapılmış Olan Genotoksisite Çalışmaları .....	9
2.1.1. Anethole (Anetol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	9
2.1.2. $\beta$ -Myrcene (Mirsen) ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları .....	10
2.1.3. $\alpha$ -Terpinene (Terpinen) ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	11
2.1.4. $\gamma$ -Terpinene Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	11
2.1.5. d-Limonene (Limonen) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	12
2.1.6. (+)- $\alpha$ -pinene (pinen) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	14
2.1.7. (+)-3-carene (karen) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	14
2.1.8. Citral (Sital) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	15
2.1.9. S(+)-Carvone (Karvon) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	15
2.1.10. Citronellal (Sitronelal) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	16
2.1.11. (-)+Camphor (Kâfur) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	16

2.1.12. Carvacrol (Karvakrol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	17
2.1.13. Ellagic Acid (Ellajik Asit) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	18
2.1.14. Estragole (Estragol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	19
2.1.15. Eugenol (Öjenol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	20
2.1.16. Geraniol (Geraniyol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	21
2.1.17. Linalool (Linalol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	21
2.1.18. Menthol (Mentol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	22
2.1.19. Safrole (Safrol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	22
2.1.20. Tannic Acid (Tannik Asit) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	23
2.1.21. Thymol (Timol) Bileşeni ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları .....	24
2.1.22. Test Maddesi 1,8-Cineole (Eucalyptol = ökaliptol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	25
3. MATERYAL VE METOT .....	29
3.1. Materyal .....	29
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	29
3.1.1.1. 1,8-Cineole (Eucalyptol - Ökaliptol).....	29
3.1.1.1.(1). 1,8-Cineole'un Kimyasal Özellikleri.....	30
3.1.1.2. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) .....	30
3.1.1.3. Sitokalsin B .....	31
3.1.1.4. Entellan (Merck No: 7961) .....	32
3.1.1.5. Etil Alkol (Sigma No: 32205).....	32
3.1.1.6. Fiksatif.....	32
3.1.1.7. Giemsa (Merck No: 9204) .....	33
3.1.1.8. Hipotonik Eriyik .....	33
3.1.1.9. Kolşisin (Sigma No: C9754).....	33
3.1.1.10. Kromozom Medyumu (PB-Max No: 12552-013) .....	34

3.1.1.11. Mitomisin C (MMC) (Sigma No: Y0000378) .....	34
3.1.1.12. Nitrik Asit (HNO <sub>3</sub> Sigma 438073).....	35
3.1.1.13. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	35
3.1.1.14. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği.....	36
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	36
3.1.2.1. Flow Kabin (Steril Kabin).....	36
3.1.2.2. Hassas Terazi .....	36
3.1.2.3. İnkübatör .....	37
3.1.2.4. Mikroskop .....	37
3.1.2.5. Otoklav .....	37
3.1.2.6. Santrifüj.....	37
3.1.2.7. Su Banyosu.....	37
3.1.3. Lamaların Temizlenmesi .....	38
3.1.4. Sterilizasyon.....	38
3.1.4.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu .....	38
3.1.4.2. Saf Suyun Sterilizasyonu .....	38
3.2. Metot .....	39
3.2.1. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İnceleme .....	39
3.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması ....	39
3.2.1.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması .....	41
3.2.1.3. Daimi Preparatlarda KKD İnceleme .....	42
3.2.1.4. Kardeş Kromatid Değişimi Sayısının (KKD) ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması .....	42
3.2.1.4.(1). Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Sayısının Saptanması .....	42
3.2.1.4.(2). Replikasyon (Proliferasyon) İndeksi (RI=PI)'nin Saptanması .....	43



3.2.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI)Saptanması .....	48
3.2.2.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması .....	48
3.2.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması .....	49
3.2.3. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler .....	49
3.2.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması ....	49
3.2.3.2. Preparatların Boyanması .....	50
3.2.3.3. Mikroskopik İnceleme .....	51
3.2.4. Toplam Oksidan (TOS) ve Antioksidan Seviyesi (TAS) Ölçümü.....	53
3.2.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme .....	53
3.2.6. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi .....	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	55
4.1. Bulgular .....	55
4.1.1. 1,8-Cineole'un Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri .....	55
4.1.2. 1,8-Cineole'un Kromozom Aberasyonu (KA) Oluşturma Üzerine Etkisi.....	56
4.1.3. 1,8-Cineole'un Mikronukleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerine Etkileri .....	61
4.1.4. 1,8-Cineole'un Oksidatif Stres Oluşumu Üzerine Etkileri .....	63
4.1.5. 1,8-Cineole'un Hücre Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	65
4.2. Tartışma.....	67
4.2.1. 1,8-Cineole'un Genotoksik ve Antioksidan Etkisi .....	67
4.2.2. 1,8-Cineole'un Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri .....	70
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	73
KAYNAKLAR .....	75
ÖZGEÇMİŞ .....	97

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 4.1. Farklı Konsantrasyonlarda 1,8-Sineol ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Değerleri .....	56
Çizelge 4.2. Farklı Konsantrasyonda 1,8-Cineole ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, KA/Hücre Oranı ve Anormal Hücre Yüzdesi .....	60
Çizelge 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda 1,8-Cineole ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilen İnsan Periferal Lenfositlerinde Mikronukleuslu Binukleer Hücre* %'si ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) .....	62
Çizelge 4.4. 1,8-Cineole'un Kültürde Oluşturduğu Toplam Oksidan Seviye (TOS), Toplam Antioksidan Seviye (TAS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) .....	64
Çizelge 4.5. Farklı Konsantrasyonlarda 1,8-Cineole ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilen İnsan Periferal Lenfositlerinde Ortalama Mitotik İndeks ve Proliferasyon İndeksi Değerleri .....	66



## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 3.1. Ökalyptol'un açık formülü.....	30
Şekil 3.2. BrdUrd'in açık formülü.....	31
Şekil 3.3. Sitokalsin B'nin açık formülü .....	32
Şekil 3.4. Kolşisin'in açık formülü .....	34
Şekil 3.5. Mitomycin C'nin açık formülü .....	35
Şekil 3.6. a: 1 KKD, b: 2 KKD, c: KKD Yok. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990) .....	43
Şekil 3.7. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin(dU)'in kimyasal yapıları.....	44
Şekil 3.8. BrdUrd'nin DNA yapısına girmesi ile birinci (A), ikinci (B) ve üçüncü mitoz (C) bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During, 1985: Topaktaş ve Speit, 1990'dan) .....	46
Şekil 3.9. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000) .....	47
Şekil 3.10. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000) .....	47
Şekil 3.11. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000) .....	48
Şekil 3.12. Bir (a) ve iki (b) nükleus içeren hücreler. ....	52
Şekil 3.13. Üç (a) ve dört (b) nükleus içeren hücreler .....	52
Şekil 4.1. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde 7 tane KKD içeren ikinci mitoz plağı (x1000) (0,28 µL/mL, 48saat, ♂) .....	55
Şekil 4.2. 1,8-Cineole ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde kromatid kırığı (x1000) (0,28 µL/mL, 48saat, ♂).....	57
Şekil 4.3. 1,8-Cineole ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde kromozom tipi fragment (x1000) (0,21 µL/mL, 48saat, ♂).....	57

Şekil 4.4. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromozom tipi kırık (x1000) (0,21 µL/mL, 48saat, ♀).....	58
Şekil 4.5. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde endoreduplikasyon (x1000) (0,28 µL/mL, 24 saat, ♀) .....	58
Şekil 4.6. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromatid tipi fragment (x1000) (0,21 µL/mL, 48saat, ♂).....	59
Şekil 4.7. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde mikronukleus oluşumu (x1000) (0,21 µL/mL, 48saat, ♂).....	62
Şekil 4.8. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde mikronukleus oluşumu (x1000) (0,28 µL/mL, 48saat, ♂).....	63
Şekil 4.9. 1,8-Cineole ile muamele edilmiş insan periferik kan lenfositlerinde ortaya çıkan sitotoksosite bulguları.....	66

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
4NQO	: 4-Nitroquinoline 1-oxide
AFB	: Aflatoksin B1
AFB1	: Aflatoxin B1
ark.	: Arkadaşları
BAKA	: Batı Akdeniz Kalkınma Ajansı
BrdUrd	: 5'-Bromo-2'-deoxyuridine
CA	: Chromosome Aberration
CE	: Chromatid Exchange
CHO	: Chinese Hamster Ovaryum
CP	: Siklofosamid
ÇK	: Çözücü kontrol
dak.	: Dakika
dev.	: Devir
DMBA	: 9,10-dimetil-1,2-benz [a] antrasenden
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dT	: Deoxytimidin
dU	: Doxyuridin
EMS	: Etil metan sülfonat
ES	: Estragol
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
g	: Gram
Gpt	: Glutamik piruvat transaminaz
Hep G2	: Hepatoma Cell Line ( Hepatoma Hücre Hattı)
HL60	: Human Promyelocytic Leukemia Cells (İnsan Promiyelositik Lösemi Hücreleri)
HNO <sub>3</sub>	: Nitrik asit
HSV-1	: Herpes simpleks virüs-1

HTC	: Hepatic Tumor Cell Line (Karaciğer Tümörü Hücre Hattı)
IPCS	: The International Programme on Chemical Safety (Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı)
IQ	: 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline
ISCN	: International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemi)
KA	: Kromozom Aberasyonu
kb	: Kilo baz
KCl	: Potasyum klorür
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
KOH	: Potasyum Hidroksit
MI	: Mitotik indeks
MMC	: Mitomycin C
MMP	: Mitokondri Membran Potansiyeli
MN	: Mikronükleus
MNNG	: N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MNU	: N-nitroso- N-metylurea
MTT:	: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
MYR	: $\beta$ -mirsen
NaCl	: Sodyum klorür
NBI	: Nükleus Bölünme İndeksi
NTP	: National Toxicology Program (Ulusal Toksikoloji Programı)
OSI	: Oksidatif stres indeksi
P	: Poliploidi
PCB	: Prokarbazin
PI	: Proliferasyon İndeksi
PK	: Pozitif Kontrol
Ppm	: Parts Per Million
PROD	: Pentoxyresorufin O-dealkylase
r	: Korelasyon katsayısı
RI	: Replikasyon İndeksi

RNA	: Ribonukleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SCE	: Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)
SH	: Standart hata
SHE	: Syrian hamster embryo
SMART	: Somatic Mutation and Recombination Test (Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon testi)
sp.	: Tür
spp.	: Türler
SSC	: Standart Saline Citrate
T	: Translokasyon
TAS	: Total antioksidan seviyesi
t-BOOH	: t-bütil hidroperoksit
TOS	: Total oksidan seviyesi
UDS	: Unprogrammed DNA Synthesis ( Programlanmamış DNA Sentezi)
URE	: Üretan
UV	: Ultraviyole
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)
µg/mL	: Mikrogram/mililitre
µg/µL	: Mikrogram/mikrolitre





## 1. GİRİŞ

Mitolojide bitkiler, tanrıların insana verdiği en değerli armağan olarak ele alınmıştır. Buna göre bütün bitkiler insanın hizmetindedir ve insanın varoluşundan itibaren bitkilerle olan ilişkisi başlamıştır (Gezgin, 2007). İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin ve şifa için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır. Deneme yanılma yoluyla elde edilen bu bilgiler, çağlar boyunca kullanım şekillerindeki bazı değişiklik ve gelişmelerle günümüze kadar ulaşmıştır. Kuzey Irak'ta Şanidar Mağarası'nda 1957 yılında yapılan kazılarda bulunan Neandertal adam kalıntıları yanında mezarda bulunanlar, bitki-insan ilişkisinin başlangıcına ait ilk veri olarak kabul edilir. Günümüzden 60 bin yıl öncesine ait olduğu düşünülen bir şaman mezarında; civanperçemi, kanarya otu, mor sümbül, gül hatmi, peygamber çiçeği, ebegümece ve efedra (deniz üzümü) gibi bitki türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Ölülerini gömme geleneği edinen toplumlarda, ölen kişinin tekrar yaşama döndüğünde kullanacağı düşüncesiyle mezara konulduğu tahmin edilen bitkilerin, yenenler ve şifalı olanlar diye ayrılmaya başlandığının da bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Çünkü bu bitki türleri günümüzde de özellikle tıbbi bitki olarak hala önemlidir (Lewin, 1997; Heinrich ve ark., 2012).

Yukarıdaki alıntıdan anlaşılacağı üzere günümüzde olduğu kadar uzak geçmişte de insanlar bitkilerle yakından etkileşim halinde olmuştur. Bitkiler öncelikli olarak gıda ve ilaç olarak kullanılmakla beraber, yakıt, yapı malzemesi, süs eşyası, boya, büyü (inançsal) vb. amaçlar için de kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan bir bildirimde dünya nüfusunun %70-80'inin temel sağlık hizmetleri uygulamalarında bitkisel ürünlerden yararlandıkları ifade edilmektedir (Chan ve ark., 2003).

Bu konudaki ayrıntılara geçmeden önce yeryüzündeki şifalı bitkilerle ilgili bazı sayısal bilgilerin verilmesinde yarar vardır. Bir kaynağa göre dünya genelindeki toplam 422,000 bitki türünden 72,000 kadarı tedavi edici özelliğe sahiptir (Schippmann ve ark. 2006). Başka kayıtlara göre Türkiye'de 2,763 tanesi endemik (Kaya ve ark., 1997), 347 tanesi tıbbi ve aromatik (Özgüven ve ark., 2005) olmak üzere toplam 9,222 çeşit bitki türü mevcut olduğu bilinmektedir (BAKA 2012).

Genellikle hoş kokulu (aromatik) bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar; bitkilerin çiçek, tomurcuk, tohum, yaprak, meyve sapı, kabuk, odun, meyve ve köklerinden elde edilen güzel kokulu yağlı sıvılardır (Burt, 2004). Bu yağlar mekanik presleme, distilasyon veya organik çözücülerde çözülmesi yöntemi ile bitkiden izole edilirler (Stammati ve ark., 1999; Mezzoug ve ark., 2007).

Uçucu yağlar aromatik bitkilerin esansiyel yağlarında doğal olarak bulunan bileşenlerdir. Uçucu yağ, katı ya da sıvı, değişik birçok kimyasal bileşiğin birbiri içinde çözünerek oluşan, uçucu özellikte, homojen ve kompleks bir karışımdır. Bu uçucu yağlar terpen, alkol, aldehid ve fenol içeren birkaç kimyasal bileşenin oluşturduğu karışımlardır (Prashar ve ark., 2004). Uçucu yağlar salgı kanalları, salgı cepleri veya salgı tüylerinde bulunurlar. Uçucu yağlar üretildikleri bitkilere özel, karakteristik hoş kokuya sahip olup kozmetik, parfümeri, gıda ve insektisit (böcek ilacı) endüstrisinde önemli bir ekonomik değer taşırlar. Uçucu yağlar lipofilik özellik göstermesinden dolayı hücre membranının bir tarafından diğer tarafına kolay bir şekilde geçebilmektedir. Bu yüzden tıbbi ve ilaçlarda ham madde olarak kullanılmaktadır (Mezzoug ve ark., 2007). Ayrıca aromatik bitkilerin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Elgayyar ve ark., 2001). Tıbbi amaçla kullanılan uçucu yağlar ve içerdikleri aromakimyasallar, çeşitlerine ve aerokimyasalların elde edilmesinde kullanılan teknolojiye göre değişik riskler taşımaktadırlar.

Tüm bunlarla beraber uçucu yağların bazı yan etkileri de bulunmaktadır (Şarer, 1991; Leal-Cardoso ve Fonteles, 1999). Beslenme ve/veya tedavi amacıyla aromatik bir bitkinin kendisi veya bir bileşeni kullanılıyorsa bunların insan sağlığına olan etkileri özellikle kalıtsal yapıda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması son derece önemlidir. Herhangi bir kimyasal maddenin genotoksik ve/veya sitotoksik risklerinin olup olmadığının belirlenmesi için kısa süreli genotoksisite testleri tercih edilmektedir. Kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin genotoksik veya anti-genotoksik olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan yöntemler; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Tucker ve ark., 1993), kromozom aberasyonu (KA) (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson ve

ark., 1988; Hagmar ve ark., 1994) ve mikronükleus (MN) (Heddle ve ark., 1991; Fenech, 2002) testleri olarak sıralanabilir.

Kardeş kromatid değişimleri, DNA'da ortaya çıkan çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarımını gösteren bir indikatör olup kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında gerçekleşen DNA replikasyon ürünlerinin değişimi KKD olarak gözlenir (Sonoda ve ark., 1999; Helleday, 2003). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücrelerinde KKD frekansının arttığı ve tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu saptanmıştır (Perry ve Evans, 1975; Carrano ve ark., 1978; Albertini ve ark., 2000). Benzer bir ilişkinin KKD artışıyla *in vivo* tümörlerin oluşumu arasında da olduğu Cheng ve ark. (1981) tarafından bildirilmiştir. Kromozom anormalliği bulgularının aksine KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir ancak KKD deneysel çalışmalarda indikatör test olarak genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Norppa ve ark., 2006).

KA oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı lenfositlerdeki anormallik seviyesinin kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskinin de göstergesi olduğu düşünülmektedir (Bonassi ve ark., 2000; Albertini ve ark., 2000; Bonassi ve ark., 2004, 2005). Yüksek KA frekansı, KA artışını başlatan sebebe bakılmaksızın yüksek kanser riskinin bir göstergesi olabilir çünkü KA oluşumu DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından da kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Savage, 1993).

Mikronükleus ise asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından ve bir yada birkaç kromozom ya da kromatidin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan esas nükleusun dışında rastlanan küçük nükleuslardır (Surrallés ve ark., 1995). Ayrıca multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli karyotipik bozukluklardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ iplikçiklerinde ve sentromerde bozulma ya da metafazdan önce

kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır (Dellarco ve ark., 1985). Böylece, MN testi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark., 1997; Norppa ve Falck, 2003). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artışın, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar olduğu bulunmuştur (Cheng ve ark., 1996; Duffaud ve ark., 1997; Bonassi ve ark., 2007). Ayrıca Fenech ve ark. (1999)'nın uluslararası işbirliği ile yaptıkları bir araştırmada insanlarda MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça göstermişlerdir.

Organizmada gerçekleşen birçok fizyolojik ve metabolik faaliyetlerin doğal yan ürünü olarak açığa çıkan reaktif oksijen (ROS) türlerinin hücre sinyalizasyonu homeostaziste hayati görevleri vardır (Devasagayam ve ark. 2004). Bununla birlikte biyolojik sistem tarafından elimine edilemeyen reaktif oksijen türlerinin yapı taşı moleküllerde neden olduğu hasar organizmada yaşlanmaya (Muller ve ark. 2007), riskli hücre proliferasyona (Gupta ve ark. 2012) ve kansere (Irani ve ark. 1997) neden olabilmektedir. Organizmada doğal yolla ortaya çıkan bu oksidan moleküller normalde vücudun antioksidan savunma sistemleri tarafından etkisizleştirilerek dengede tutulmaktadır. Bu dengenin toplam oksidan seviyesi (TOS) lehine bozulması durumunda protein, lipid, nükleik asit gibi hayati moleküllerde yıkıcı reaksiyonların ortaya çıkması kaçınılmaz bir sonuçtur. "Oksidatif stres" olarak adlandırılan bu durumun yukarıda bir kısmı belirtilen birçok hastalık ve moleküler bozukluğun etiopatogenezinde (hastalığın oluşum ve gelişim nedenleri) yer aldığı söylenebilir. Herhangi bir organizmadaki toplam oksidan seviyesi ve toplam antioksidan seviyesi (TAS) değerleri belirlenerek oksidatif stres indeksi (OSI) tespit edilmektedir. Oksidatif stres, organizmadaki nükleik asitler dâhil bütün moleküllerde birçok negatif etkilenmelere yol açarak bununla bağlantılı çeşitli hastalıklara neden olmaktadır.

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan 1,8-Cineole (1,8-sineol) (bir diğer ismi eucalyptol = ökaliptol) 1870 yılında F.S. Cloez tarafından tanımlanmış olup bileşik *Eucalyptus globulus* bitkisi uçucu yağının ana bileşeni olduğu için ona bu isim atfedilmiştir (Boland ve ark., 1991). Bazı türlerin esansiyel yağlarının % 90'dan

fazlasını 1,8-Cineole kapsamaktadır. Ayrıca kafur ağacı, defne yaprağı, çay ağacı, pelin bitkisi, tatlı fesleğen, biberiye, adaçayı, kenevir ve diğer aromatik bitki yapraklarında mevcuttur. Halkasal eter ve monoterpenoit olan 1,8-Cineole, renksiz sıvı bir doğal bileşiktir. Bileşiğin hoş çeşnili aroması ve tadından dolayı gıda ürünlerinde tat verici ve kozmetikte kullanılmaktadır. Ökalyptus yağı temelli 1,8-Cineole, fırınlanmış yiyecekler, pastacılık, et ürünleri ve meyve suları gibi birçok üründe çok düşük seviyede (% 0.002) tat verici olarak kullanılmaktadır (Harborne ve Baxter, 2001). Beş büyük sigara üreticisinin 1994 yılı verilerine göre 1,8-Cineole sigaradaki 599 katkıdan birisidir (Tobacco.org: Tobacco News and Information). Bu bileşiğin, tüketim malzemelerinde tadı geliştirdiği için ilave edildiği iddia edilmektedir. Enflamasyon (yangı) önleme özelliği ile 1,8-Cineole, aynı zamanda üst ve alt solunum yolları hastalıklarının tedavisinde uygulanır (Dorsam ve ark., 2014). Ayrıca 1,8-Cineole bir insektisit ve böcek kovar olarak kullanılmaktadır (Klocke ve ark., 1987; Sfara ve ark., 2009). Diğer taraftan bazı orkide arısı türlerinin erkeklerinde ise cezbedici olarak işlev görmektedir (Schiestl ve Roubik, 2003). Yapılan çalışmalarda limon ağacı uçucu yağının ana komponenti olan limonene, *Drosophila melanogaster*'da genotoksik aktivite göstermiştir (Fernandez-Bedmar ve ark., 2011). Limon otu (*Cymbopogon citratus*), şerbetçiotu, defne, mineçiçeği ve diğer faydalı bitkilerin uçucu yağlarında bulunan  $\beta$ -myrcene'in NTP (National Toxicology Program) tarafından yürütülen deneylerde *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'nin çeşitli suşlarında hiçbir genotoksik etki bulunmamıştır (National Toxicology P. 2010). Tıbbi ve baharat olarak kullanılan bitkilerin uçucu yağının ana bileşenlerinden biri olan safrole, *in vitro* insan HepG2 hücrelerinde ve farelerde anlamlı derecede hem sitotoksik hem de genotoksik etki göstermiştir. (Chiang ve ark, 2011).

Loi ve ark, (2008) 1,8-Cineole'un bitkiler üzerinde allelopatik (canlı ya da çürümüş bitki dokuları tarafından üretilen kimyasal maddelerin çevrelerindeki diğer bitkilerin gelişimine, çoğalmasına ve büyümesine olan olumsuz etki) etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Monoterpenoidlerle yapılan başka bir çalışmada *Salmonella/microsome* deneyi (TA97a, TA98, TA100 ve TA102 test ırklarında) sonuçlarına göre 1,8-Cineole'un herhangi bir mutajenik etkisi saptanmamıştır

(Gomes-Carneiro ve ark., 1998). Komet testi sonuçlarına göre kloroform ve 1,8-Cineole fare lenfoma hücrelerinde DNA hasar düzeyini artırmazken, tripan mavisi testi sonuçlarına göre güçlü sitotoksik etkiler ortaya çıkarmıştır (Ribeiro ve ark., 2006). İçerisinde 1,8-Cineole, kâfur alpha-pinene ve beta-caryophyllene gibi terpenoidler bulunan *Ricinis communis* yaprak özütü birçok insan tümör hücre hattında konsantrasyona bağlı tarzda sitotoksik etki göstermektedir. Ayrıca SK-MEL-28 insan melanoma hücrelerinde apoptozun indüklendiği çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir (Darmanin ve ark., 2009). *Achillea millefolium* (Civanperçemi) bitkisinden elde edilen ve içinde bir miktar 1,8-Cineole'unde bulunduğu aromatik yağın (chamazulene [%42.15], sabinene [%19.72], terpin-4-ol [%5.22], beta-caryophyllene [%4.44] ve ökaliptol [%3.10]) *Aspergillus nidulans* adlı mantarda mitotik rekombinasyon frekansında önemli artışlara neden olduğu bulunmuştur. Buradaki genotoksik etkinin bu yağ tarafından uyarılan mitotik non-disjunction veya crossing-over'dan kaynaklandığı ortaya atılmıştır (de Sant'anna ve ark., 2009). Yine ana bileşenin 1,8-Cineole (49%) olduğu *Eucalyptus globulus* yağının *Aspergillus nidulans* türü mantarda mitotik kararsızlığı artırdığı ortaya çıkmıştır. Esansiyel yağın genotoksitesinin mitotik crossing-over ya da kırılmış kromozomlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Miyamoto ve ark., 2009). T-butyl hydroperoxide (t-BOOH) tarafından indüklenen mutasyonlar üzerine myrcene, linalool ve 1,8-Cineole gibi monoterpen bileşiklerinin etkileri çeşitli hücrelerde farklı testlerle (*Escherichia coli* WP2 IC185 ırkı ve onun oxyR mutant IC202 ırkında geri mutasyon testi ve de ilaveten insan hepatoma HepG2 ve insan B lymphoid NC-NC hücrelerinde comet assay testleri ile) sınanmış olup anılan bileşiklerin oksidanlar tarafından indüklenen genotoksositeye karşı daha çok radikal süpürme aktivitesinden kaynaklanan koruyucu bir özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir (Mitić-Culafić ve ark., 2009). 1,8-Cineole dâhil monoterpenlerin radikal süpürücü etkinliğinden dolayı oksidatif mutagenezi azalttığı yönünde bulgular da vardır (Mimica-Dukić ve ark., 2010). Benzer bir çalışmada kâfur, thujone ve 1,8-Cineole'un hatasız DNA tamir işlevini uyardığı ve biyoantimutajen olarak rol altığı belirtilmiştir (Nikolić ve ark., 2011). İçinde 1,8-Cineole bulunan *Laurus nobilis* (defne) bitkisine ait yaprak esansiyel yağı ve tohum

yağı K562 (miyeloid lösemi) tümör hücre hattında hücrel proliferasyonu inhibe etmiştir (Saab ve ark., 2012).

Daha önce yapılan çalışmalardan da anlaşılacağı gibi, 1,8-Cineole'un yararlarının yanı sıra insan sağlığına çeşitli yollarla zarar verebileceği, özellikle genetik bozukluk ve hücre ölümlerine sebep olabileceği düşünülmektedir. Daha önce yapılan çalışmaların sonuçları dikkate alındığında 1,8-Cineole (ökaliptol) bileşiğinin genel olarak sitotoksik davranış sergilediği ancak herhangi bir genotoksik madde olup olmadığı konusunda tam bir görüş birliğinin oluşmadığı anlaşılmaktadır. İşte bu nedenlerden dolayı, planlanan çalışmada 1,8-Cineole (ökaliptol)'ün *in vitro* insan periferik lenfositlerinde kısa süreli akut genotoksik/sitotoksik etkisinin olup olmadığı ve oksidatif stres yapıcı yapmadığının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla kültüre alınmış *in vitro* periferik kan lenfositlerde kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile test maddesinin genotoksik olup olmadığı araştırılacaktır. Test maddesinin sitotoksik etkiye sahip olup olmadığı PI, MI ve NBI parametreleri hesaplanarak belirlenecektir. Ayrıca kan kültürü ortamının total oksidan ve total antioksidan seviyesi belirlenerek oksidatif stres indeksleri (OSI) saptanacaktır.





## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Uçucu Yağların Ana Bileşenleri ile Yapılmış Olan Genotoksisite Çalışmaları

#### 2.1.1. Anethole (Anetol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Anetol (anason kâfuru), tatlandırıcı bir madde olarak sık kullanılan organik bir bileşiktir. Bu ajan, doğada bitkilerde yaygın bulunan uçucu yağlarda var olan aromatik bileşik olan fenilpropenin bir türevidir (Fahlbusch ve ark., 2003). Sekizawa ve Shibamoto (1982) anetolün Ames/Salmonella reversiyon testinde mutajen özellik gösterdiğini fakat *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde ve *Escherichia coli* WP2 uvrA reversiyon testlerinde ise mutajenite göstermediğini bildirmişlerdir. Farklı bir çalışmada yeni doğmuş CD-1 farelerine 14 ay boyunca oral yolla farklı dozlarda verilmiş anetolün kanserojen olmadığı tespit edilmiştir (Miller ve ark., 1983). Howes ve ark. (1990) anetolün sıçan karaciğer hücrelerinde zamansız DNA sentezini (UDS) artırmadığı ve karaciğer kanserine neden olmadığını bildirmişlerdir. Kültüre alınmış fare hepatositlerinde UDS deneyi ile yapılan çalışmada anetol genotoksik bulunmamıştır (Hasheminejad ve Caldwell, 1994). Gorelick, (1995) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 98 ve TA 100 suşlarında yapılan mikrozom testi sonucu anetolün doza bağlı olarak mutasyon frekansını arttırmadığını, benzer şekilde Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde kromozom anormalliklerini uyarmadığını bildirmişlerdir.

Marshall ve ark. (1996) tarafından yapılan UDS deneyinde anetolün sıçan hepatositlerinde ortaya çıkardığı sitotoksisiteye rağmen genotoksik etki göstermediğini tespit etmişlerdir. Kim ve ark. (1999) anetolün sadece Salmonella test suşları için mutajenik olmadığını aynı zamanda CD-1 fare cilt papillomları ve B6C3f1 fare hepatomalarının indüklenmesinde kanserojen olduğunu tespit etmişlerdir. Anetolün olası antigenotoksisitesinin araştırıldığı farklı bir çalışmada farelere etkisi bilinen genotoksinlerin intraperitoneal yolla enjekte edilmesinden önce oral gavaj (sonda) yoluyla anetol (40-400 mg/kg) verilmiş ve hayvanlar anetol ile 2 ilâ 20 saat boyunca ön muameleye tabi tutulmuştur. Anetol ön muamelesinin,

sıçanlarda siklofosamid (CPH), prokarbazin (PCB), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ve üretana (URE) karşı önemli koruyucu (antigenotoksik) etkilere sahip olduğu anlaşılmıştır. Benzer olarak anetolün, etil metan sülfonat (EMS) genotoksisitesini inhibe etmesine rağmen tek başına belirgin bir genotoksik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir (Abraham ark., 2001).

### 2.1.2. $\beta$ -Myrcene (Mirsen) ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

$\beta$ -Mirsen, olefinik (alkenik) özellik gösteren doğal organik bileşiktir ve kesin olarak monoterpen olarak sınıflandırılan bir hidrokarbondur. Mirsen izopren dimerleri olan terpenlerin en önemlilerinden biridir. Aynı zamanda defne, kenevir, yabani kekik, maydanoz ve şerbetçiotu gibi çeşitli bitkilere ait uçucu yağların bir bileşenidir (Tinseth, 1993; Chyau ve ark., 1996; Orav ve ark., 2003). Kauderer ve ark. (1991) tarafından yapılan çalışmada  $\beta$ -mirsen (MYR) S9 mix varlığında ve yokluğunda 1000 mikrogram/mL (çözünübilirlik sınırı) derişimine kadar test edilmiş ve *in vitro* olarak insan lenfositlerinde kromozom anormalliklerini (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) uyarmamıştır. MYR muamelesine bağlı olarak ne mitotik indeks (MI) ne de proliferasyon indeksi (PI) düşmüş, fakat ajan insan lenfositlerinde siklofosamid (CP) tarafından uyarılan KKD ve V79 hücrelerinde CP'nin toksik ve mutajenik etkisini konsantrasyona bağlı bir şekilde azaltmıştır. Roscheisen ve ark. (1991) S9 mix ile aktive edilmiş indirekt mutajenlerin V79 hücrelerinde neden olduğu KKD üzerine MYR'nin koruyucu etkisini incelemişlerdir. Çalışmada siklofosamid (CP), benzo [a] piren (BP), aflatoksin B1 (AFB) ve 9,10-dimetil-1,2-benz [a] antrasen (DMBA) mutajenleri kullanılmıştır. MYR, CP ve AFB'nin neden olduğu KKD'yi etkili bir şekilde inhibe etmiş ancak BP ve DMBA ile indüklenen KKD üzerinde hiçbir etki göstermemiştir. Araştırmacılar aynı zamanda MYR'nin, karaciğer tümörü hücre hattında (HTC) CP kaynaklı KKD frekanslarını azalttığını rapor etmişlerdir. Zamith ve ark. (1993) MYR'nin Wistar sıçanlarına gavaj yoluyla (0.1, 0.5 ve 1.0 gr/kg) verilmesinden 24 saat sonra mitotik indekste (MI) doza bağlı bir artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu deneyde MYR kaynaklı klastojeniteye ait hiçbir kanıt elde edilmemiştir. Mevcut sonuçlar ve *in vitro* mutajenite testlerinin

önceki bulguları MYR'nin genotoksik potansiyelinin olmadığını göstermiştir. Başka bir çalışmada (Gomes-Carneiro ve ark., 2005) *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA98, TA97a ve TA1535 test suşlarında metabolik aktivasyon yokluğunda  $\beta$ -mirsenin mutajenik olmadığı bulunmuştur. Yine  $\beta$ -mirsenin mutasyonlara karşı baskılayıcı etkisinin olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Örnek olarak *Escherichia coli* WP2 suşu ve oxyR mutanlığı IC202 suşlarıyla yapılan geri mutasyon deneyinde ve insan hepatoma (Hep62) ve insan B lenfoid (NC-NC) hücrelerinde yapılan komet testinde  $\beta$ -mirsenin, t-bütül hidroperoksit (t-BOOH) tarafından indüklenen mutajenezi güçlü bir şekilde baskıladığı gösterilmiştir (Mitic-Culafic ve ark., 2009). Öte yandan NTP (Ulusal Toksikoloji Programı) tarafından yürütülen deneylerde  $\beta$ -mirsenin genotoksik olduğuna dair kanıt bulunmamıştır. Bu çalışmalarda herhangi bir metabolik ve dış aktivasyon olmadan gerçekleştirilen iki bağımsız Ames analizlerinde *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'nin çeşitli suşlarının hiçbirinde mutajenite gözlenmemiştir. Buna ek olarak 3 ay boyunca gavaj yoluyla  $\beta$ -mirsenin uygulanmış erkek ve dişi farelerde, mikronukleuslu normokromatik eritrositlerin ve kromozom hasarının sıklığı açısından önemli bir artışın olmadığı bildirilmiştir (National Toxicology Prog. 2010).

### 2.1.3. $\alpha$ -Terpinene (Terpinen) ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

İlgili grup terpenler olarak sınıflandırılan izomerik bir hidrokarbon grubudur. Bunlar aynı moleküler formüle sahip olmalarına rağmen karbon-karbon çift bağlarının pozisyonları yönünden farklılık gösterir.  $\alpha$ -terpinen bileşiği kakule ve mercanköşk yağları ve diğer doğal kaynaklardan izole edilmiştir (Dewick, 2002). Gomes-Carneiro ve ark. (2005), *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA98, TA97a ve TA1535 suşlarında  $\alpha$ -terpinenin mutajenik özellik göstermediğini bildirmişlerdir.

### 2.1.4. $\gamma$ -Terpinene Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

$\gamma$ -Terpinene çeşitli doğal bitki kaynaklardan izole edilmektedir. Karpouhtsis ve ark. (1998)  $\gamma$ -terpinenin *Drosophila* üzerinde insektisidal ve genotoksik etkiye sahip

olmadığını bildirmişlerdir. Aydın ve ark. (15)'nin, insan lenfositlerinde tek hücre jel elektroforezi yöntemiyle yaptıkları çalışmada  $\gamma$ -terpinenin 0.1 mM altındaki konsantrasyonlarda DNA ipliklerinde kırılmaya neden olmazken 0.2 mM konsantrasyonda DNA'da önemli zararlara neden olduğunu tespit etmişlerdir. Daha düşük derişimlerde ise bazı mutajenler (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) ve mitomisin C (MMC)) tarafından indüklenen DNA tek iplik kırıklarını azaltmıştır.

### 2.1.5. d-Limonene (Limonen) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Halkalı terpen olarak sınıflandırılan limonen renksiz sıvı bir hidrokarbondur. Daha yaygın olan d-izomeri güçlü bir portakal kokusuna sahiptir. d-Limonen bir terpenoid olan karvonun kimyasal sentezinde öncü ve temizlik ürünlerinde çözücü olarak kullanılır (Fahlbusch ve ark., 2003). Hard ve Whysner (1994) d-limonenin sadece yüksek konsantrasyonlarda erkek sıçanlarda alpha-2u globulin birikimiyle ilişkili nefropati gelişimine yol açarak böbrek tümörlerine neden olduğunu saptamışlar. Aksine dişi sıçan ve farelerde ise aynı dozun ne nefropatiye ne de buna bağlı böbrek tümörlerine neden olmadığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada erkek sıçanlarda d-limonenin genotoksik olmadığı, insanlarda da kanser riski göstermediği bulunmuştur (Whysner ve Williams, 1996). De Oliveira ve ark. (1997) phenobarbital muameleli sıçanların karaciğer hücrelerinden elde edilen ve CYP2B1 selektif markeri olan pentoxyresorufin O-dealkylase (PROD) aktivitesi üzerine d-limonen IC50'sinin 0.19  $\mu$ M olduğunu tespit etmişlerdir. Sekihashi ve ark. (2002) genotoksisitenin türler arasında farklı olup olmadığını anlayabilmek için komet deneyi ile fare ve sıçanların birden fazla organında karşılaştırmalı incelemeler yapmışlardır. Çalışmada fare ve sıçanlardan dörder grup alınarak intraperitoneal (karınzarı içi) veya oral yolla toksik olmayan ve farklı toksik bir belirti göstermeyen en yüksek dozda kimyasal ile hayvanlar muamele edilmiştir. Deneyde 2000 mg/kg derişimdeki kimyasalda ölüm gözlenmediğinden bu miktar komet çalışmasında en yüksek doz olarak seçilmiştir. Mide, kolon, karaciğer, böbrek, idrar kesesi, akciğer, beyin ve kemik iliği 3, 8 ve 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Test edilen

kimyasallar içinde benzil asetat, klorodibromometan ve p-kloro-o-toludinin farelerde karsinojenik iken sıçanlarda olmadığı ve anilin, azobenzen, o-fenilfenol, Na ve d-limonenin sıçanlarda karsinojenik olduğu fakat farelerde karsinojenik olmadığı tespit edilmiştir. Nesslany ve ark. (2007), erkek sıçanlarda böbrek hücrelerinde komet deneyi aracılığıyla genotoksik böbrek karsinojenleri (streptozotosin, aristolochic asitler, 2- nitroanisol, potasyum bromat ve sisplatin), renal epigenetik karsinojenler (d-limonene ve siklosporin) ve nefrotoksik bileşiklerin (treptomisin ve indometasin) etkileri araştırılmıştır. Hayvanlar intraperitoneal yolla, test bileşenleri ile muamele edildikten sonra 3-6 ve 22-26'ncı saatlerde 2 kez böbrek hücrelerinden örnek alınarak genotoksik etkileri ölçülmüştür. Böbrek ile ilgili bütün genotoksik karsinojenin hepsi açık bir şekilde doğrudan veya dolaylı olarak DNA göçünü artırırken (mutajenik), d-limonenin DNA göçünde herhangi bir anlamlı artışa neden olmadığı bulunmuştur.

Fernandez - Bedmar ve ark, (2011) *Drosophila melanogaster*, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile yaptıkları deneyde limonenin yüksek konsantrasyonlarda (0.73 mM) genotoksik aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca *Drosophila melanogaster* ve HL60 (Human promyelocytic leukemia cells) insan tümör hücresi hattında genotoksik oksitleyici olarak kullanılan hidrojen peroksitine karşı limonenin antigenotoksik aktivitesinin olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar son olarak yaşam süresi deneylerinde düşük konsantrasyonlardaki limonenin sirke sineği ömrü üzerinde olumlu bir etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Tek başına ve karışım halindeki terpenlerin (alfa-pinene, beta-pinene, carene, ve limonene) genotoksik yanıtlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada (Saverini ve ark., 2012) limonen Ames testinde tek başına geri mutasyon frekansında bir artışa neden olmamıştır. Aksine karışım halinde terpenler, metabolik aktivasyon varlığında TA100 suşunda geri mutasyon frekansında önemli artışa neden olmuştur. Komet testinde ise 1 saat süreyle tek başına limonen ile ve karışım halindeki terpenlerle muamele edilen V79 hücrelerindeki DNA hasarında kayda değer artışlar gösterilmiştir.

### 2.1.6. (+)- $\alpha$ -pinene (pinen) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

$\alpha$ -pinen, terpen sınıfına ait organik bir bileşik olup bileşenin iki izomerinden birisidir. Birçok iğne yapraklı ağaç türlerine özellikle de çama ait yağlarda bulunur. Aynı zamanda biberiye uçucu yağında da bulunur (Simonsen, 1957). Gomes-Carneiro ve ark. (2005) (+)- $\alpha$ -pinenin S9 mix varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA98, TA97a ve TA1535 suşlarında mutajenik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Gminski ve ark. (2010) insan akciğer alveolar epitelyal adenokarsinom (A549) hücrelerinde (+)- $\alpha$ -pinenin genotoksik etki göstermediğini komet testi ile ortaya koymuşlardır. Saverini ve ark. (2012) (+)- $\alpha$ -pinenin tek başına TA100 suşunun geri mutasyon frekansında bir artışa neden olmadığını, diğer terpenlerle (beta-pinene, carene, ve limonene) karışım halinde kullanıldığında ise metabolik aktivasyon varlığında TA100 suşunun geri mutasyon frekansında önemli artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada (Türkez ve Aydın, 2013) (+)- $\alpha$ -pinen ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmiş insan kan hücrelerindeki sitotoksisite LDH salınımı ve MTT testi ile tespit edilirken DNA hasarı da MN testi ve kromozomal aberasyon testi ile analiz edilmiştir. Ayrıca oksidatif etkiyi belirlemek için biyokimyasal parametreler olarak total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidan seviyesi (TOS) incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre (+)- $\alpha$ -pinen hücre canlılığını azaltmıştır. *In vitro* genotoksisite test sistemlerinde ise (+)- $\alpha$ -pinenin istatistiksel olarak önemli değişikliklere sebep olmadığı ancak TAS ve TOS düzeylerinde doza bağlı etkilere neden olduğu gözlenmiştir.

### 2.1.7. (+)-3-carene (karen) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Tatlı ve keskin bir kokuya sahip olan karen (veya delta-3-karen), terebentinin bir bileşeni olup doğal bisiklik bir monoterpendir (Granström, 2009). Silva ve ark. (2010) Brezilya biberinin ana bileşeni olan (+)-3-karene (% 55.43)'e maruz bırakılan *Salmonella typhimurium*'da belirgin biyokimyasal ve morfolojik değişimlerin olmadığını ve herhangi mutajen riskin gözlenmediğini bildirmişlerdir. Saverini ve ark. (2012) Salmonella/mikrozom testini kullanarak yaptıkları çalışmada (+)-3-karen

ajanının TA100 suşunda geri mutasyon frekansını artırmadığını, (+)-3-karenin (+)-a-pinen, beta-pinen ve limonen ile karışım halinde kullanıldığında ise metabolik aktivatör varlığında TA100 suşunda geri mutasyon frekansını önemli derecede artırdığını bildirmişlerdir.

#### 2.1.8. Citral (Sital) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Sital (3,7-dimetil-2,6-oktadienal veya lemonal)  $C_{10}H_{16}O$  molekül formülüne sahip olup E-izomeri geranial ya da sital A olarak, Z-izomeri neral ya da sital B olarak da bilinmektedir (Burdock, 2009). De Oliveira ve ark. (1997) tarafından yapılan ve sitalin PROD aktivitesi üzerine engelleyici etkisini araştıran çalışmanın sonuçlarına göre 1.19  $\mu M$  konsantrasyondaki sital, konsantrasyona bağlı olarak PROD aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada sital, *Salmonella typhimurium*'un bazı suşlarında (TA98, TA100, TA1535 ve TA1537) metabolik aktivasyonsuz mutajenik etki göstermemiştir. Çin hamster yumurtalık hücreleri kültüründe yapılan sitogenetik testlerde sital, S9 varlığında ve yokluğunda kardeş kromatid değişimini uyarmış ancak kromozom aberasyonlarında anlamlı bir artışa neden olmamıştır (National Toxicology Program, 2003). Sitalin insan lenfositlerinde sitotoksik (MTT testi) ve genotoksik potansiyelini araştıran (komet testi) çalışmanın (Sinha ve ark., 2014) sonuçlarına göre hücrelerde yüksek konsantrasyonlardaki sital sitotoksik ve genotoksik etki göstermiştir.

#### 2.1.9. S(+)-Carvone (Karvon) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Karvon terpenoidler ailenin bir üyesidir. Bileşen birçok uçucu yağ içinde doğal olarak bulunmakla birlikte en çok *Carum carvi* (karaman kimyonu) tohumu yağı ve dereotu yağında bulunur (de Carvalho ve da Fonseca, 2006). Stammati ve ark. (1999) antifungal aktivite gösteren S(+)-karvonun sitotoksisitesini ve genotoksisitesini değerlendirmek üzere mikroorganizmalarda ve memelilerde yaptıkları kısa süreli testler sonucunda, 0,9 mM karvonun doza bağlı olarak Hep-2 hücrelerinin canlılığını ve bölünmesini tamamen inhibe ettiği saptanmıştır. SOS kromo testte ise toksik



olmayan dozlardaki ajan DNA'ya zarar vermezken, DNA tamir testinde doza bağlı olarak belirgin bir toksisite göstermiştir.

#### 2.1.10. Citronellal (Sitronelal) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Sitronelal (veya rhodinal ya da 3,7-dimetilokt-6-en-1-al (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O)) bir monoterpenoidtir ve kendine özgü belirgin limon kokusu olan terpenoid bileşiği içerisindeki ana bileşendir. Sitronelal limonotu, limon kokulu zamk ve limon kokulu çay ağacı bitkilerinden damıtılmış yağların temel izolatıdır (Budavari ve Windholz, 1989). Sitronelal (1.56 µ M) muamelesinin, phenobarbital uygulanmış sıçanların karaciğer hücrelerinden ortaya çıkan PROD aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (De Oliveira ve ark., 1997).

#### 2.1.11. (-)+Camphor (Kâfur) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Kâfur, mumlu, yanıcı, beyaz veya güçlü bir aromatik kokusu olan şeffaf katı bir terpenoidtir. Bu terpenoid C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O kimyasal formülüne sahip olup Asya'da (özellikle Sumatra, Endonezya ve Borneo) bulunan büyük ve yaprak dökmeyen bir bitki olan kâfur ağacı odununda bulunmaktadır. Chang ve ark. (1998) tarafından kültüre alınmış insan fibroblastları üzerinde kâfurun sitotoksik ve genotoksik etkisini *in vitro* olarak propidyum iyodid floresan ve DNA presipitasyon testinin yapıldığı araştırmanın sonuçlarına göre kâfurun sitotoksik olduğu fakat genotoksik etki göstermediği bildirilmiştir. Hikiba ve ark. (2005) diş hekimliğinde kullanılan kâfurun Suriye Hamster Embriyo (SHE) hücrelerinde kromozomal anormallik sıklığında istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada DNA tamir yeteneğine sahip *Escherichia coli* K12 ve tamir yeteneği eksik MMR ve NER suşlarında ultraviyole (UV) ve 4NQO tarafından indüklenen mutajenez üzerine kâfur ve diğer bazı monoterpenlerin etkileri araştırılmıştır. Buna göre kâfur bileşiğinin tamir yeteneği olan suşlarda antimutajen potansiyelinin olduğunu ve kâfur ve 1,8-Cineole'un UV kaynaklı SOS tepkisini kontrole göre daha uzun süre sürdürdüğü bulunmuştur. Ayrıca kâfur recA730 ve recA(+) hücrelerinde

kendiliğinden ve UV'nin uyardığı rekombinasyonu arttırmıştır. 4NQO ile ön muamele edilmiş Vero hücrelerinde kâfur, komet analizi sonucunda kuyruk momentinde önemli azalmalara neden olmuş ancak daha yüksek konsantrasyonlarda DNA iplik kırılmalarına yol açmıştır (Nikolic ve ark., 2011).

### 2.1.12. Carvacrol (Karvakrol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Karvakrol ya da cymophenol ( $C_6H_3CH_3(OH)(C_3H_7)$ ) bir monoterpeneoid fenol bileşenidir. Karakteristik keskin bir kekik (*Origanum vulgare*) kokusuna sahiptir. Mercanköşk yağı, kekik yağı, turptan elde edilen yağ ve yabani bergamut uçucu yağı içinde karvakrol bulunmaktadır (De Vincenzi, 2004). Stamatii ve ark. (1999), antifungal aktivite gösteren karvakrolün konsantrasyona bağlı olarak 0,2 mM konsantrasyonda Hep-2 hücrelerinin canlılığını ve bölünmesini tamamen inhibe ettiğini, Ames testinde toksik olmayan dozlarda metabolik aktiviteye rağmen revertant sayısını artırdığını, SOS kromoteste ise DNA'ya hasar vermediğini bildirmiştir. Ayrıca araştırmacılar DNA tamir testinde karvakrolün toksik etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. İnsan lenfosit hücrelerinde MMC varlığında karvakrolün inhibitör etkileri test edilmiş, deney sonucunda elde edilen bulgulara göre karvakrolün bütün dozlarda KKD'yi arttırmadığı, hatta MMC'nin neden olduğu KKD'yi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak karvakrolün memeli hücrelerinde önemli bir antigenotoksik aktivite sergilediği bildirilmiştir (İpek ve ark., 2003). Azırak (2007) sıçan kemik iliği hücrelerinde karvakrolün tüm muamele sürelerinde ve konsantrasyonlarda kontrole göre kromozom anormalliği (KA) ve total KA sayısını önemli ölçüde artırdığını, mitotik indeksi (MI) kontrole göre önemli derecede düşürdüğünü bildirmiştir. Undeger ve ark. (2009) V79 Çin hamster akciğer fibroblast hücrelerinde yaptıkları farklı çalışmada, 1-4 saat arasında karvakrol (5mM) uygulamasıyla reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin hafifçe düştüğünü fakat 24 saat sonra en yüksek konsantrasyonda (100 mM) karvakrolün ROS üretimini artırdığı bildirilmiştir. Chan ve ark. (2013) *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde karvakrolün antimikrobiyal etki gösterdiğini fakat genotoksik etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Aydın ve ark. (2014) karvakrol ile muamele edilmiş sağlıklı sıçan nöronları ve N2a kanser hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda komet analizi sonucu DNA hasarı gösteren hücrelerin sayısının, her iki hücre tipinin kontrol değerlerinden önemli ölçüde fark göstermediğini bulmuşlardır. MTT deneyi sonuçlarında ise 200 mg/L ve 400 mg/L konsantrasyonlardaki karvakrol ile muamele edilmiş her iki hücre tipinde hücre çoğalma oranlarında önemli düşüşler göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar karvakrolün kültüre edilmiş primer sıçan nöronlarında total antioksidan kapasitesinde (TAC) artışa neden olduğunu fakat N2a hücrelerinde böyle bir etkinin görülmediğini, TOS düzeylerinin ise her iki hücre tipinde de arttığını bildirmişlerdir.

### **2.1.13. Ellagic Acid (Ellajik Asit) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları**

Ellajik asit çok sayıda meyve ve sebzelerde bulunan doğal fenolik bir antioksidandır. Ellajik asitin antiproliferatif ve antioksidan özellikleri onu sağlık açısından önemli bir yere koymaktadır (Seeram ve ark., 2005). Kuo ve ark. (1992) Salmonella test sisteminde ve Chinese Hamster Ovaryum (CHO) hücrelerinde 1-nitropyrene ve 1,6-dinitropyrenin oluşturduğu genotoksik etkiye karşı ellajik asitin çok zayıf bir antigenotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Thresiamma ve ark. (1998) ellajik asitin fare lenfositlerinde radyasyon sonucu oluşan DNA kırıklarını ve kromozom hasarlarını inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Barta ve ark. (2006) çeşitli kısa süreli testler kullanarak yaptıkları çalışmalarda aflatoxin B1 (AFB1), 2-amino-3-metylimidazo[4,5,-f] chinolin (IQ) ve N-nitroso- N-metylurea (MNU) mutajenlerinden kaynaklanan mutajenite ve immün sistemin baskılanmasına karşı ellajik asitin net bir antimutajenik ve immün sistemi düzenleyici etki gösterdiğini bulmuşlardır. Sıçan periferik lenfositlerinde 3mM konsantrasyonda nikotinin oluşturduğu toksisiteye karşı beş farklı konsantrasyonda (10, 50, 100, 150 ve 300 mM) verilen ellajik asitin bütün konsantrasyonlarında koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir (Sudheer ve ark., 2007). Rehman ve ark. (2012) tarafından yapılan benzer bir çalışmada albino sıçanlar öncelikli olarak oral yolla 50 ve 100 mg/kg ellajik asit ile devamında intraperitoneal yolla 50 mg/kg siklofosamid (CP) ile

muamele edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre ellajik asit albino sıçanı böbrek hücrelerinde MN oluşumunu ve DNA fragmentasyonu faaliyetlerini önemli düzeylerde azaltmıştır.

#### 2.1.14. Estragole (Estragol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Estragol (p-allilanol, metil kavikol) doğal bir organik fenilpropen bileşiğidir. Kimyasal yapısı bir benzen halkasından ibarettir. Bu çift bağın konumu göre farklı bir anetol izomeridir. Renksiz bir sıvıdır ancak saf olmayan örnekler sarı görülebilir. Estragol terebentin (çam yağı) dâhil anason, rezene, defne, tarhun ve fesleğen olmak üzere çeşitli ağaç ve bitkinin önemli bileşenidir (Fahlbusch ve ark., 2003). Sekizawa ve Shibamoto (1982) estragol (ES) ile yaptıkları çalışmada metabolik aktivasyon (S9) bulunmayan ortamda *Bacillus subtilis* DNA tamir testi ve *Escherichia coli* WPR uvrA reversiyon testlerine göre bileşiğin mutajen olmadığını bildirmişlerdir. Howes ve ark. (1990) primer kültür içerisinde yeni izole edilmiş fare hepatositlerinde zamansız DNA sentezini (UDS) indüklemek için kanserojenik ve kanserojen olmayan ajanların bir dizi yeteneğini ortaya çıkarmak için yaptıkları çalışmada estragolün sıçan karaciğer hücrelerinde UDS'yi indükleyerek karaciğer kanserine neden olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada Chan ve Caldwell (1992) estragolün sıçanların karaciğer hücrelerinde zamansız DNA sentezi (UDS)'ne neden olduğunu tespit etmişlerdir. Qato ve Guenther (1995) estragolün fare karaciğer hücrelerinde kanserojen olduğunu ve DNA adüktlerine (ekleni) neden olduğunu tespit etmişlerdir. Zhou ve ark. (2007) estragolün insan hepatomu (HepG2) hücrelerinde DNA'yı değiştirme yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Suzuki ve ark. (2012a) dişi farelerinin karaciğerinde estragol kaynaklı DNA ekleni düzeylerinin en yüksek doz hariç tüm dozlarda erkek farelerden daha yüksek oranda olduğunu ve 75 mg/kg dozunda estragolün dişilerde gpt (Glutamik piruvat transaminaz) geninin mutasyon frekansını anlamlı derecede arttırdığını bulmuşlardır. Hâlbuki MN testinde bütün gruplarda herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Grubun başka bir çalışmasında sıçanlarda yüksek miktarda verilen estragolün olası genotoksik hepatokarsinojen olabileceğini bildirmişlerdir (Suzuki ve ark., 2012b).

Oda ve ark. (2012) tarafından yapılan bir başka çalışmada estragol, *Salmonella*'nın NM7003 suşunda güçlü bir genotoksisite sergilemiştir. Martins ve ark. (2012) V79 hücrelerinde S9 varlığında estragolün KKD artışına neden olduğunu bulmuşlar ve alkalın komet testinde ise S9 yokluğunda DNA ipliklerinin kırıldığını gösteren pozitif sonuçlar elde etmişlerdir. Ding ve ark. (2014) komet testi, MN testi ve DNA adduct testini kullanarak F344 sıçanları üzerinde yaptıkları deneylerde sıçanlara 300, 600 ve 1000 mg/kg konsantrasyonlarda estragol içeren mısır yağı gavaj yoluyla verilmiş ve estragolün MN oluşturmadığı ve DNA hasarına neden olmadığı bildirilmiştir.

### 2.1.15. Eugenol (Öjenol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Öjenol bir fenilpropan bileşiği ve fenilpropanoid sınıfı kimyasal bileşiklerin bir üyesidir. Özellikle karanfil yağı, küçük hindistan cevizi yağı, tarçın, fesleğen ve defne yaprağı uçucu yağlarından elde edilen soluk sarı, renksiz yağlı bir sıvıdır. Öjenol karanfil tomurcuğu yağında % 80-90 ve karanfil yaprağı yağında ise % 82-88 konsantrasyonlarda mevcuttur (Barnes ve ark., 2007). Sekizawa ve Shibamoto (1982) öjenolün Ames *Salmonella* ve *Escherichia coli* WP2 uvrA reversiyon testlerinde mutajenik etki göstermediğini fakat S9 yokluğunda *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde mutajenik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Howes ve ark. (1990) öjenolün sıçan karaciğer hücrelerinde zamansız DNA sentezine neden olmadığını bildirmişlerdir. Abraham ve ark. (2001) öjenolün farelerde siklofoamid (CP), benzo [a] piren (BP), aflatoksin B1 (AFB) ve 9,10-dimetil-1,2-benz [a] antrasen (DMBA) gibi genotoksinlere karşı antigenotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hikiba ve ark. (2005) SHE hücrelerinde öjenolün kromozomal anormallik sayısını istatistiksel olarak önemli derecede artırdığını bildirmişlerdir. Munerato ve ark. (2005) somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile öjenolün *Drosophila melanogaster*'de gözlenen genotoksisiteden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. V79 hücrelerinde kromozom aberasyonu testi ile yapılan başka bir çalışmada Maralhas ve ark. (2006) tarafından öjenolün 2500 mM konsantrasyonda KA'yı anlamlı derecede artırdığı daha yüksek konsantrasyonlarda sitotoksisiteye neden olduğu ve

topoizomeraz II enzimini inhibe edici aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ding ve ark. (2011) öjenolün etkisini sıçanların çeşitli organlarında komet assay yöntemiyle incelemişler ve öjenolün sıçanlarda DNA hasarını uyardığını bildirmişlerdir. Martins ve ark. (2011) tarafından komet yöntemi ile yapılan öjenol çalışmasında test maddesinin DNA zincirinde kırılmalara neden olduğu, gamma-H2AX test yöntemi ile de ise çift iplik kırılmalarına yol açtığını bildirmişlerdir. *In vitro* memeli hücrelerinde yapılan genotoksisite çalışmalarında öjenolün sitotoksisite gösterdiği ve MN'yi indüklediği tespit edilmiştir (Fowler ve ark., 2012).

#### **2.1.16. Geraniol (Geraniyol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları**

Geraniol bir monoterpenoid ve alkoldür. Gül yağı, palmarosa yağı ve sitronella (Java tipi) yağlarının başlıca bileşenidir. Ayrıca, sardunya, limon ve diğer birçok uçucu yağlar içinde küçük miktarlarda bulunmaktadır. Geraniol berrak soluk sarı renkli bir yağ görünümünde olup çok yaygın organik çözücülerde çözünmesine rağmen suda çözünmez (Budavari ve Windholz, 1989). Sinha ve ark. (2014) insan lenfositlerinde komet ve MTT testlerini kullanarak yaptıkları çalışmada geraniyolün yüksek dozlarda genotoksik ve sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

#### **2.1.17. Linalool (Linalol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları**

Linalol birçok çiçek ve baharat bitkisinde bolca bulunan doğal bir terpendir. Aynı zamanda  $\beta$ -linalol, linalil alkol, linaloyl oksit, p-linalol, allo-ocimenol ve 3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-ol gibi adlarıyla da anılmaktadır (Ohwa ve ark., 1986). Mitic-Culafic ve ark. (2009) geri mutasyon testi ile *Escherichia coli* WP2 suşu ve oxyR mutantı IC202'yi ve hücrelerinde komet testi ile insan hepatoma Hep62 ve insan B lenfoid NC-NC hücrelerinde genotoksisiteye karşı linalolün koruyucu etkisini saptamışlardır. IC202 suşlarında linaloolün, t-booh kaynaklı mutagenesi güçlü bir şekilde baskıladığı ve NC-NC hücrelerinde t-BOOH'un neden olduğu DNA hasarını %50, HepG2 hücrelerinde ise DNA hasarını %30 oranında azalttığını bildirmişlerdir. İnsan lenfositlerinde yapılan bir başka çalışmada Di Sotto ve ark. (2011) linolün

genotoksik etki göstermediğini ve nükleoplazmik köprü veya nükleer tomurcukların sıklığında bir artışa neden olmadığını bildirmişlerdir.

Coelho ve ark. (2013) antidepresan olarak verdikleri linalolün farelerde kuyruk süspansiyon testini (TST, depresyon testi) kullanarak yaptıkları değerlendirmede ajanın stres önleyici benzeri bir etki gösterdiğini gözlemişlerdir. Aynı araştırmacılar genotoksik ve antigenotoksik etkileri saptayabilmek için kan ve beyinde alkalın komet testini yapmışlardır. Test sonucunda her iki dokuda da DNA hasarında herhangi bir artış olmadığını, ajanın beyin dokusu ve periferik kandaki DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermediğini bildirmişlerdir.

#### **2.1.18. Menthol (Mentol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları**

Organik bir bileşik olan mentol yabani nane, nane veya benzer bitki yağlarından ya da sentetik olarak elde edilmektedir. Mentol mumsu, kristal yapıda, berrak veya beyaz renkte olup oda sıcaklığında katı, bunun biraz üzerindeki sıcaklıklarda eriyen bir bileşendir. Mentol lokal anestetik ve karşı tahriş edici ilaç (bir bölgedeki tahrişi hafifletme için başka bir bölgede tahriş yaratan ilaç) niteliklerine sahip ve yaygın hafif boğaz tahrişini rahatlatmak için kullanılır. Mentol aynı zamanda, zayıf kappa opioid reseptör agonisti (uyaranı) olarak görev yapmaktadır (Eccles, 1994). Murthy ve ark. (1991) mentolün insan periferik lenfositlerinde S9 varlığı ve yokluğuna bağlı olmaksızın KKD frekansını etkilemediği ve DNA hasarına da neden olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Gomes-Carneiro ve ark. (1998) tarafından yapılan *Salmonella*/mikrozom testinde mentol, *Salmonella typhimurium*'un TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşlarında S9 metabolik aktivatör varlığında veya yokluğunda revertant koloni sayısını artırmamıştır.

#### **2.1.19. Safrole (Safrol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları**

Bir fenilpropen olan safrol, sassafras bitkisi kök kabuğundan veya meyvesinden izole edilir ya da katekolden sentezlenebilir. Renksiz ya da hafif sarı,

tipik olarak yağlı bir sıvıdır. Kahverengi kafur yağının ana bileşenidir ve doğal pestisit fonksiyonuna sahip bitkilerin büyük bir çoğunluğunda az miktarda bulunur (Perkin ve Trikojus, 1927). Sekizawa ve Shibamoto (1982), safrolün Ames/Salmonella reversiyon testinde ve S9 yokluğunda *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde pozitif, *Escherichia coli* WP2 uvrA reversiyon testinde ise negatif sonuç gösterdiğini bildirmişlerdir. Howes ve ark. (1990) safrolün sıçan karaciğerinde UDS'yi artırdığını ve dolayısıyla kemirgenlerde karaciğer kanserine sebep olduğunu açıklamışlardır. Karaciğer kanserinin nedenlerinden biri olarak bilinen safrolün erkek Fischer 344 sıçanlarında sitotoksik etki göstermediği fakat dişi B6C3F1 karaciğer hücrelerinde 10 ile 500 µM arasındaki konsantrasyonlarda UDS'ye neden olduğunu ortaya konmuştur (Burkey ve ark., 2000). Kevekordes ve ark. (2001) S9 mix varlığında safrolün insan lensofitlerinde ve HepG2 hücrelerinde mikronükleus oluşturmadığını bildirmişlerdir. Chiang ve ark. (2011) safrolün *in vitro* insan HepG2 hücrelerinde ve farelerde anlamlı derecede hem sitotoksositeye hem de mikronükleus oluşumuna ve DNA zincir kırıklarına neden olduğunu bulmuşlardır. F344 sıçanları üzerinde yapılan başka bir çalışmada safrolün erkek sıçanlarda renal toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (Jin ve ark., 2011).

#### 2.1.20. Tannic Acid (Tannik Asit) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Tannik asit bir polifenol çeşidi olan tanenin özel bir ticari formudur. Yapısındaki çok sayıda fenol gruplarından dolayı zayıf asit özelliğindedir. Ticari tannik asitin kimyasal formülü  $C_{76}H_{52}O_{46}$  olarak verilmektedir (Chen ve ark., 2009). Kuo ve ark. (1992) göre tannik asit, *Salmonella typhimurium*'un TA 98 suşunda 1-nitropyrene- (1-NP) ve 1,6-dinitropyrene (1,6- DNP) ajanlarının neden olduğu mutajenik etkiyi güçlü bir şekilde azaltmıştır. Ayrıca CHO hücrelerinde, 1-NP ve 1,6-DNP'in oluşturduğu KKD sayısını ve sitotoksositeyi doza bağlı olarak önemli derecede düşürdüğünü bildirmişlerdir. Buyukleyla ve ark. (2012) tannik asitin tek başına ve bilinen bir mutajen olan EMS ile karışım halindeyken KA'yı indüklediğini fakat tek başına KKD'yi uyarmadığını, EMS ile karışım halindeyken sinerjik olarak KKD'ye neden olduğunu tespit etmişlerdir. İlave olarak tek başına ve EMS ile



karışım halinde kullanıldığında MN oluşumu üzerinde net bir etkisinin gözlenmediğini ayrıca mitotik indeks ve çekirdek bölünme indekslerini azaltarak sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

### 2.1.21. Thymol (Timol) Bileşeni ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Doğal bir monoterpenik fenol ve simen türevi olan timol (2-izopropil-5-metilfenol olarak da bilinir)  $C_{10}H_{14}O$  formülündeki karvakrol ile izomerdir. Kekik yağı, kekik bitkisi (*Thymus vulgaris*) ve başka bitkilerde bulunan beyaz kristalli, güçlü antiseptik özelliğe sahip hoş kokulu bileşendir. Ayrıca timol *T. vulgaris* bitkisinden kekik olarak üretilen ve güçlü bir lezzet sağlayan baharattır (Zarrini ve ark., 2010). Azizan ve Blevins (1995) timolün mutajenik etkisini, *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 98 ve TA 100 suşlarında S9 mix varlığında ve yokluğunda 20 dakikalık ön inkübasyonu ile incelemiş ve sonuç olarak timolün mutajenik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Stammati ve ark. (1999) memelilerde ve mikroorganizmalarda konsantrasyona bağlı olarak 0,7 mM konsantrasyondaki timolün Hep-2 hücrelerinin canlılığını ve bölünmesini tamamen inhibe ettiğini, Ames testinde toksik olmayan dozlarda metabolik aktivasyon varlığında revertantların sayısını artırdığını, SOS kromoteste ise toksik olmayan dozlarda DNA'ya zarar vermediği ancak DNA tamir testinde doza bağlı olarak belirgin bir toksisite gösterdiği bildirilmiştir. Hikiba ve ark. (2005), Syrian hamster embryo (SHE) hücrelerinde 520  $\mu$ M konsantrasyondaki timolün sitotoksik özellik gösterdiği bu dozun altındaki konsantrasyonlarda kromozom aberasyon seviyesinde artışların meydana gelmediği, eksojen metabolik aktivatör varlığında ise 130  $\mu$ M ve üstündeki konsantrasyonlarda kromozom aberasyonu seviyesinde istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğunu bildirmişlerdir. Aydın ve ark. (2005), insan periferik lenfositlerinde komet jel elektroforezi yöntemi ile yaptıkları çalışmada timolün yaklaşık 0.1 mM konsantrasyonlarda DNA ipliklerinde kırılmaya neden olmadığını, 0.2 mM konsantrasyonda ise DNA'da önemli zararlara neden olduğunu ayrıca timolün düşük konsantrasyonlarda IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline) ve MMC'nin neden olduğu DNA zararlarını azalttığını ortaya koymuşlardır. Azırak (2007) sıçan

kemik iliği hücrelerinde timolün genel olarak tüm muamele sürelerinde (6, 12, 24 saat) ve konsantrasyonlarda sayısal ve yapısal olarak KA oluşumunu kontrole göre önemli ölçüde artırdığını bildirmiştir. Timolün insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 25, 50, 75 ve 100 µg/mL'lik dozlar 24 ve 48 saatlik muamele süreleri denenmiştir. Ajan özellikle düşük konsantrasyonlarda, KKD sayısını istatistiksel olarak önemli derecede artırırken yüksek konsantrasyonlarda KKD sayısını artırmış ancak önemli bulunmamıştır. Diğer taraftan timol bütün konsantrasyonlarda hem yapısal KA sayısını hem de MN oluşumunu indüklemiş, sayısal KA oluşumunu ise artırmamıştır (Büyükleyla, 2007). V79 Çin hamsteri akciğer fibroblast hücreleri timolün 1, 5 ve 25 mM konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve sadece 25 mM konsantrasyondaki timolün komet testinde bazı klastojenik DNA hasarları meydana getirdiği bulunmuştur. ROS oluşumu ise timol (1-100 mM) varlığında nispeten azalmıştır. Ayrıca timol doza bağlı olarak ılımlı bir antioksidan aktivitesi göstermiştir (Undeger ve ark., 2009). Archana ve ark., (2011) CH V79 hücrelerinde timol ön muamelesinin apoptotik fraksiyon seviyesinde azalma meydana getirdiği ve radyasyona bağlı mitokondri membran potansiyeli (MMP) düşüşü ve ilaveten genotoksisiteyi baskıladığını ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada timol ile ön muamelelerin insan hepatokarsinoma hücre hattında cıva klorür (HgCl<sub>2</sub>) kaynaklı genotoksisiteyi, mitokondriyal membran depolarizasyonunu, oksidatif stresi ve mitokondriyal süperoksit düzeylerini inhibe ettiği ifade edilmiştir (Shettigar ve ark., 2014). Llana-Ruiz ve ark. (2014) Ames Salmonella testinde timolün herhangi bir konsantrasyonda mutajenik aktivite göstermediğini, standart komet testi kullanılarak insan karsinoma hücre hattı Caco-2 ile yapılan çalışmada ise timolün herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

### **2.1.22. Test Maddesi 1,8-Cineole (Eucalyptol = ökaliptol) Bileşeni ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları**

Siklik eter ve monoterpenoid olan 1,8-Cineole sıvı ve renksiz doğal bir organik bileşiktir. Ökaliptol, 1,8-cineole, cineol, cajepitol, 1,8-epoksi-p-mentan, 1,8-oksido-

p-mentan, ökaliptol, 3,3-trimetil-2-oksabisiklo [2.2.2] oktan gibi bir takım sinonimleriyle de tanınmaktadır. Bileşen *Eucalyptus globulus* yağında yoğun olarak bulunmakta olup ilk defa 1870 yılında, F.S. Cloez tarafından tespit edilmiş ve ökaliptol (1,8-Cineole) olarak adlandırılmıştır. 1,8-Cineole, ökaliptus esansiyel yağlarının %90'dan fazlasını kapsamaktadır. Ayrıca kafur, defne yaprağı, çay ağacı, misk otu, fesleğen, pelin, biberiye, adaçayı, kenevir ve diğer aromatik bitki yapraklarında bulunur. Tipik birçok uçucu yağlar gibi 1,8-Cineole de çok düşük konsantrasyonda gıdalarda tat verici ve ilaç maddesi olarak kullanılabilmesine rağmen normalden daha fazla yutulduğunda toksik etki gösterir (Harborne ve Baxter, 2001).

*Salmonella typhimurium* TA100, TA97A, TA98 ve TA102 suşlarında S9 metabolik aktivasyonu varlığında ökaliptusun ana bileşeni olan 1,8-Cineole'un herhangi bir mutasyona sebep olmadığı tespit edilmiştir (Gomes-Carneiro, 1998). 1,8-Cineole, insan lösemi Molt 4B ve HL-60 hücrelerinde apoptozu uyarmışken insan mide kanserini KATO III hücrelerinde uyarmamıştır. Uygulanan 1,8-Cineole konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak, Molt 4B ve HL-60 hücrelerinde apoptozun temel karakteristiği olan oligonukleozomal boyuttaki DNA fragmentasyonları ortaya çıkmıştır (Moteki ve ark., 2002). Komet testi sonuçlarına göre kloroform ve 1,8-Cineole fare lenfoma hücrelerinde DNA hasar düzeyini artırmazken, tripan mavisi testi sonuçlarına göre güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Ribeiro ve ark., 2006). İnsan lösemi (K562) hücreleriyle yapılan bir çalışmada 1,8-Cineole'un DNA üzerine ne hasar verici ne de koruyucu etkisi bulunmamıştır (Horvathova ve ark., 2007). *Escherichia coli* WP2 suşu ve oxyR mutanıtı IC202'de geri mutasyon testi ve insan hepatoma Hep62 ve insan B lenfoid NC-NC hücrelerinde komet testi kullanılarak yapılan çalışmalarda, t-bütül hidroperoksit (t-BOOH) tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı 1,8-Cineole'un sadece IC202 suşunda spontan mutagenezi orta derecede baskıladığı bulunmuştur. Ek olarak NC-NC hücrelerinde t-BOOH'un neden olduğu DNA hasarını azaltmada az bir etki gösterdiği ve HepG2 hücrelerinde ise DNA hasarını %40 oranında azalttığı bildirilmiştir (Mitic-Culafic ve ark., 2009). Nikolic ve ark., (2011) 1,8-Cineole'un de dâhil bazı bitkisel monoterpenlerin antigenotoksik potansiyelini ve

DNA tamiri üzerine olan etkilerini saptamak amacıyla ökaryotik ve prokaryotik hücrelerle yaptıkları çalışmalarda tamir yeteneği olan suşlarda UV ve 4NQO ile indüklenen mutageneze karşı 1,8-Cineole'un antimutajen potansiyeli olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar aynı zamanda 1,8-Cineole'un, recA730 mutantında spontan ve UV kaynaklı rekombinasyonu arttırdığını, Vero hücrelerinde 4NQO kaynaklı mutagenezde önemli bir azalmaya neden olurken yüksek konsantrasyonlarda DNA ipliklerinde kırılmalara yol açtığını bildirmişlerdir. İnsan kolon kanseri hücrelerinde yapılan alkalın komet deneyinde 1,8-Cineole konsantrasyonu artışına bağlı olarak oksidatif DNA hasarında önemli artışların saptandığı bildirilmiştir. DNA hasarının oluşmasına neden olan doz aralığında 1,8-Cineole kolon kanseri hücrelerinin canlılığını azaltmadığı gibi hücre döngüsünü de etkilememiştir. Aynı araştırmacılar 1,8-Cineole'un hamster hücre hatlarında oksidatif DNA hasarı ve DNA çift iplik kırıklarını indüklediğini bildirmişlerdir (Dorsam ve ark., 2015).



### 3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmadaki deneylerin tamamı *in vitro* koşullarda yapılmıştır. Çalışmada test maddesi olarak bir monoterpenoid olan 1,8-Cineole (Eucalyptol), deney materyali olarak da sigara içmeyen yaşları birbirinin aynı (22 yaşlarında) sağlıklı ve gönüllü iki bayan ve iki erkekten alınan periferik kan kullanılmıştır.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

###### 3.1.1.1. 1,8-Cineole (Eucalyptol - Ökalyptol)

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan 1,8-cineole(1,8-sineol) halkasal yapıda bir eter ve monoterpenoit olup, renksiz ve sıvı bir bileşiktir. Bu bileşik 1,8-cineole, 1,8-cineol, cajepitol, 1,8-epoxy-p-menthane, 1,8-oxido-p-menthane, eucalyptol, eucalyptole, 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2,2,2]octane, cineole, cineol gibi isimlerle de bilinmektedir.

Test maddesi bitkilerde doğal ve yaygın bir bileşik olup bazı türlere ait esansiyel yağlarının % 90'dan fazlasını kapsamaktadır. Ayrıca kafur ağacı, defne yaprağı, çay ağacı, pelin bitkisi, tatlı fesleğen, biberiye, adaçayı, kenevir ve diğer aromatik (hoş kokulu) bitki yapraklarında mevcuttur. Ökalyptus yağının fraksiyonel destilasyonu ile % 99.6 - 99.8 saflıkta 1,8-Cineole elde edilmektedir. Bu bileşik çeşnili ve ferahlatıcı bir tada sahiptir. Suda çözülmez ancak eter, etanol ve kloroform ile karışabilir.

1,8-Cineole antiseptikler, burun spreyi, ağız yıkama suyu, öksürük şurubu, ilaçlı pastiller gibi birçok ilacın bileşeni olarak, ayrıca diş macunu, aromaterapi yağları gibi kişisel bakım ürünlerinde de katkı olarak kullanılır. Bileşiğin hoş çeşnili aroması ve tadından dolayı şekerçilik, pastacılık, unlu mamuller, içecekler ve et ürünleri gibi birçok üründe tat verici olarak kullanılmaktadır.

**3.1.1.1.(1). 1,8-Cineole'ün Kimyasal Özellikleri**

**Sistemik isim:** 1,3,3-Trimetil-2-oxabicyclo(2,2,2)-octane

**CAS kayıt no:** 470-82-6

**Üretici firma:** Merck

**Kapalı Formülü:** C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O

**Açık Formülü:** Şekil 3.1.

**Molekül Ağırlığı:** 154.25 g/mol

**Yoğunluğu:** 0.925 g/cm (20 °C)

**Erime Sıcaklığı:** 1.5 °C

**Kaynama Sıcaklığı:** 174 - 177 °C

**Alevlenme Noktası:** 49 °C

**Çözünürlük:** 3.5 g/l (21 °C)

**Fiziksel Durumu:** Renksiz sıvı

**Sıçanlarda Oral LD<sub>50</sub>:** 2480 mg/kg



Şekil 3.1. 1,8- Cineole(Ökalyptol)'un açık formülü

**3.1.1.2. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd)**

BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. BrdUrd eriyiği bidistile su içerisinde hazırlanmış daha sonra 0.2 µm

por çapındaki membran filtre (Sartorius marka) ile steril edilmiştir. Bu eriyikten kültür tüplerine son konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir.

**Kimyasal adı:** 5'-Bromo-2'-deoxyuridine

**Kapalı formülü:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

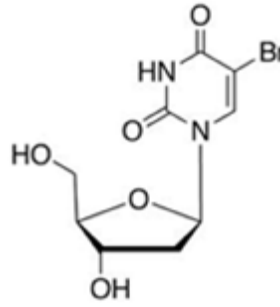
**Açık formülü:** Şekil 3.2.

**Molekül ağırlığı:** 307.10 g/mol

**Erime noktası:** 191-194°C

**CAS No:** 59-14-3

**Sigma No:** B 5002



Şekil 3.2. BrdUrd'in açık formülü

### 3.1.1.3. Sitokalsin B (Sigma)

Mikronukleus (MN) testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nukleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır (6 µg/mL). 5 mg cytokalsin B'yi 9 mL %50'lik alkolde çözerek stok çözelti elde edilmiştir.

**Kimyasal adı:** Cytochalasin B

**Kapalı formülü:** C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub>

**Açık formülü:** Şekil 3.3.

**Molekül ağırlığı:** 479.61 g/mol

**Erime noktası:** 218-223°C

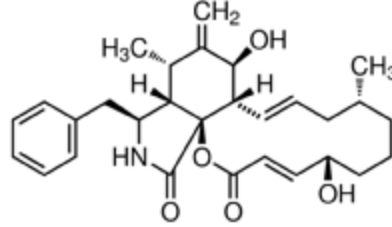
**Kaynama noktası:** 218-223°C

**Safılık düzeyi:** %98



**CAS No:** 14930-9

**Sigma No:** C-6762



Şekil 3.3. Sitokalsin B'nin açık formülü

#### 3.1.1.4. Entellan (Merck No: 7961)

Entellan, çeşitli sentetik reçinelerden oluşan, şeffaf, akıcı, kuruduktan sonra hava kabarcığı oluşturmayan preparat kapatma solüsyonudur. Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine daimi olarak yapıştırılmasında kullanılmıştır.

#### 3.1.1.5. Etil Alkol (Sigma No: 32205)

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan 1,8-Cineole etil alkol içerisinde erimektedir. Test maddesi %70'lik etil alkol içerisinde eritilmiş ve deneyde kullanılacak konsantrasyonlarda test maddesi hazırlanmıştır. Çözücü kontrol tüplerine 3 µl/2,7 ml olacak şekilde sadece %70'lik etanol ilave edilmiştir.

#### 3.1.1.6. Fiksatif

Kardeş kromatid değişimi (KKD) ve kromozom anormalliği (KA) deneylerinde 1 hacim asetik asitin 3 hacim metil alkol ile karıştırılması sonucu hazırlanan Carnoy fiksatifi kullanılmıştır. MN deneyleri için iki farklı fiksatif kullanılmıştır. İlk fiksatif; 1 kısım glacial asetik asit 5 kısım metanol ile karıştırıldıktan sonra elde edilen karışım 1/1 oranında %0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle (1:5:6) hazırlanmıştır. İkinci fiksatif; yukarıda anılan 1/5 glacial asit/alkol karışımı NaCl ilave edilmeden kullanılmıştır. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış

ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanmış ve +4°C’de saklanmıştır.

#### **3.1.1.7. Giemsa (Merck No: 9204)**

Alman mikrobiyolog Gustav Giemsa tarafından ilk defa bulunan Giemsa boyası DNA’daki fosfat grubu için spesifik olup DNA’nın adenin-timin yoğunluğu yüksek bölgelerine fazlaca bağlanır. Aynı zamanda kromozom bantlama (G-bantlama) uygulamalarında da kullanılmaktadır. Giemsa solüsyonu; metilen mavisi, eozin ve azure B’nin gliserol ve metanol içinde hazırlanmış bir karışımıdır. Preparatların boyanmasında kullanılan giemsa boyası hazır olarak alınmıştır. Sorensen tamponu içinde %5’lik olarak hazırlanan boya eriyiği, filtre edilmiş, %5’lik giemsa kromozomları ve mikronukleus testinde nukleusları boyamak için kullanılmıştır.

#### **3.1.1.8. Hipotonik Eriyik**

Çalışmada %0.4’lük KCl (Merck No: P9333) hipotonik eriyik olarak kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı cam kap içerisinde buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınmış, inkübatörde 37°C’ye kadar ısıtılarak kullanılmıştır. Bu çözeltinin yoğunluğu hücrenin plazmasından daha az olduğu için lenfositlerin su alarak şişmesini ve preparasyonun kaliteli olmasını sağlamaktadır.

#### **3.1.1.9. Kolşisin (Sigma No: C9754)**

Kolşisin saf kristal tuz halinde (Colchicine) temin edilmiştir. Bu kimyasal bir alkaloid olup kromozom preparatlarının hazırlanmasında metafaz bloklayıcı mitotik bir zehir (iğ ipliği teşekkülünü engelleyici) olarak kullanılmaktadır. Kolşisin eriyiği saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/mL) 2.5 mL’lik kromozom medyumuna inkübasyonun sona

ermesinden iki saat önce ilave edilmiştir. Kolşisine ait ayrıntılı teknik özellikler aşağıda verilmiştir.

**Kimyasal adı:** Colchicine

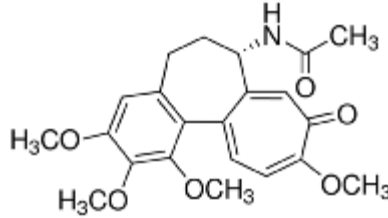
**Kapalı formülü:** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>

**Açık formülü:** Şekil 3.4.

**Molekül ağırlığı:** 399.4

**Etil asetat içeriği:** %3.4

**Kloroform içeriği:** < %0.1



Şekil 3.4. Kolşisin'in açık formülü

#### 3.1.1.10. Kromozom Medyumu (PB-Max No: 12552-013)

Bu çalışmada Gibco firmasının ürettiği kromozom medyumu hücre kültürü için kullanılmıştır. PB-Max medyumu tam medyumdur. PB-Max içerisinde fetal buzağı serumu, L-glutamine, gentamicin sulfat ve phytohemagglutinin bulunmaktadır. Bu medyum steril kültür tüplerine 2.5 mL olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır.

#### 3.1.1.11. Mitomisin C (MMC) (Sigma No: Y0000378)

Mitomisin C (Sigma), bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok Mitomisin C steril saf suda çözülerek elde edilmiş olup, kültürde son hacmi 0.25 µg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir.

**Kimyasal adı:** 6-Amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8a-methoxy-5-methyl-azirino[2',3':3,4] pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dionecarbamate (ester)

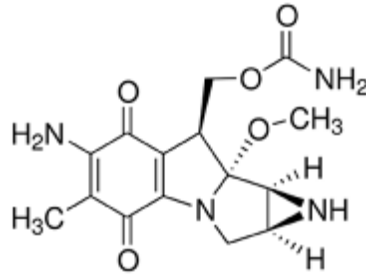
**Kapalı formülü:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**Açık formülü:** Şekil 3.5.

**Molekül ağırlığı:** 334.33 g/mol

**Erime noktası:** >360°C

**CAS No:** 50-07-7



Şekil 3.5. Mitomycin C'nin açık formülü

### 3.1.1.12. Nitrik Asit (HNO<sub>3</sub> Sigma 438073)

Nitrik asit kuvvetli bir asittir ve HNO<sub>3</sub> formülüyle gösterilir. Konsantrasyonu arttıkça daha tehlikeli olur. Sitogenetik çalışmalarında lamları temizlemek amacıyla 1 N HNO<sub>3</sub> çözelti kullanılmıştır. Laboratuvarında kapalı plastik bir kaptaki saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

### 3.1.1.13. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Ortamın pH dengesini ayarlamak için kullanılan bu tampon, kardeş kromatid değişimini incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar tampon karışımı içerisinde ultraviyole (UV) lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır.

Bu eriyik, Tampon A ve Tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış ve çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

**Hazırlanışı:**

**Tampon A:** 11.34 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  250 mL saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

**Tampon B:** 14.83 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  250 mL saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

**3.1.1.14. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği**

Bu solusyon için 11.05 gr tri-sodyum sitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) tartılarak bir miktar saf su içerisinde eritilmiştir. Daha sonra 21.9 gr NaCl tartılarak yine saf su içerisinde ancak ayrı bir kaptan eritilmiştir. İki eriyik, bir şişeye dökülerek iyice karıştırılmış ve üzerine 500 mL oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu stok eriyik  $5 \times \text{SSC}$ 'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. KKD'yi incelemek için deney yapılırken bu stoktan 20 mL alınarak üzeri 100 mL oluncaya kadar saf su ile tamamlanmış ve elde edilen  $1 \times \text{SSC}$  eriyiği kullanılmıştır.

**3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları****3.1.2.1. Flow Kabin (Steril Kabin)**

Kromozom medyumunu hücre kültür tüplerine paylaşırma, kan ekimi, test eriyiklerini hazırlama ve kültür tüplerine ilavesi sırasında steril ortamın sağlanması için, % 99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip,  $1500 \text{ m}^3/\text{h}$  emiş kapasiteli, UV ve floresan lambası olan ve çalışma alanı şeffaf cam paravanla sınırlandırılmış LABORMED marka flow kabin kullanılmıştır.

**3.1.2.2. Hassas Terazi**

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki Gec Avery marka terazi katı kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

### 3.1.2.3. İnkübatör

Kan kültürlerinin inkübasyonunda ve eriyiklerin 37 °C'de sabit tutulmasında 0 - 100 °C ayarlanabilir Incucell marka inkübatör kullanılmıştır.

### 3.1.2.4. Mikroskop

Koordinat cetveli, immersiyon objektifi ve kamera monte aparatı olan Olympus marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine aynı mikroskopta dijital fotoğraf makinası ile çekilmiştir.

### 3.1.2.5. Otoklav

Kullanılan ekipmanların ve eriyiklerin steril edilmesi Hirayama marka otoklav ile sağlanmıştır. Sterilizasyon, 121 °C sıcaklık ve 1.2 atm basınçta 20 dk. sürede gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.2.6. Santrifüj

Çalışmada kanın şekilli elemanlarını çöktürebilmek için rotor çapı 21 cm olan ve 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli Hettic Universal marka santrifüj kullanılmıştır.

### 3.1.2.7. Su Banyosu

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin belirli sıcaklıklarda (58 - 60°C) sabit kalmasını sağlamak amacıyla zaman ayarlı BM 302 Nüve marka su banyosu kullanılmıştır.

### 3.1.3. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamlar 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

### 3.1.4. Sterilizasyon

#### 3.1.4.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu

BrdUrd eriyiği steril bir cam kap içinde (erlen) bulunan ve steril olan saf su içinde 5'- bromo-2'-deoxyuridine maddesinin eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu eriyik steril şartlarda por çapı 0.2 µm olan bakteri filtresinden (Sartorius, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir. Sonra vida kapaklı steril cam tüplere konulan bu eriyik, etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak buzdolabında saklanmıştır.

#### 3.1.4.2. Saf Suyun Sterilizasyonu

Bazı stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan steril suyun hazırlanması için 100 mL'lik damıtık su, temiz vida kapaklı bir kültür şişesine doldurularak şişe ağzı pamukla iyice kapatılmıştır. Sterilizasyon esnasında otoklavdaki buhardan pamuğun ıslanmaması için üzeri alüminyum folyo ile örtülmüştür. Şişedeki saf su otoklavda 1.2 atm buhar basıncında ve 120°C'de 20 dk. steril edilmiştir.

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İnceleme

Bu tür çalışmaların planlama, uygulama ve yorumlanmasında uluslararası yönergelere uygun hareket edilme zorunluluğu bulunmaktadır. Bundan dolayı test maddesi 1,8-Cineol'un insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırıldığı bu çalışmada, Albertini ve ark. (2000)'ları tarafından yayınlanan Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı (The International Programme on Chemical Safety = IPCS) yönergesi dikkate alınmıştır.

##### 3.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Bu çalışmada KKD ve KA'ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması Evans (1984), Perry ve Thompson (1984)'un metotlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Aynı yaşta (22 yaşında), sağlıklı, gönüllü ve sigara içmeyen iki bayan ve iki erkekten alınan 1/10 heparinize edilmiş periferik kanın 0.2 mL'si 2.5 mL kromozom medyumuna (PB-Max) ilave edilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Kanın ilavesinden hemen sonra tüplere son konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde steril 5-bromo-2-deoksiuridin ilave edilerek 37°C'deki inkübatörde 72 saat kültüre alınmıştır. Test maddesinin ön çalışma sonucu belirlenen toksik olmayan dört konsantrasyonu (0.07, 0.14, 0.21 ve 0.28 µL/mL) etil alkolde çözülerek toplam hacim 3 µL olacak şekilde, kültürün başlangıcından 48 veya 24 saat sonra tüplere ilave edilmiş ve hücrelerin test maddesiyle 24 veya 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. Ayrıca çözücü veya pozitif kontrol tüplerine de kültürün bitiminden 24 veya 48 saat önce etil alkol (%70'lik 3 µL/2.7 mL) veya MMC (0.25 µg/mL) ilave edilmişlerdir. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) hücreleri metafazda durdurmak için her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden (0.06 µg/mL) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe



sallanarak iyice karıştırılmıştır. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde tüplerdeki hücreler 2000 devir/dk (rpm)'da 5 dk. süreyle açılır başlıklı santrifüjde santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Süpernatant (üst faz), total oksidan ve total antioksidan seviyeleri (TOS ve TAS) ölçümü için sızdırmaz plastik tüplere aktarılmış ve -80 °C'de saklanmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 mL'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra üstüne ılık (37°C) hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Hücrelerde kümeleşmeyi engellemek için hipotonik eriyik ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır. Her tüpe 5 mL hipotonik eriyik (%0,4 KCl) ilave edildikten sonra kapatılarak 8 dk. süresince inkübatörde 37°C'de hücrelerin şişmeleri sağlanmıştır. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 1200 devir/dk santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Ardından soğuk fiksatif (1/3, asetik asit/metanol) damla damla ve karıştırarak her tüpe yaklaşık 5 mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 10 dk. çöktürülmüş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem benzer şekilde toplamda 3 kere tekrarlanmış ve 3. fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam edilmiştir. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 mL sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pipet içine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pastör pipeti ile daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamların üzerine 50 cm yükseklikten farklı alanlara hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

### 3.2.1.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtülecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatılmıştır. Işınlama eriyiği, 5 mL tampon A, 5 mL tampon B'den alınıp bu karışımın destile su ile 100 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk. ışınlanmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58-60°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce %5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır. %5'lik Giemsa boyası, 5 mL tampon A, 5 mL tampon B ve 5 mL Giemsa'nın karıştırılarak üzerleri 85 mL saf su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzülmüştür. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC eriyiğinden alınarak direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 30 dk. boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürede sağlanmıştır). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra lamalar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Kromozom aberasyonu (KA) inceleme preparatlarının boyanmasında yine %5'lik Giemsa solüsyonu 10 dk. süreyle kullanılmıştır. Sonraki işlemler KKD preparatlarında yapılanlarla aynıdır.

Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak kalıcı hale getirilmiştir.

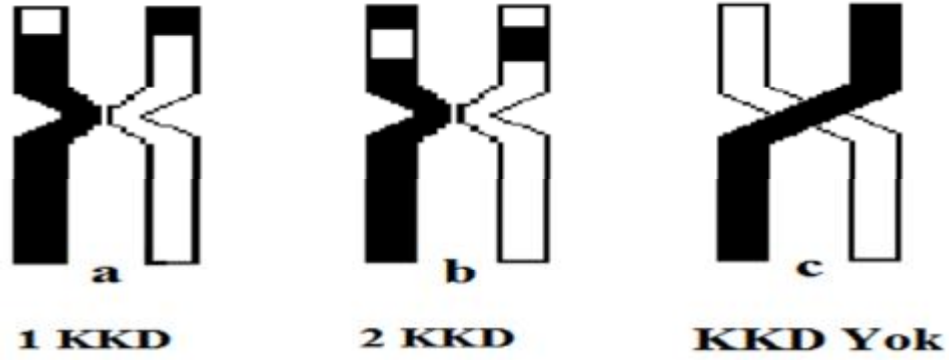
### 3.2.1.3. Daimi Preparatlarda KKD İnceleme

Hazırlanmış olan kalıcı preparatlar Olympus CX21 marka ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ( $10 \times 100 = 1000$  büyütme) ile incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD) ve kromozomal anormallikler belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır. Bu incelemeler sonucunda proliferasyon indeksi (PI) saptanmıştır.

### 3.2.1.4. Kardeş Kromatid Değişimi Sayısının (KKD) ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması

#### 3.2.1.4.(1). Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Sayısının Saptanması

Kardeş kromatid değişimi sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 metafazda (4 kişiden toplam 100 hücrede) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990). Uçtan parça değişimi olmuş ise bu 1 KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.6.a), benzer şekilde ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu 2 KKD olarak değerlendirilmiş (Şekil 3.6.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.6.c).



Şekil 3.6. a: 1 KKD, b: 2 KKD, c: KKD Yok. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).

### 3.2.1.4.(2). Replikasyon (Proliferasyon) İndeksi (RI=PI)'nin Saptanması

Test maddesinin DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile PI bulunmuştur. Bunun için tesadüfi seçilmiş 100 metafaz incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkarak her bir kişinin kan kültüründeki PI şu şekilde hesaplanmıştır:

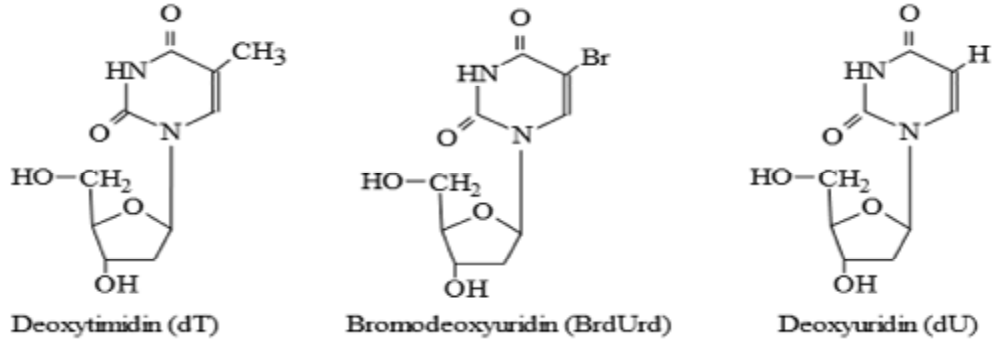
$$PI = \frac{1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)}{100}$$

*M1*: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

*M2*: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

*M3*: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı

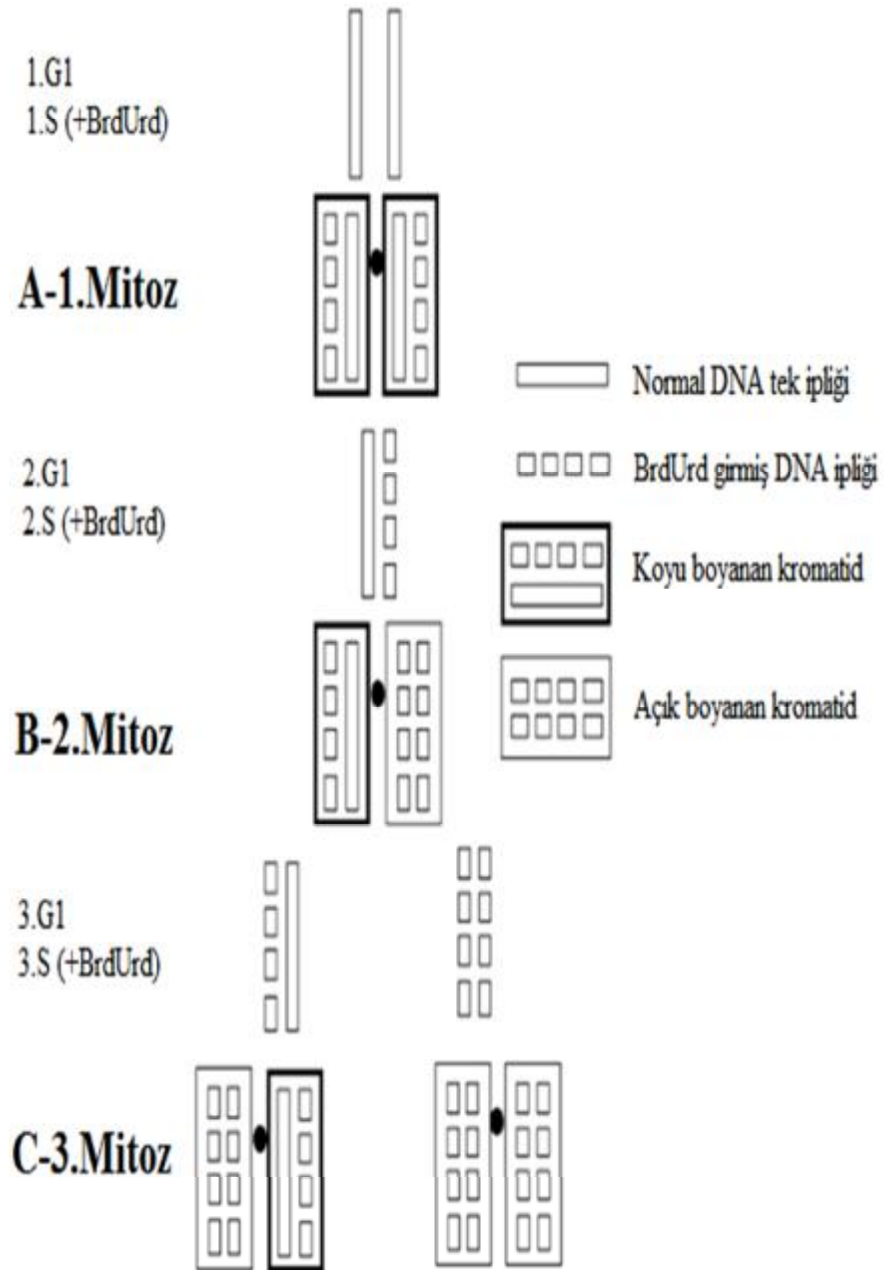
BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT'de CH<sub>3</sub>, BrdUrd'de Br ve dU'de H atomudur (Şekil 3.7).



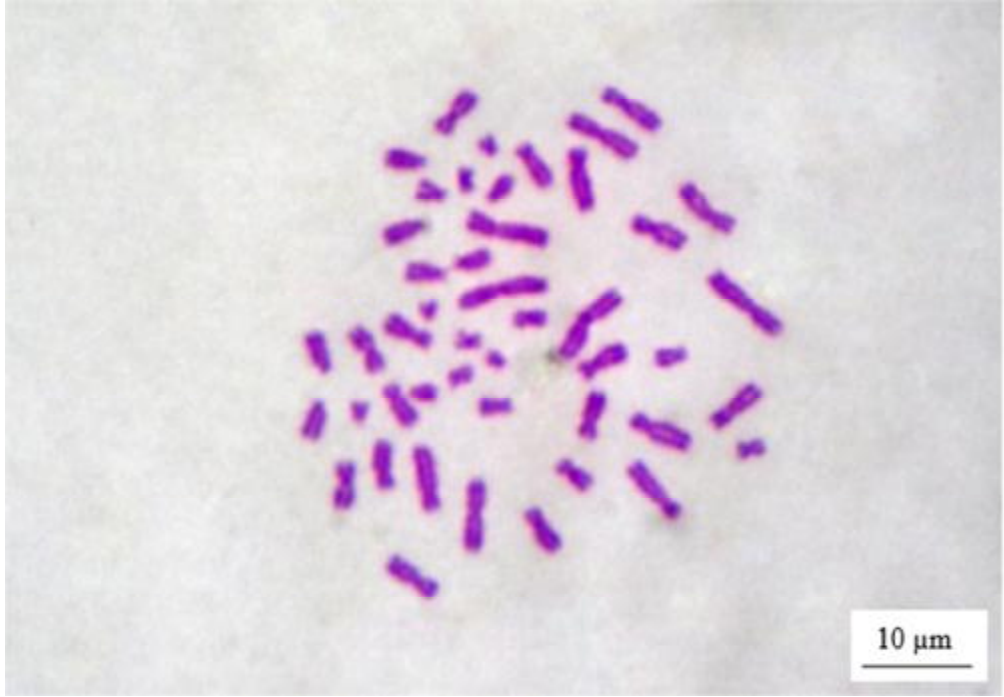
Şekil 3.7. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin(dU)'in kimyasal yapıları.

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazının analogu olduğundan kültür ortamına BrdUrd eklendikten sonraki DNA replikasyonları esnada (birinci S fazında) yeni sentezlenen polinukleotid ipliği içine timin yerine ortamda bulunan BrdUrd girecektir. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (BrdUrd/dT // dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.8 A ve Şekil 3.9). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd bulunan ortamda ikinci S fazı) adenin içeren polinukleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde yine timin yerine BrdUrd bulunacaktır. Bu iki polinukleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (BrdUrd/dT) oluşturacaktır. BrdUrd içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan her iki polinukleotid ipliği de BrdUrd içereceğinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır (BrdUrd/BrdUrd). İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/dT (koyu renkli) // BrdUrd/BrdUrd (açık renkli)). Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.8 B ve Şekil 3.10). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd bulunan ortamda üçüncü S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden (BrdUrd/BrdUrd) tüm polinukleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd // BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise

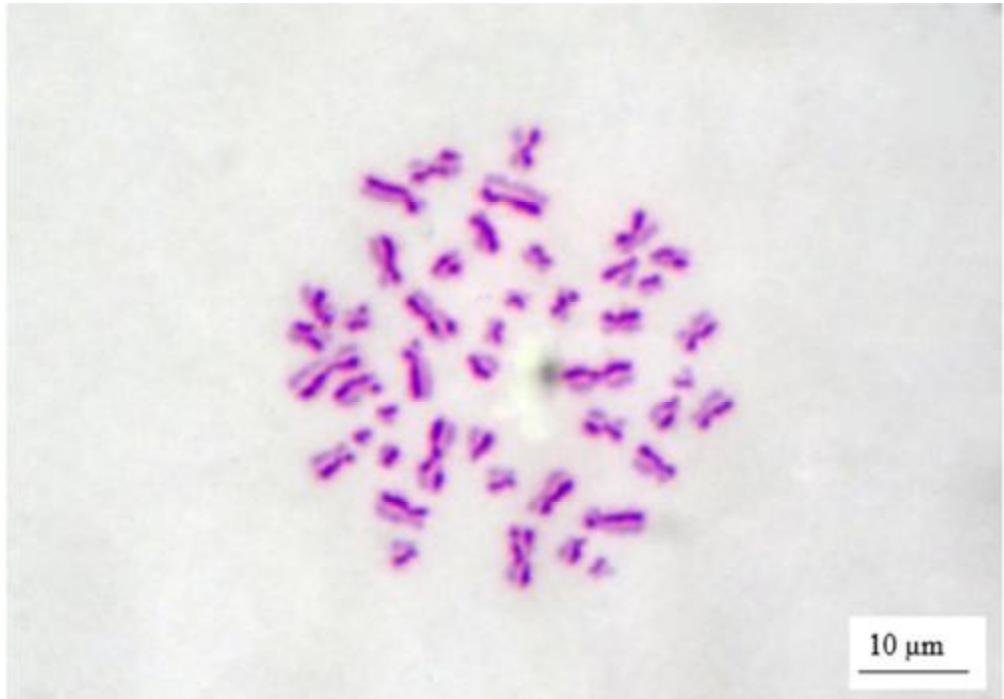
(dT/BrdUrd), bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğer kromatidinin bir ipliği timinli diğer ipliği BrdUrd'li olan bir kromozom (BrdUrd/BrdUrd // dT/BrdUrd) oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi açık renkte, diğer kromatidi koyu renkte olacaktır. BrdUrd'li ortamda hücre kültürüne devam edilirse DNA'daki timin yerine analog olan BrdUrd girmeye devam edeceğinden böyle hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğer kromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.8 C ve Şekil 3.11). İşte bu şekilde birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, 100 hücre içinde bu hücrelerin sayısı saptanmış ve elde edilen veriler kullanılarak yukarıdaki formüle göre proliferasyon indeksi (PI) hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. BrdUrd'nin DNA yapısına girmesi ile birinci (A), ikinci (B) ve üçüncü mitoz (C) bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During, 1985; Topaktaş ve Speit, 1990'dan).



Şekil 3.9. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).



Şekil 3.10. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).





Şekil 3.11. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).

### 3.2.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

#### 3.2.2.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip 100 metafaz (4 kişiden toplam 400 metafaz) kromozomal anormallikleri saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır (Paz-y-Mino ve ark., 2002). İncelenen bu 100 hücre içinde hücre başına düşen yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerinin sayısı ile anormallik içeren hücrelerin yüzdesi (KA/hücre) bulunmuştur. Bu çalışmada gap (açık renk kromatid bölgesi) anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gap ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar arasındaki fark, Kauderer ve ark. (1991) göre kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğine eşit veya ondan daha azdır.

Kırıklarda ise boyanmamış bölge kromatidin genişliğinden daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları ayrı ayrı saptanmıştır. Mace ve ark. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarıyla belgelemiştir. Bu çalışmada kromatid kırığı ve tek kol birleşmesi gibi anormallikler kromatid tipi anormallik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kromozom kırığı, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi, halka kromozom ve disentrik kromozom oluşumu gibi anormallikler de kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması**

1,8-Cineole'un mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile mitotik indeks bulunmuştur. Bunun için her muameleye ait preparatlardan toplam 3.000 hücre (4 kişide toplam 12.000 hücre) incelenmiş ve bunlar arasındaki metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. 3.000 hücre içerisinde metafazların oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks saptanmıştır.

### **3.2.3 Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İncelemeler**

#### **3.2.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması**

Mikronukleus sayısını saptamak için Rothfuss ve ark. (2000)'nın tarafından geliştirilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları aynı (22 yaş) sağlıklı ve gönüllü iki bayan ve iki erkekten alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri 2.5 mL'lik kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 mL) ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Hücre kültürü inkübatörde  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat için inkübe edilmiştir. 1,8-Cineol'un etkisini incelemek için, daha önce belirlenmiş olan konsantrasyonlardaki (0.07, 0.14 ve 0.21 ve 0.28  $\mu\text{l/mL}$ ) 1,8-Cineole kültür tüplerine ilave edilerek hücrelerin 24 veya 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. İki nukleuslu hücre oluşumunu sağlamak

için kültürün 44. saatinde bütün tüplere 6 µg/mL olacak şekilde sitokalsin B ilave edilmiştir. Ayrıca çözücü (etil alkol) ve pozitif (0.25 µg/mL MMC) kontrol tüplerine de kültürün bitmesinden 24 veya 48 saat önce etil alkol (%70'lik, 3 µl/2.7 mL) ve MMC (0.25 µg/mL) ilave edilmiştir. Kültür süresinin bitiminde (68. saat) kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 mL'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere ılık (37°C) hipotonik eriyik (5mL) yavaş yavaş ilave edilerek 5 dk. süreyle 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 1200 devir/dakika santrifüj edilip çöktürülerek süpernatant atılmıştır. Ardından her bir tüpe yaklaşık 5 mL soğuk fiksatif yavaş yavaş ve karıştırarak ilave edilmiştir. İlk fiksatif; 1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol karışımının 1/1 oranında %0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 15 dk. bu fiksatifle muamele edilen hücreler 1200 devir/dak. 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere ilkinden farklı bir fiksatif (1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol) ilave edilerek bu işlem iki kere daha tekrarlanmıştır. Her fiksatif ilavesinden sonra santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 mL sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra tüpün dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir. Daha sonra hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamlar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

### 3.2.3.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile boyanmıştır. 5 mL tampon A, 5 mL tampon B ve 5 mL Giemsa karıştırılmış üzerleri 100 mL oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak %5'lik Giemsa boyası hazırlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzülmüştür. Preparatlar direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 8 dk. boya içerisinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan alınıp üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

Entellan kuruduktan sonra bu kalıcı preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

### 3.2.3.3. Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan kalıcı preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda 40'lık objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). Bu incelemeler sırasında hazırlanan her bir preparattan 1000 adet iki nukleuslu (4 kişiden toplam 4000 binükleer) hücre incelenmiş, bu iki nukleuslu hücreler içerisinden mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Mikronukleuslu binükleer hücre sayısı toplam binükleer hücre sayısına oranlanarak Mikronukleuslu binükleer hücre yüzdesi bulunmuştur. Ayrıca hazırlanan her bir preparattan 1000 tane hücre sayılmış, bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nukleuslu olan hücrelerin sayıları kaydedilmiştir (Şekil 3.12, Şekil 3.13). Bu orandan yola çıkarak Nukleus Bölünme İndeksi (NBI) hesaplanmıştır (Fenech, 2000). Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır;

$$\text{NBI} = (1 \times \text{N1} + 2 \times \text{N2} + 3 \times \text{N3} + 4 \times \text{N4}) / \text{N}$$

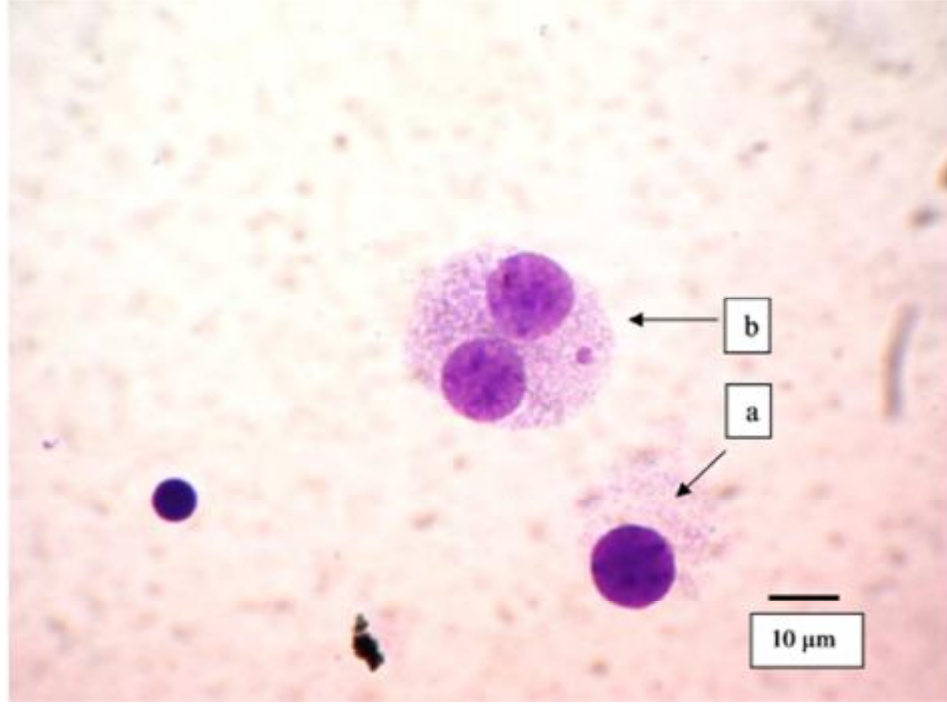
N1: Bir nukleuslu hücre sayısı

N2: İki nukleuslu hücre sayısı

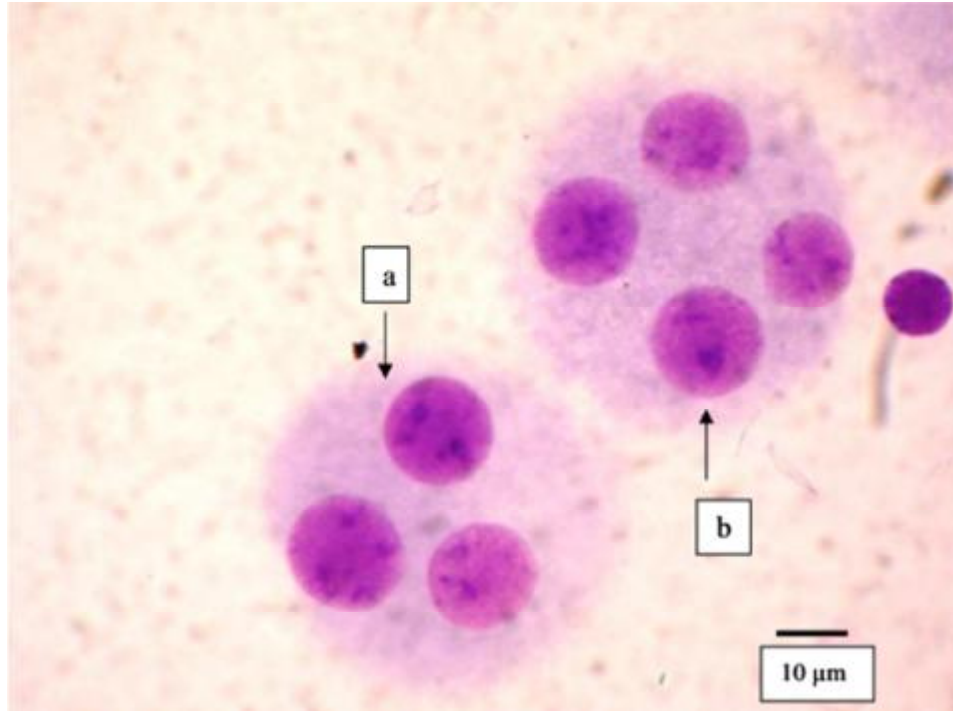
N3: Üç nukleuslu hücre sayısı

N4: Dört nukleuslu hücre sayısı

N: Sayılan toplam hücre



Şekil 3.12. Bir (a) ve iki (b) nükleus içeren hücreler (x400).



Şekil 3.13. Üç (a) ve dört (b) nükleus içeren hücreler (x400).

### 3.2.4. Toplam Oksidan (TOS) ve Antioksidan Seviyesi (TAS) Ölçümü

TOS ve TAS ölçümü için 72 saat muamele edilmiş hücre kültürlerinin ilk santrifüjünden sonra alınan ve -80 °C'de saklanan süpernatantlar kullanılmıştır. TOS değerlerinin ölçülmesi, numune içindeki mevcut oksidanların, divalent demiri (ferrous iyon =  $Fe^{+2}$ ) trivalent demire (ferric iyon =  $Fe^{+3}$ ) okside etme esasına dayanmaktadır. Ferrik iyon asidik bir mediumda kromojenle renkli bir kompleks oluşturur. Örnekte var olan oksitleyici moleküllerin miktarıyla orantılı olan bu renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Test hidrojen peroksit ile kalibre edilmekte olup sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğer ( $\mu\text{mol}$  eşdeğeri  $H_2O_2/L$ ) şeklinde ifade edilmektedir (Erel, 2005).

TAS değerlerinin belirlenmesi ise oldukça kararlı bir yapıda ve karakteristik bir renkte olan ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit)) radikal kationunun antioksidanlar tarafından renginin ağartılması esasına dayanmaktadır. Sonuçlar  $\text{mmol Trolox eşdeğeri/L}$  olarak ifade edilmektedir (Erel, 2004). Oksidatif stres indeksi (OSI) ise şu şekilde hesaplanmaktadır:  $OSI (\text{rastgele ünit}) = TOS (\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ eşdeğeri/L}) / TAS (\mu\text{mol Trolox eşdeğeri/L})$  (Harma ve ark, 2003; Kösecik ve ark, 2005; Yumru ve ark,2009). TOS ve TAS ölçümleri, ticari faaliyet gösteren Baran Medikal (Ankara) (ISO 14001:2004 Çevre Yönetim Standardı sertifikasına sahip, Sertif. No: T14.001.09) laboratuvarlarına hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi Olympus marka trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesinde 1000 büyütmede yapılmıştır (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel). Bu çalışmada KKD testinde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin, KA testinde sık rastlanan ve ilginç anormalliklerin, mikronukleuslu binukleer hücrelerin ve 1, 2, 3, 4 nukleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

**3.2.6. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi**

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KKD, KA, PI, MI, MN ve NBI parametrelerine ait verilerin normal dağılıp gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov (K-S) testi ile kontrol edilmiştir. KKD, KA, PI, MI, MN, NBI ve OSI parametrelerine ait verilerin istatistik analizleri Anova Dunnet Testi ile yapılmıştır.

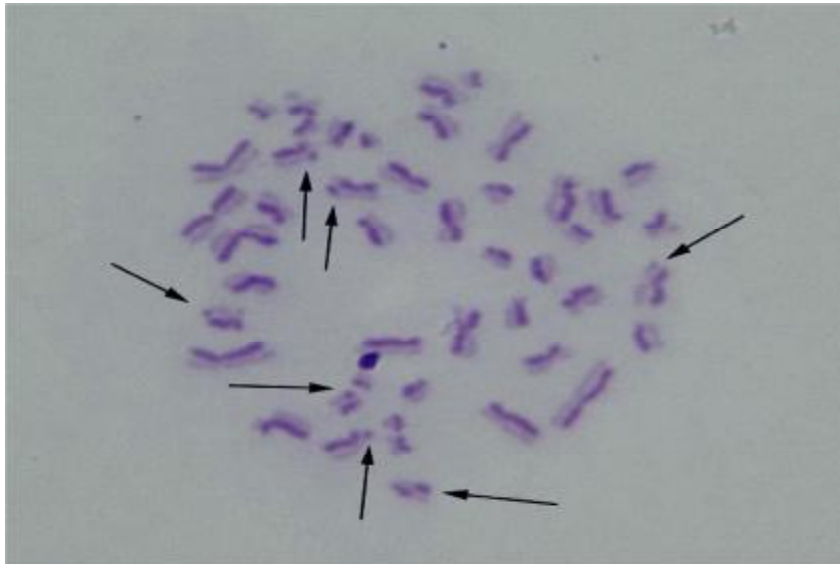
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Bulgular

#### 4.1.1. 1,8-Cineole'ün Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri

Sağlıklı donörlerden (kan verici) alınan ve 72 saat süresince kültüre edilen periferik kan 1,8-cineole'un (1,8-sineol) 4 farklı konsantrasyonu (0.07, 0.14, 0.21 ve 0.28  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) ile 24 veya 48 saat süreyle muamele edilmiştir. Muamele sonunda kardeş kromatidler arasında çeşitli şekil ve sayıda parça değiş tokuşları (KKD) gözlenmiştir (Şekil 4.1.). Test maddesi ile muamele edilmiş ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdeki KKD frekansları kontrollerden daha yüksek saptanmış olmasına rağmen (Şekil 4.2.) bu artışlar kontrol ve çözücü (ÇK) (%70 etil alkol) kontrole göre önemli olmayacak düzeydedir ( $P>0.05$ ) (Çizelge 4.1.).

Çalışmada test edilen bütün muamelelerde gözlenen KKD frekansları pozitif kontrolde (MMC) gözlenenlerden oldukça düşük bulunmuştur ( $P<0.001$ ) (Çizelge 4.1.).



Şekil 4.1. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde 7 tane KKE içeren ikinci mitoz plağı (x1000) (0,28  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 48saat, ♂)



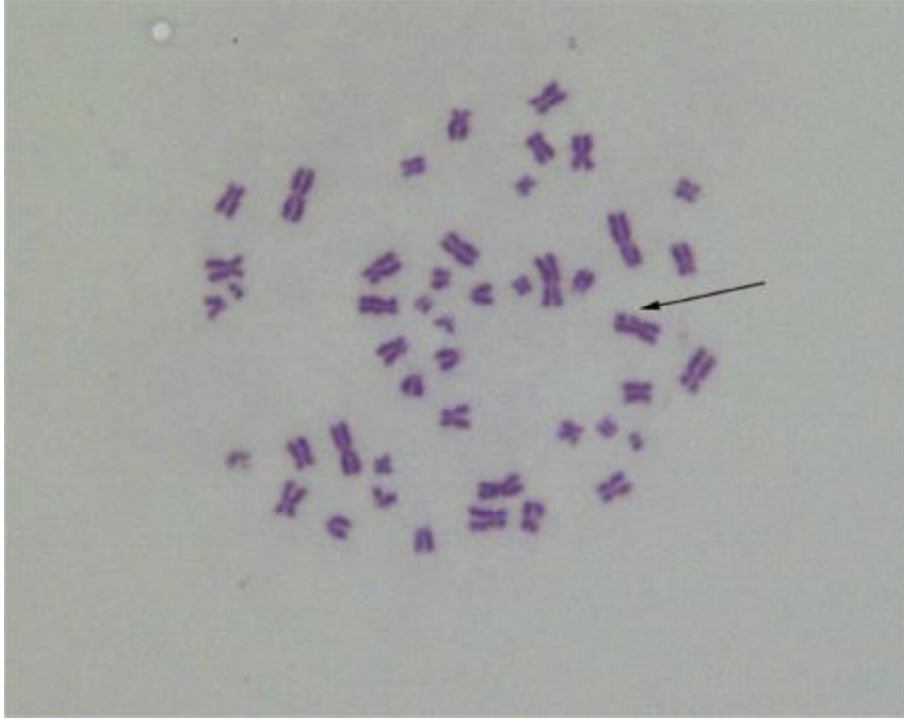
Çizelge 4.1. Farklı Konsantrasyonlarda 1,8-Cineole ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Değerleri

Test Maddesi	Muamele		Min-Maks KKD	KKD ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µL/mL)		
Kontrol	-	-	0-10	4,23 ± 0,293
ÇK	24	1.11	0-11	4,81 ± 0,355
MMC (PK)	24	0.25	3-37	19,70 ± 1,060
1,8-Cineole	24	0.07	1-14	5,48 ± 0,723 c <sub>3</sub>
	24	0.14	1-13	5,99 ± 0,295 c <sub>3</sub>
	24	0.21	1-15	5,98 ± 0,515 c <sub>3</sub>
	24	0.28	3-16	6,41 ± 0,720 c <sub>3</sub>
ÇK	48	1.11	0-11	5,71 ± 0,768
MMC (PK)	48	0.25	5-82	51,26 ± 3,390
1,8-Cineole	48	0.07	0-15	5,13 ± 0,667 c <sub>3</sub>
	48	0.14	1-17	6,04 ± 0,611 c <sub>3</sub>
	48	0.21	1-16	6,48 ± 0,897 c <sub>3</sub>
	48	0.28	1-15	6,56 ± 0,464 c <sub>3</sub>

\*: Toplam 400 adet ikinci mitoz geçiren iyi dağılmış metafaz değerlendirilmiştir. a: Kontrol ile; b: Çözücü kontrol ile; c: Pozitif kontrol ile arasındaki fark önemli. a1b1c1: P<0.05; a2b2c2: P<0.01; a3b3c3: P<0.001

#### 4.1.2. 1,8-Cineole'ün Kromozom Aberasyonu (KA) Oluşumu Üzerine Etkisi

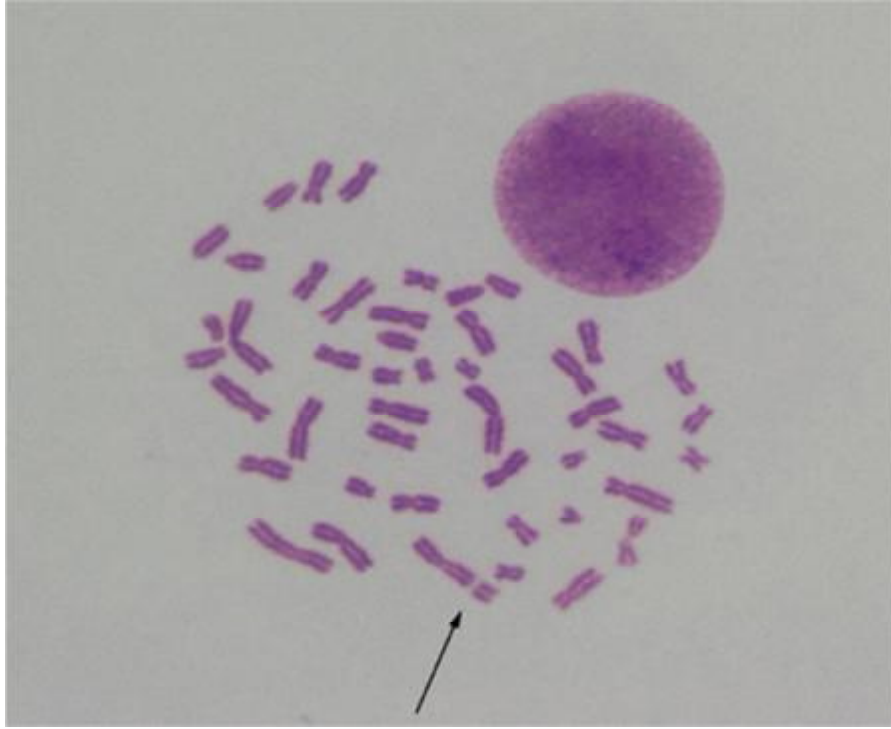
Artan konsantrasyondaki (0.07, 0.14, 0.21 ve 0.28 µL/mL) 1,8-Cineole (1,8-sineol) ile 24 veya 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde çeşitli tip ve sayıda kromozom anormallikleri (KA) saptanmıştır. Belirlenen anormalliklerin iyi görünenlerinden bir kısmı fotoğraflanmıştır (şekil 4.3. - şekil 4.7.). Kromozomal anormallikler içerisinde en sık rastlanana kromatid (B') tipi kırıklardır. Bu tip anormalliği; kromozom tipi fragmet (F''), kromozom kırığı (B''), kromatid değişimi (KD), endoreduplikasyon (ER) ve kromatid tipi fragment (F') anormallikleri takip etmektedir (Çizelge 4.2).



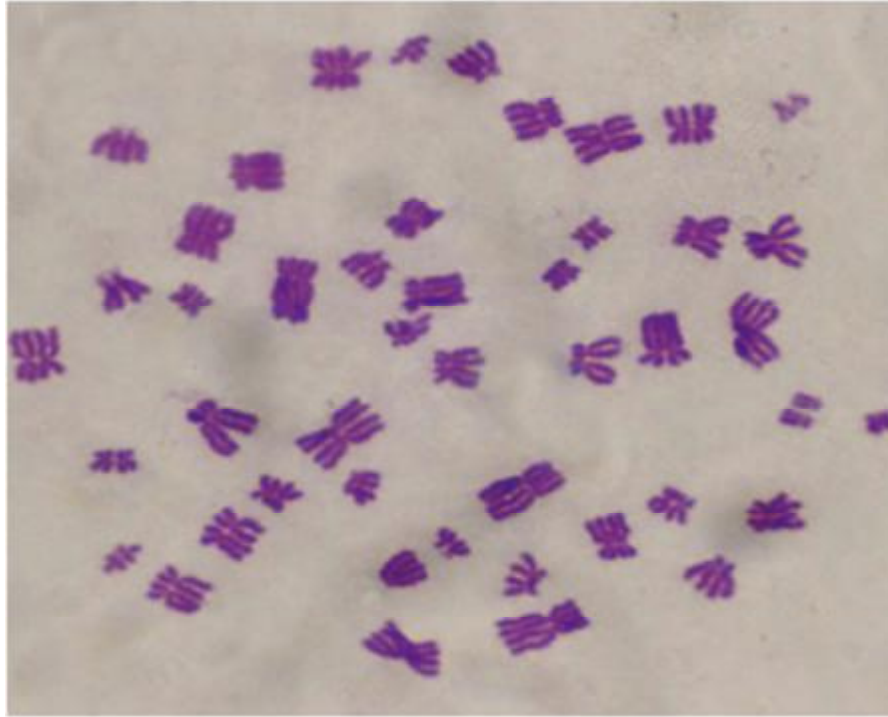
Şekil 4.2. 1,8-Cineole ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde kromatid kırığı (x1000) (0,28  $\mu$ L/mL, 48saat, ♂)



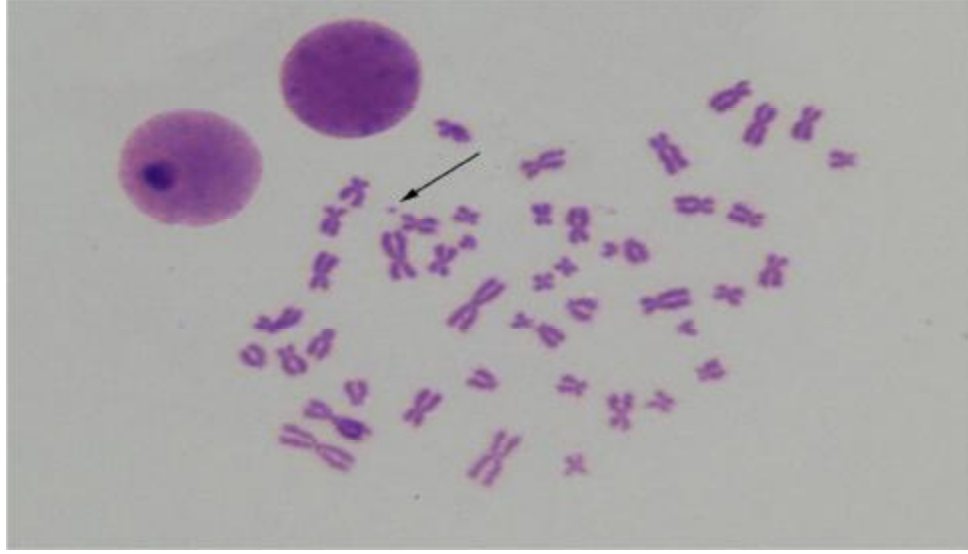
Şekil 4.3. 1,8-Cineole ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde kromozom tipi fragment (x1000) (0,21  $\mu$ L/mL, 48saat, ♂)



Şekil 4.4. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromozom tipi kırık (x1000) (0,21  $\mu$ L/mL, 48saat, ♀)



Şekil 4.5. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde endoreduplikasyon (x1000) (0,28  $\mu$ L/mL, 24 saat, ♀)



Şekil 4.6. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatid tipi fragment (x1000) (0,21  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 48saat, ♂)

Muamele edilmiş kültürlerde test maddesinin klastojenik etkisiyle ortaya çıkan KA bulguları ile muamelesiz kontrol ve çözücü kontrolden (ÇK, %70 etil alkol) elde edilen KA bulguları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada test maddesinin hiçbir konsantrasyonu ve uygulama süresinde, anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen anormallik (KA/hücre) oranlarını önemli düzeyde etkilemediği anlaşılmıştır ( $P>0.05$ ) (Çizelge 4.2.). En düşük konsantrasyondaki (0,07  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) 1,8-cineole muamelesi kontrol düzeyinde KA yaratırken, 0.21  $\mu\text{L}/\text{mL}$  derişimdeki test maddesi her iki muamele süresinde de (24 ve 48 saat) yüksek KA oluşturma potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Öyle ki, bu konsantrasyon 24 saat muamelede anormal hücre yüzdesini %100 artırmışken, 48 saatte %114 seviyesinde artışa neden olmuştur. İlginç bir şekilde en yüksek konsantrasyonda (0.28  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) saptanan KA miktarında düşük de olsa bir azalma eğilimi ortaya çıkmıştır. Ayrıca anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen anormallik (KA/Hücre) oranları birbirleriyle benzerlikler göstermektedir (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.). Anılan konsantrasyonda kontrolün iki katı seviyesine ulaşan kromozom anormalliği saptanmasına rağmen aradaki farkın önemsiz olduğu anlaşılmıştır. Öte yandan pozitif kontrolde (MMC) saptanan KA bulguları ile test maddesinin neden olduğu KA bulguları arasında yapılan karşılaştırmada farkın çok önemli ( $P<0.001$ ) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Farklı Konsantrasyonda 1,8-Cineole ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, KA/Hücre Oranı ve Anormal Hücre Yüzdesi \*

Test Maddesi	Muamele		Anormallik Çeşitleri						Anormal Hücre Yüzdesi ± SH	KA/Hücre ± SH
	Süre (Saat)	Kons. (µL/ml)	B'	B''	F'	F''	KD	ER		
Kontrol	--	--	6	1	-	-	-	-	1,750 ± 0,629	0,0175 ± 0,0063
ÇK	24	1.11	7	-	1	-	-	2	2,500 ± 0,645	0,0250 ± 0,0065
MMC (PK)	24	0.25	49	38	9	6	8	11	20,250 ± 1,180	0,3025 ± 0,0330 a3
1,8-Cineole	24	0.07	4	-	-	1	1	-	1,500 ± 0,289 c3	0,0150 ± 0,0029 c3
		0.14	8	-	-	3	-	1	2,750 ± 0,854 c3	0,0300 ± 0,0108 c3
		0.21	13	2	-	-	-	-	3,500 ± 0,645 c3	0,0375 ± 0,0063 c3
ÇK	48	1.11	10	1	-	1	-	1	3,250 ± 0,629 c3	0,0350 ± 0,0065 c3
MMC (PK)	48	0.25	118	80	18	54	13	10	57,000 ± 9,19	0,7325 ± 0,0882 a3
1,8-Cineole	48	0.07	7	-	-	-	-	-	1,750 ± 0,479 c3	0,0175 ± 0,0048 c3
		0.14	5	1	-	4	4	-	3,000 ± 1,220 c3	0,0350 ± 0,0155 c3
		0.21	12	2	1	2	-	-	3,750 ± 0,479 c3	0,0425 ± 0,0095 c3
		0.28**	13	-	-	1	1	-	3,370 ± 0,473 c3	0,0388 ± 0,0083 c3

\*: Toplam 400 adet iyi dağılımı metafaz değerlendirilmiştir. \*\*: Sitotoksitenden dolayı 386 metafaz sayılmıştır.

B': Kromatid kırığı, B'': Kromozom kırığı, F: Fragment, KD: Kromatid değişimi, ER: Endoreduplikasyon.

a: Kontrol ile; b: Çözücü kontrol ile; c: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>: P<0.05; a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>: P<0.01; a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>: P<0.001

#### 4.1.3. 1,8-Cineole'ün Mikronukleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerine Etkileri

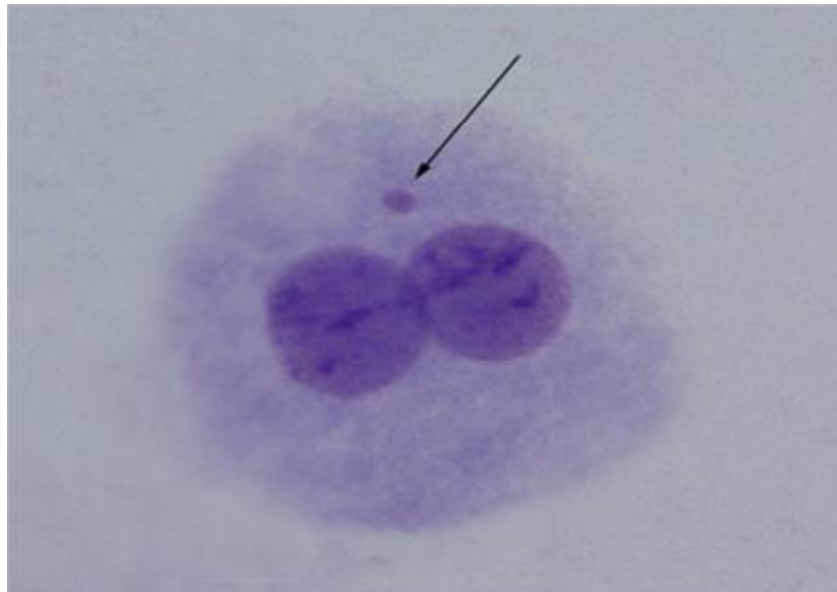
1,8-Cineole'ün (1,8-Sineol) 4 farklı (0.07, 0.14, 0.21 ve 0.28 µL/mL) derişimi ile 24 veya 48 saat süreyle muamele edilen insan periferal lenfositlerinde klastojenik yahut anöjenik etkilerden dolayı değişik büyüklükte mikronukleus (MN) oluşumu (Şekil 4.11 – Şekil 4.12) saptanmıştır. Kontrol ve çözücü kontrol (%70 etanol) hücrelerinde saptanan mikronukleuslu hücreler ile test maddesi muamelesi sonucu saptananlar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada test maddesinin hiçbir konsantrasyon ve muamele süresinde MN oluşum oranını, kontrollere (muamelesiz ve çözücü kontrol) göre önemli düzeyde artırmadığı anlaşılmıştır (Çizelge 4.3.). En fazla MN artışı; 0,28 µL/mL test maddesinin 24 saatlik muamelesinde ortaya çıkmıştır. Ancak % 60 düzeyinde gerçekleşen bu artış kontrol ve çözücü kontrole göre önemli bulunmamıştır (Şekil 4.10.).

Muamele sonucunda 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin oranları göz önüne alınarak saptanan nükleer bölünme indeksleri (NBI) incelendiğinde 24 saatlik muamelede sadece en yüksek iki (0,21 ve 0,28 µL/mL) konsantrasyondaki NBI düşüşü kontrollere (kontrol ve eritici kontrol) göre önemli bulunmuştur (P<0.001). Muamelenin 48 saat uygulandığı denemelerde ise NBI oranlarında daha dramatik düşüşler saptanmıştır. Özellikle en düşük konsantrasyon hariç NBI kontrol ve eritici kontroldekine göre dikkat çeken oranlarda azalmıştır. 48 saatlik muamelenin en yüksek iki konsantrasyondaki (0,21 ve 0,28 µL/mL) NBI azalması pozitif kontroldeki (MMC) kadar olmuştur (Çizelge 4.3.).

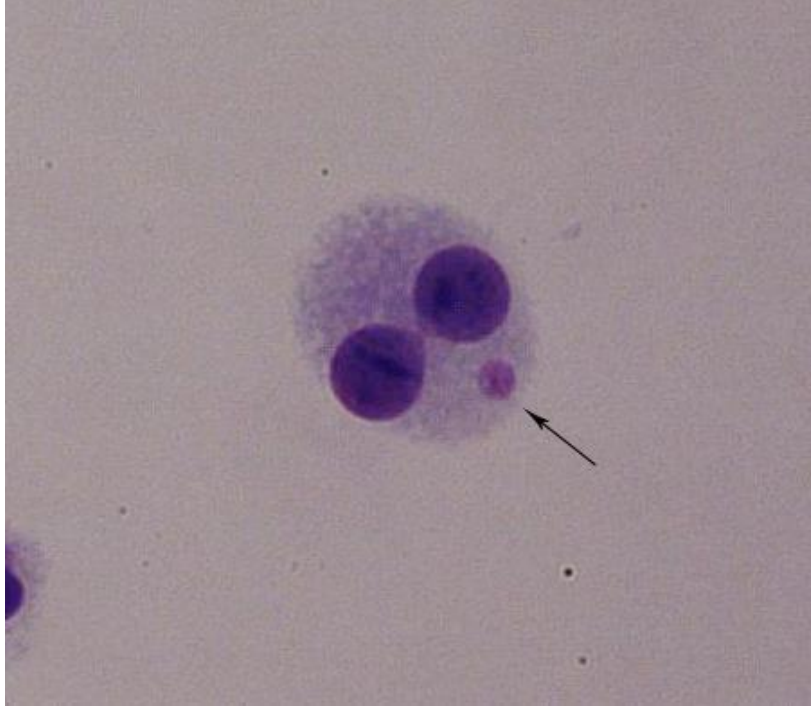
Çizelge 4.3 Farklı Konsantrasyonlarda 1,8-Cineole ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilen İnsan Periferel Lenfositlerinde Mikronukleuslu Binükleer Hücre\* %'si ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBI)

Test Maddesi	Muamele		% MN ± SH	Nükleus Sayısına Göre Hücre Dağılımı				NBI ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µL/mL)		1	2	3	4	
Kontrol	-	-	1,25 ± 0,479	2004	1808	110	78	1,566 ± 0,0388
ÇK	24	1.11	1,00 ± 0,408	1914	1822	145	119	1,617 ± 0,0723
MMC (PK)	24	0.25	6,25 ± 0,750	3103	854	35	8	1,237 ± 0,0524
1,8-Cineole	24	0.07	1,00 ± 0,408 c <sub>3</sub>	2243	1674	57	26	1,467 ± 0,0373
	24	0.14	0,75 ± 0,479 c <sub>3</sub>	2477	1470	39	14	1,398 ± 0,0725
	24	0.21	1,25 ± 0,479 c <sub>3</sub>	3107	873	16	4	1,229 ± 0,0683 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub>
	24	0.28	2,00 ± 1,080 c <sub>2</sub>	3400	576	23	8	1,163 ± 0,0728 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>
ÇK	48	1.11	1,00 ± 0,577	2688	1250	34	28	1,351 ± 0,0435
MMC (PK)	48	0.25	12,25 ± 1,25	3665	313	17	5	1,091 ± 0,0064
1,8-Cineole	48	0.07	0,75 ± 0,479 c <sub>3</sub>	2713	1257	20	11	1,333 ± 0,0377 a <sub>1</sub> c <sub>3</sub>
	48	0.14	1,75 ± 0,479 c <sub>3</sub>	3117	875	6	2	1,223 ± 0,0242 a <sub>3</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>
	48	0.21	1,75 ± 0,479 c <sub>3</sub>	3709	289	1	1	1,074 ± 0,0265 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>
	48	0.28	1,50 ± 0,645 c <sub>3</sub>	3936	64	0	0	1,016 ± 0,0032 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>

\*: Toplam 4000 adet binükleer interfaz değerlendirilmiştir. a: Kontrole göre aradaki fark önemlidir; b: Çözücü kontrole göre aradaki fark önemlidir; c: MMC'ye göre aradaki fark önemlidir. a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>: P<0.05; a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>: P<0.01; a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>: P<0.001



Şekil 4.7. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde mikronukleus oluşumu (x1000) (0,21 µL/mL, 48saat, ♂)



Şekil 4.8. 1,8-Cineole ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde mikronukleus oluşumu (x1000) (0,28  $\mu$ L/mL, 48saat, ♂)

Bu kısımdaki sonuçlar özetlenecek olursa, test ajanı mikronukleus oluşumunu önemli düzeyde arttırmamış ve bu durum çalışmadaki kromozom anormalliği bulgularıyla benzerlikler göstermektedir. Bununla birlikte nükleer bölünme indeksinin test maddesi tarafından düşürüldüğü ortadadır.

#### 4.1.4. 1,8-Cineole'un Oksidatif Stres Oluşumu Üzerine Etkileri

1,8-Cineol'ün (1,8-Cineole) 0.07, 0.14, 0.21 ve 0.28  $\mu$ L/mL konsantrasyonları ile 24 veya 48 saat muamele edilen hücre kültür ortamının toplam oksidan (TOS) ve toplam antioksidan seviye (TAS) değerleri ölçülerek oksidatif stres indeksleri (OSI) hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).



Çizelge 4.4. 1,8-Cineole'ün Kültürde Oluşturduğu Toplam Oksidan Seviye (TOS), Toplam Antioksidan Seviye (TAS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Test Maddesi	Muamele		TOS ± SH	TAS ± SH	OSI ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µL/mL)			
Kontrol	-	-	4,090 ± 0,414	0,4918 ± 0,0243	8,361 ± 0,828
ÇK	24	1.11	4,816 ± 0,422	0,4795 ± 0,0227	10,18 ± 1,23
PK (MMC)	24	0.25	4,704 ± 0,354	0,4723 ± 0,0173	9,998 ± 0,832
1,8-Cineole	24	0.07	5,279 ± 0,528	0,4938 ± 0,0100	10,70 ± 1,09
	24	0.14	4,943 ± 0,422	0,4607 ± 0,0103	10,749 ± 0,974
	24	0.21	5,615 ± 0,634	0,4590 ± 0,0120	12,23 ± 1,29 a <sub>1</sub>
	24	0.28	6,005 ± 0,455 a <sub>1</sub>	0,4808 ± 0,0069	12,498 ± 0,966 a <sub>1</sub>
ÇK	48	1.11	4,235 ± 0,369	0,4800 ± 0,0136	8,818 ± 0,717
PK (MMC)	48	0.25	4,492 ± 0,216	0,4688 ± 0,0035	9,583 ± 0,466
1,8-Cineole	48	0.07	4,460 ± 0,292	0,4505 ± 0,0110	9,907 ± 0,620
	48	0.14	4,390 ± 0,110	0,4820 ± 0,0110	9,120 ± 0,286
	48	0.21	4,382 ± 0,200	0,4550 ± 0,0062	9,637 ± 0,469
	48	0.28	4,784 ± 0,343	0,4567 ± 0,0270	10,463 ± 0,280

a: Kontrole göre aradaki fark önemlidir; b: Çözücü kontrole göre aradaki fark önemlidir; c: MMC'ye göre aradaki fark önemlidir. a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>: P<0.05; a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>: P<0.01; a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>: P<0.001

Yapılan spektrometrik ölçümlerde toplam oksidan değerleri kontrollerle karşılaştırıldığında konsantrasyon artışıyla doğru orantılı bir artış söz konusu olsa da sadece 24 saatlik muamelenin en yüksek konsantrasyondaki (0.28 µL/mL) artışın önemli (P<0.05) olduğu anlaşılmıştır. Bu konsantrasyonda kontrole göre yaklaşık % 47 seviyesinde bir artış bulunmuştur. Muamelenin 48 saat uygulandığı varyantlar içinde en yüksek TOS artışı (% 17) yine en yüksek konsantrasyonda ortaya çıkmış olup bu dâhil ölçülen değerlerin tamamı kontrollerle önemli farklılık göstermemektedir.

Toplam antioksidan değerleri (TAS) yönünden test maddesi muamelesi kontrollere göre önemli olmayan düşüslere neden olmuştur.

Oksidatif stres indeksi (OSI) yönünden yapılan hesaplamalarda test maddesi 24 saatlik muamelede en yüksek iki konsantrasyonda (0.21, 0.28 µL/mL) kontrole göre önemli (P<0.05) düzeyde yüksek oksidatif strese neden olduğu anlaşılmıştır. Bunun dışında hiçbir varyantta anlamlı bir OSI bulgusu saptanmamıştır.

#### 4.1.5. 1,8-Cineole'ün Hücre Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

İnsan periferel lenfositlerinin 1,8-cineole'ün 0.07, 0.14, 0.21 ve 0.28  $\mu\text{L}/\text{mL}$  konsantrasyonlarındaki ile 24 veya 48 saat muamele sonucunda saptanan ortalama proliferasyon (replikasyon) indeks (PI) ve mitotik indeks (MI) değerlerinin özellikle yüksek konsantrasyonlarda belirgin ve anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir (Çizelge 4.5.).

Kontrol ve muameleli kültürlerde saptanan proliferasyon indeksi değerleriyle yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda her iki muamele süresinde (24 ve 48 saat) sadece en yüksek konsantrasyonda (0.28  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) 1,8-cineole proliferasyon indeksini kontrol ve çözücü kontrole göre önemli seviyede düşürmüştür. 1,8-Cineole en yüksek konsantrasyonda proliferasyon indeksini kontrole göre yaklaşık %25 oranında azalttığı ortaya çıkmıştır (Şekil 4.16.).

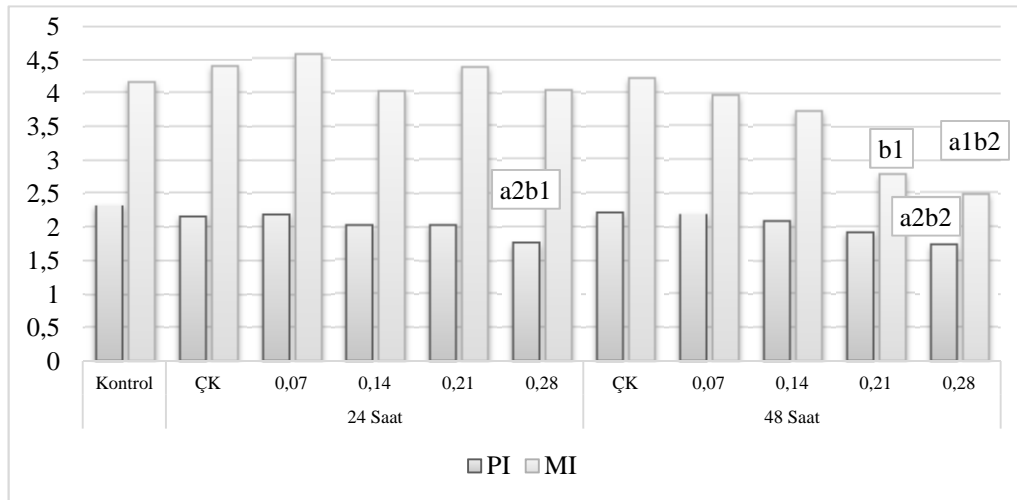
Mitotik indeks değerlerinde de proliferasyon indeksine benzer etkiler gözlenmiştir. Bununla birlikte 24 saatteki varyasyonların anlamlı olmadığı ve sadece 48 saatlik en yüksek iki konsantrasyondaki (0.21 ve 0.28  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) saptanan değerlerin kontrollere göre önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir. Bunlardaki mitotik indeks azalması sırasıyla %33 ve %40 civarlarında olmuştur (Şekil 4.15.). Test maddesinin en yüksek konsantrasyonu 48 saatlik muamelede mitotik indeksi kontrol ve çözücü kontrole göre önemli düzeyde düşürmüştür.

Daha önce de bahsedildiği gibi nükleer bölünme indeksleri (NBI) incelendiğinde 24 saatlik muamelede sadece en yüksek iki (0,21 ve 0,28  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) konsantrasyondaki NBI düşüşü kontrollere (kontrol ve eritici kontrol) göre önemli bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Muamelenin 48 saat uygulandığı denemelerde ise NBI oranlarında daha dramatik düşüşler saptanmıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.5. Farklı Konsantrasyonlarda 1,8-Cineole ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilen İnsan Periferik Lenfositlerinde Ortalama Mitotik İndeks ve Proliferasyon İndeksi Değerleri

Test Maddesi	Muamele		M1	M2	M3	PI ± SH	MI ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µL/mL)					
Kontrol	-	-	84	105	211	2,318 ± 0,124	4,16 ± 0,182
ÇK	24	1.11	113	107	180	2,168 ± 0,037	4,40 ± 0,394
MMC (PK)	24	0.25	121	229	50	1,823 ± 0,091	1,67 ± 0,354
1,8-Cineole	24	0.07	96	129	175	2,198 ± 0,164	4,57 ± 0,269 c <sub>3</sub>
	24	0.14	118	151	131	2,033 ± 0,091	4,01 ± 0,358 c <sub>2</sub>
	24	0.21	115	154	131	2,040 ± 0,101	4,38 ± 0,720 c <sub>2</sub>
	24	0.28	187	127	86	1,748 ± 0,061 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	4,03 ± 0,426 c <sub>2</sub>
ÇK	48	1.11	91	139	170	2,198 ± 0,023	4,21 ± 0,284
MMC (PK)	48	0.25	267	76	57	1,475 ± 0,153	0,96 ± 0,269
1,8-Cineole	48	0.07	99	126	175	2,190 ± 0,010	3,96 ± 0,400 c <sub>3</sub>
	48	0.14	119	124	157	2,095 ± 0,181	3,72 ± 0,412 c <sub>3</sub>
	48	0.21	149	136	115	1,915 ± 0,030 c <sub>2</sub>	2,77 ± 0,302 a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>
	48	0.28	179	153	68	1,723 ± 0,028 a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>2</sub>	2,48 ± 0,197 a <sub>1</sub> b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>

a: Kontrole göre aradaki fark önemlidir; b: Çözücü kontrole göre aradaki fark önemlidir; c: MMC'ye göre aradaki fark önemlidir. a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>: P≤0.05; a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>: P≤0.01; a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>: P≤0.001



Şekil 4.9. 1,8-cineole ile muamele edilmiş insan periferik kan lenfositlerinde ortaya çıkan sitotoksinite bulguları.

## 4.2. Tartışma

### 4.2.1. 1,8-Cineole'un Genotoksik ve Antioksidan Etkisi

Bu çalışmadaki test maddesi olan 1,8-cineoleün çok çeşitli kullanım alanı bulmasına rağmen (bak sayfa 29) kısa süreli genotoksisite testleri bakımından ajana ait yetersiz verilerin olması konuyu dikkat çekici hale getirmektedir. Ajanın özellikle toksik ve sitogenotoksik etkileri belirsizliğini sürdürmektedir. Mevcut kayıtlara göre 1,8-cineole normalden daha fazla yutulması, deri teması ya da solunması canlıda davranış, solunum sistemi ve sinir sistemi üzerine şiddetli etkiler gösterebilir. Sıçanda akut oral LD50 miktarı 2480 mg/kg'dır. Bu bileşik dişiler için üreme toksini erkekler içinse şüpheli üreme toksini olarak sınıflandırılmaktadır (Cineole – MSDS, 2012). Ayrıca cineoleün genetik materyal ve/veya hücre döngüsü üzerine olan etkileriyle ilgili dikkat çeken ancak birbirleriyle çelişkili çalışmalara da rastlamak mümkündür. Bu noktada yapmış olduğumuz tez çalışmasında değerlendirilen parametrelerin sonuçları tatmin edici bilgiler içermektedir. DNA replikasyon problemi ve/veya DNA hasarı olgusundan kaynaklandığı düşünülen ve bu sorunların göstergesi olarak değerlendirilen kardeş kromatid değişim (KKD) frekansları, bizim çalışmamızda sağlıklı *in vitro* lenfosit kültürüne test maddesi farklı konsantrasyon ve sürelerde uygulandığında ajanın hücreleri önemli düzeyde etkilemediği yönünde bulgular ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlara göre 1,8-cineole dikkat çeker ölçüde replikasyon ve DNA yapı sorunlarına neden olmadığı anlaşılmaktadır. Monoterpenoidlerle yapılan farklı bir çalışmada 1,8-cineole bizim bulgularımızla benzer şekilde Salmonella/mikrozom deneyi test ırklarında (TA97a, TA98, TA100 ve TA102) herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir (Gomes-Carneiro ve ark. 1998). İnsan lösemi (K562) hücreleriyle yapılan bir çalışmada 1,8-cineoleün ne DNA'ya hasar verici ne de DNA koruyucu etkisi bulunmamıştır (Horvathova ve ark. 2007). Uçucu yağların *in vitro* olarak SARS coronavirus (SARS-CoV) ve Herpes simpleks virüs-1 (HSV-1) replikasyonuna karşı önleyici aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, içinde 1,8-cineole bulunan bitki özütünün HSV-1 virüsüne karşı antiviral aktivite gösterdiği açıklanmıştır (Loizzo ve ark. 2008). Öte

yandan bir önceki çalışmaya benzer ancak bizim sonuçlardan farklı olarak 1,8-cineoleün de dâhil olduğu bazı monoterpenlerin *Aspergillus nidulans* türü fungusta mitotik non-disjunction veya crossing-overden kaynaklan mitotik rekombinasyon dolayısıyla genotoksik etki frekansında önemli artışlara neden olduğu ifade edilmiştir (de Sant'anna ve ark. 2009, Miyamoto ve ark. 2009). Ökalyptus yağının ana bileşeni olan 1,8-cineoleün alkalın komet testi verilerine göre insan kolon kanseri hücrelerinde kansantrasyona bağlı olarak oksidatif DNA hasarlarını artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca 1,8-cineoleün bazı tümör supressor genlerinde (BRCA2 ve Rad51) defekt bulunan hamster hücre hatlarında DNA çift iplik kırıklarına neden olduğu anlaşılmıştır. Ancak yabancı tip hücre hatlarında herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre 1,8-cineoleün zayıf genotoksik olduğu sonucuna varılmıştır (Dörsam ve ark. 2015)

Bizim çalışmadaki bulgulara göre 1,8-cineole kromozom aberasyonunu doz artışıyla doğru orantılı olarak artırmış gözükmeyle birlikte bu artışın kontrol ve çözücü kontrole göre önem arz etmediği anlaşılmıştır. Kromozom aberasyonu sonuçlarında olduğu gibi çalışmada incelediğimiz mikronukleus frekansı da kontroller seviyesinde bulunmuştur. Bu sonuçlara benzer şekilde içerisinde 1,8-cineole bulunan *Chrysanthemum indicum* (kasımpatı) çiçek esansiyel yağının 2000 mg/kg dozunun 15 gün boyunca oral gavaj yoluyla uygulandığı farelerde herhangi bir mortalite ve toksisitenin klinik belirtilerine rastlanmamıştır. Ayrıca mikronukleuslu eritrosit sayısı kontrol seviyesinde bulunmuştur. Buna benzer olarak ajan, *S. typhimurium* ve *E. coli*'deki mutajeniteyi metabolik aktivasyonun varlığında ve yokluğunda indüklememiştir (Hwang ve Kim 2013). Yine içinde birden fazla çeşitte terpenoid bulunan *Melaleuca alternifolia* (çay ağacı) bitkisi uçucu yağının kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kromozom anormalliği ve mikronukleus frekansını önemli düzeyde artırmadığı rapor edilmiştir (Pereira ve ark 2014).

Yine bizim sonuçlarımıza göre kültüre edilmiş kan hücrelerinde test maddesi, oksidatif stresi belirli sınırlar içinde artırmıştır. Saptadığımız bu bulgularla benzer veya farklı çok sayıda çalışma bulunmakta olup bunların küçük bir bölümü aşağıda özetlenmiştir. Örneğin T-butyl hydroperoxide (t-BOOH) tarafından indüklenen mutasyonlar üzerine myrcene, linalool ve 1,8-cineole (eucalyptol) gibi monoterpen

bileşiklerinin etkileri çeşitli hücrelerde çeşitli testler (*Escherichia coli* WP2 IC185 ırkı ve onun oxyR mutant IC202 ırkında geri mutasyon testi ve de ilaveten insan hepatoma HepG2 ve insan B lymphoid NC-NC hücrelerinde comet assay testleri) ile sınınamış olup anılan bileşiklerin oksidanlar tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı daha çok radikal süpürme aktivitesinden dolayı koruyucu bir özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir (Mitić-Culafić ve ark. 2009). 1,8-Cineole dâhil monoterpenerin radikal süpürücü etkinliğinden dolayı oksidatif mutajenezi azalttığı yönünde bulgular vardır (Mimica-Dukić ve ark. 2010). Benzer bir çalışmada kâfur, thujone ve eucalyptolün hatasız DNA tamir işlevini uyardığı ve biyoantimutajen olarak rol aldığı belirtilmiştir (Nikolić ve ark. 2011). *Eucalyptus gunnii* hook bitkisi esansiyel yağı, ROS uzaklaştırma mekanizması eksik *Escherichia coli* IC202 oxyR mutant suşunda spontan mutajenezi ve oksidatif mutajen olan t-BOOH tarafından indüklenen mutasyonu önemli düzeyde azaltmıştır (Bugarin ve ark. 2014). *Ocimum kilimandscharicum* (Afrika mavi fesleğeni) esansiyel yağının anti-enfmatuvar, antioksidan ve antikanser etkisinin olduğu açıklanmıştır (de Lima ve ark. 2014). Bitki esansiyel yağlarının antioksidan, demir şelasyon ve DNA koruyucu etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada (Horvathova ve ark. 2014) *Rosmarinus officinalis* (biberiye)'in işlenmemiş yağı sadece anti-radikal etki göstermiş, 1,8-cineole ise herhangi bir antioksidan aktivite göstermemiştir. Karbon tetra klorit tarafından indüklenen sıçan karaciğer hasarlarına karşı biberiye esansiyel yağının (%43.77 oranında 1,8-cineole içeriyor) antioksidan özelliğinin DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) deneyi ile araştırıldığı çalışmada esansiyel yağın, hem serbest radikal yakalayıcı etki hem de fizyolojik savunma mekanizmasını aktive ederek hepatoprotektif etki gösterdiği anlaşılmıştır (Rašković ve ark. 2014). Soliman ve ark. (2014) tarafından yapılan ve *Eucalyptus cinerea* bitkisi esansiyel yağının (ana bileşen 1,8-cineole) antibakteriyel ve antioksidan özelliğinin araştırıldığı çalışmada bitkinin genç yaprak ve diğer kısımlardan esansiyel yağlar elde edilmiştir. Çalışmada genç yaprak esansiyel yağının diğer kısımlardan elde edilenlere göre, test edilen bütün mikroorganizmalara (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans* ve *Aspergillus flavus*) karşı oldukça güçlü aktivite gösterdiği ve ilaveten genç yaprak özütünün daha yüksek antioksidan

niteliğe sahip olduğu anlaşılmıştır. Sicilya’da yetişen biberiye esansiyel yağı ve organik özütü önemli ölçüde antioksidan/serbest radikal yakalayıcı aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Napoli ve ark 2015). *Salvia lavandulifolia* (ana bileşeni 1,8-cineole ve  $\alpha$ -pinen) esansiyel yağı, U373-MG (insan malignan astrozitoma) hücre hattını H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı korumakta ve ROS üretimi, lipid peroksidasyonu ve artmış endojen antioksidan statüyü inhibe etmektedir (Porres-Martínez ve ark. 2015). *Eugenia aromatica* Kuntze (baharat olarak kullanılan karanfil) tomurcuğu esansiyel yağı, şelasyon özelliği ile OH ve nitrik oksit (NO) radikallerini yakalayarak antioksidan aktivite etkisi göstermiştir (Oboh ve ark. 2015).

#### 4.2.2. 1,8-Cineole’un Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri

Test maddesi 1,8-cineole, çeşitli sitolojik etkilerle replikasyon (proliferasyon) hızını mitoz bölünmeyi ve nükleus bölünme hızını özellikle yüksek konsantrasyonlarda anlamlı şekilde azaltmıştır. Bu sonuçlara göre test maddesinin sitotoksik (nekrotik veya apoptotik) ya da sitostatik potansiyele sahip olduğu değerlendirilebilir. Ancak saptadığımız sitotoksik/sitostatik etkinin, oksidatif stresle bağlantılı olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır. Dolayısıyla bu olgunun farklı yöntemlerle daha kapsamlı araştırılması ve irdelenmesi gerekmektedir. Farklı çalışmalarda ekseriyetle bizim bulgulara benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır. Örneğin, Moteki ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmaya göre 1,8-cineole, insan lösemi Molt 4B ve HL-60 hücrelerinde apoptozu uyarırken insan mide kanserini KATO III hücre hatlarında apoptozu uyarmamıştır. Molt 4B and HL-60 hücrelerinde ise apoptozun temel karakteristiği olan oligonukleozomal boyuttaki DNA fragmentasyonları, uygulanan 1,8-cineole konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak ortaya çıkmıştır. 1,8-cineole, fare lenfoma hücrelerinde comet assay sonuçlarına göre DNA hasar düzeyini artırmazken, tripan mavisi testi sonuçlarına göre ise güçlü sitotoksik etki göstermiştir (Ribeiro ve ark. 2006). Benzer şekilde 1,8-cineoleün Swiss fareleri peritoneal makrofaj kültürlerinde önemli sitotoksik etki gösterdiği ifade edilmiştir (Zaccaro Scelza ve ark. 2006). Ajanın kültüre edilmiş hücrelerde çok düşük sitotoksikite gösterdiği belirtilmiştir (Schnitzler ve ark. 2008).

Birçok bitkisel esansiyel yağ ve özütün içinde çeşitli oranlarda 1,8-cineole bulunduğu bilinmektedir. Örneğin içinde 1,8-cineole, kâfur, alpha-pinene ve beta-caryophyllene gibi terpenoidler bulunan *Ricinus communis* (hint yağı bitkisi) yaprak özütü birçok insan tümör hücre hattında doza bağlı tarzda sitotoksik etki göstermektedir. Ayrıca SK-MEL-28 insan melanoma hücrelerinde apoptozun indüklendiği çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir (Darmanin ve ark. 2009). Ana bileşeni 1,8-cineole olan japon anasonu (*Illicium anisatum*) esansiyel yağının, insan deri fibroblast ve HaCaT (spontan transforan anöploid immortal) keratinosit hücreleriyle yapılan MMT testi sonuçlarına göre zayıf sitotoksikite gösterdiği ifade edilmiştir (Kim ve ark. 2009). Kolinesteraz inhibitörü ve anti-inflamasyon özelliklerine sahip *Salvia leriifolia* (ateş çiçeği) esansiyel yağının (1000 microg/mL) insan deri fibroblast (142BR) hücreleriyle yapılan MTT testinde göre sitotoksikite göstermediği rapor edilmiştir (Loizzo ve ark. 2009). Yine başka bir çalışmada, *Laurus nobilis*'e (defne) ait yaprak ve tohum esansiyel yağının, K562 tümör hücre hattında proliferasyonu inhibe ettiği ifade edilmiştir (Saab ve ark. 2012). Benzer olarak ana komponenti 1,8-cineole olan *Malus domestica* (elma) taze yaprak uçucu yağı farklı kanser (glioma, insan akciğer karsinoma ve insan akut monositik lösemi) hücre hattında test edilmiştir. Esansiyel yağın en yüksek sitotoksik aktiviteyi glioma hücrelerinde gösterdiği bulunmuştur (Walia ve ark. 2012). En fazla oranda (%27) 1,8-cineole barındıran *Rosmarinus officinalis* (biberiye) bitkisi esansiyel yağı antibakteriyel aktiviteye sahipken tek başına en çok düşük antibakteriyel aktivite göstermiştir. Ayrıca insanda görülen üç tip kanserde (iki farklı ovaryum karsinoma ve hepatoselüler karsinoma hücrelerinde) oldukça güçlü sitotoksik aktiviteye sahiptir (Wang ve ark. 2012). Başka bir çalışmada, *Lavandula luisieri* (lavanta) bitkisi esansiyel yağının memeli hücrelerine karşı herhangi bir sitotoksik etki göstermezken *Candida albicans* maya mantarına karşı düşük konsantrasyonda bile inhibisyon gösterdiği ifade edilmiştir (Zuzarte ve ark. 2012). En yoğun bulunan monoterpenin 1,8-cineole olduğu *Salvia officinalis* (adaçayı) esansiyel yağı, makrofaj ve keratinosit canlılığını etkilemeksizin dermatofit mantarlar üzerine antifungal aktivite göstermektedir (Abu-Darwish ve ark. 2013). *Myrtus nivellei* (Büyük sahra mersini) bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş hidrodestilasyon ürününün insanda



enfeksiyona neden olan mantarlara (*Cryptococcus neoformans*) karşı aktivite göstermişken aksine HaCaT keratinositlerine sitotoksikite göstermemiştir (Bouzabata ve ark. 2013). Farklı bir çalışmada 1,8-cineoleün kültüre edilmiş fibroblast hücrelerinde düşük bir sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Mendanha ve ark. 2013). Ayrıca insan kolon kanseri (HCT116 ve RKO) hücre hatlarında tümör progresyonu (ilerlemesi) ve hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre önemli şekilde inhibe etmiştir (Murata ve ark. 2013). Farklı bir çalışmada 1,8-cineole dâhil 6 terpenin düşük sitotoksikiteye sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu terpenlerin HaCaT keratinosit hücrelerinde membran akışkanlığını önemli düzeyde artırarak anılan hücrelerin membran potansiyellerini azaltmıştır. Aynı zamanda terpen muamelesi HaCaT hücrelerinde Ca<sup>2+</sup>-ATPaz aktivitesini ve hücre içi Ca<sup>++</sup> seviyesini önemli düzeyde azaltmıştır (Lan ve ark. 2015).

Özetle ve önceki yapılan çalışmaların sonuçlarına göre test maddesi 1,8-cineole (eucalyptol) bileşiğinin genel olarak genotoksik özellik göstermediği ancak belirgin bir sitotoksik potansiyele sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tez çalışmasında test maddesi olarak kullanılan 1,8-cineole (1,8-sineol, eucalyptol) monoterpeneoid bileşiği sınanan bütün konsantrasyon ve sürelerde kardeş kromatid değişimini uyarlamamıştır.

Test maddesi kromozom aberasyonu ve mikronukleus oluşumu üzerinde belirgin bir etki göstermemiştir. Ancak bizim çalıştığımız testler, varsa DNA’da ortaya çıkan submikroskopik yapı değişiklikleri (nokta mutasyonları vs.) konusunda aydınlatıcı olmamıştır. Bu husus ayrıca farklı testlerle incelenmelidir.

1,8-Cineole’un sadece 24 saatlik muamelede en yüksek iki konsantrasyonda oksidatif stresi artırdığı ortaya çıkmıştır. Bu stres artışı total oksidan statünün artışıyla ilintili olduğu anlaşılmaktadır. Bu kısımda test maddesi kaynaklı oksidan etkiler artmışken antioksidan mekanizmanın uyarılmamış olması dikkat çekicidir. Antioksidan sistem üzerine test ajanının olası supresyon (baskılama) etkisi irdelenmelidir.

Çalışmadaki en dikkat çekici sonuç hücrelerde gözlenen sitotoksisite bulgularıdır. Özellikle 1,8-cineole’un yüksek konsantrasyonlarında nükleus bölünme indeksi, proliferasyon indeksi ve mitotik indeks bariz şekilde azalmıştır. Bu sonuçlar 1,8-Cineole’un sitotoksik olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara ilaveten farklı test sistemleri ve/veya farklı hücre tiplerinin (kansere hücre hatları vs.) kullanılması ve özellikle de in vivo deneylerin yapılmasıyla saptanacak bulguların 1,8-cineole ile ilgili yeterince aydınlanmamış sonuçları belirgin şekilde netleştireceği görüşündeyiz.



## KAYNAKLAR

- ABRAHAM, S. K. 2001. Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. *Food Chem Toxicol*, 39(5): 493-498.
- ABU-DARWISH, M. S., CABRAL, C., FERREIRA, I. V., GONCALANDS, M. J., CAVALEIRO, C., CRUZ, M. T., AL-BDOUR, T. H. and SALGUEIRO, L. 2013. Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *Biomed Res Int*. 2013: 538940.
- ALBERTINI, R. J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G. R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A. T., NORPPA, H., SHUKER, D. E., TICE, R., WATERS, M. D. and AITIO, A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat. Res.* 463(2): 111-172.
- ANDERSON, D., JENKINSON, P. C., DEWDNEY, R. S., FRANCIS, A. J., GODBERT, P. and BUTTERWORTH, K. R. 1988. Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferatiand rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of the U.K. population. *Mutat. Res.* 204(3): 407-420.
- ARCHANA, P. R., NAGESHWAR RAO, B. and SATISH RAO, B. S. 2011. Modulation of gamma ray-induced genotoxic effect by thymol, a monoterpene phenol derivatiand of cymene. *Integr Cancer Ther.* 10(4): 374-383.
- AYDIN, E., TURKEZ, H. and KELES, M. S. 2014. The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*, 66(1): 149-157.
- AYDIN, S., BASARAN, A. A. and BASARAN, N. 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutat. Res.* 581(1-2): 43-53.
- AZIRAK, S. 2007. Thymol ve carvacrol'un in vivo genotoksik etkilerinin araştırılması. Çukurova Üniandsitesi Doktora Tezi.

- AZIZAN, A. and BLEVINS, R. D. 1995. Mutagenicity and antimutagenicity testing of six chemicals associated with the pungent properties of specific spices as reanalyzed by the Ames Salmonella/microsomal assay. *Arch Environ Contam Toxicol*, 28(2): 248-258.
- BAKA (2012) Batı Akdeniz Kalkınma Ajansı. Tıbbi and aromatik bitkiler sektör raporu.
- BARNES, J., ANDERSON, L. A. and PHILLIPSON, J. D. 2007. *Herbal Medicines* (3rd ed.). London, UK: Pharmaceutical Press.
- BARTA, I., SMERAK, P., POLIVKOVA, Z., SESTAKOVA, H., LANGOVA, M., TUREK, B. and BARTOVA, J. 2006. Current trends and perspectives in nutrition and cancer prevention. *Neoplasma*, 53(1): 19-25.
- BOLAND, D. J., BROPHY, J. J. and HOUSE, A. P. N. (1991). *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*, Inkata Press. 720 p.
- BONASSI, S., HAGMAR, L., STROMBERG, U., MONTAGUD, A. H., TINNERBERG, H., FORNI, A., HEIKKILA, P., WANDERS, S., WILHARDT, P., HANSTEEN, I. L., KNUDSEN, L. E. and NORPPA, H. 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.* 60(6): 1619-1625.
- BONASSI, S., UGOLINI, D., KIRSCH-VOLDERS, M., STROMBERG, U., ANDRMEULEN, R. and TUCKER, J. D. 2005. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen.* 45(2-3): 258-270.
- BONASSI, S., ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M. P., BOLOGNESI, C., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., FUCIC, A., HAGMAR, L., JOKSIC, G., MARTELLI, A., MIGLIORE, L., MIRKOVA, E., SCARFI, M. R., ZIJNO, A., NORPPA, H. and FENECH, M. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3): 625-631.

- BONASSI, S., ZNAOR, A., NORPPA, H. and HAGMAR, L. 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet Genome Res.* 104(1-4): 376-382.
- BOUZABATA, A., BAZZALI, O., CABRAL, C., GONCALANDS, M. J., CRUZ, M. T., BIGHELLI, A., CAVALEIRO, C., CASANOVA, J., SALGUEIRO, L. and TOMI, F. 2013. New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus niandllei* Batt. & Trab., an endemic species of Central Sahara. *J Ethnopharmacol*, 149(3): 613-620.
- BUDAVARI, S. and WINDHOLZ, M. (1989). *The merck index*, Merck Rahway, NJ.
- BUGARIN, D., GRBOVIC, S., ORCIC, D., MITIC-CULAFIC, D., KNEZEVIC-VUKCEVIC, J. and MIMICA-DUKIC, N. 2014. Essential oil of *Eucalyptus gunnii* hook. As a noandl source of antioxidant, antimutagenic and antibacterial agents. *Molecules*, 19(11): 19007-19020.
- BURDOCK, G. A. (2009). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*, CRC press. 2159 p.
- BURKEY, J. L., SAUER, J. M., MCQUEEN, C. A. and SIPES, I. G. 2000. Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners-a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutat. Res.* 453(1): 25-33.
- BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*, 94(3): 223-253.
- BUYUKLEYLA, M., AZIRAK, S., RENCUZOGULLARI, E., KOCAMAN, A. Y., ILA, H. B., TOPAKTAS, M. and DARICI, C. 2012. The genotoxic and antigenotoxic effects of tannic acid in human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol*, 35(1): 11-19.
- BÜYÜKLEYLA, M. 2007. Thymol'ün insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronukleus oluşumu üzerine etkileri. Çukurova Üniandrsitesi Yüksek Lisans Tezi.

- CARRANO, A. V. and NATARAJAN, A. T. 1988. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res*, 204(3): 379-406.
- CARRANO, A. V., THOMPSON, L. H., LINDL, P. A. and MINKLER, J. L. 1978. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271(5645): 551-553.
- CINEOL MSDS. [Http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924005](http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924005)
- CHAN, A. C., AGER, D. and THOMPSON, I. P. 2013. Resolving the mechanism of bacterial inhibition by plant secondary metabolites employing a combination of whole-cell biosensors. *J Microbiol Methods*, 93(3): 209-217.
- CHAN, K. 2003. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, 52(9): 1361-1371.
- CHAN, V. S. and CALDWELL, J. 1992. Comparative induction of unscheduled DNA synthesis in cultured rat hepatocytes by allylbenzenes and their 1'-hydroxy metabolites. *Food Chem Toxicol*, 30(10): 831-836.
- CHANG, Y. C., HUANG, F. M., CHENG, M. H., CHOU, L. S. and CHOU, M. Y. 1998. In vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. *J Endod*, 24(9): 604-606.
- CHEN, X., LI, G., LIAN, J. and JIANG, Q. 2009. Study of the formation and growth of tannic acid based conondrsion coating on AZ91D magnesium alloy. *Surface and Coatings Technology*, 204(5): 736-747.
- CHENG, M., CONNER, M. K. and ALARIE, Y. 1981. Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchange inducers and comparison with known carcinogenic activities. *Cancer Res*, 41(11 Pt 1): 4489-4492.
- CHENG, T. J., CHRISTIANI, D. C., XU, X., WAIN, J. C., WIENCKE, J. K. and KELSEY, K. T. 1996. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat Res*, 349(1): 43-50.
- CHIANG, S. Y., LEE, P. Y., LAI, M. T., SHEN, L. C., CHUNG, W. S., HUANG, H. F., WU, K. Y. and WU, H. C. 2011. Safrole-2',3'-oxide induces cytotoxic and genotoxic effects in HepG2 cells and in mice. *Mutat Res*, 726(2): 234-241.

- CHYAU, C.-C., MAU, J.-L. and WU, C.-M. 1996. Characteristics of the steam-distilled oil and carbon dioxide extract of *Zanthoxylum simulans* fruits. *J Agric Food Chem*, 44(4): 1096-1099.
- COELHO, V., MAZZARDO-MARTINS, L., MARTINS, D. F., SANTOS, A. R., DA SILVA BRUM, L. F., PICADA, J. N. and PEREIRA, P. 2013. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-linalool in mice. *J Nat Med*, 67(4): 876-880.
- DARMANIN, S., WISMAYER, P. S., CAMILLERI PODESTA, M. T., MICALLEF, M. J. and BUHAGIAR, J. A. 2009. An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-MEL-28 human melanoma cells. *Nat Prod Res*, 23(6): 561-571.
- DE CARVALHO, C. C. and DA FONSECA, M. M. R. 2006. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chem*, 95(3): 413-422.
- DELLARCO, V. L., MAVOURNIN, K. H. and TICE, R. R. 1985. Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *Environ Mutagen*, 7(3): 405-424.
- DE LIMA, V. T., VIEIRA, M. C., KASSUYA, C. A., CARDOSO, C. A., ALANDS, J. M., FOGLIO, M. A., DE CARVALHO, J. E. and FORMAGIO, A. S. 2014. Chemical composition and free radical-scavenging, anticancer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Ocimum kilimandscharicum*. *Phytomedicine*, 21(11): 1298-1302.
- DE-OLIANDIRA, A. C., RIBEIRO-PINTO, L. F. and PAUMGARTTEN, J. R. 1997. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol Lett*, 92(1): 39-46.
- DE-OLIVEIRA, A. C., RIBEIRO-PINTO, L. F. and PAUMGARTTEN, J. R. 1997. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol Lett*, 92(1): 39-46.



- DE SANT'ANNA, J. R., FRANCO, C. C., MIYAMOTO, C. T., CUNICO, M. M., MIGUEL, O. G., COCCO, L. C., YAMAMOTO, C. I., JUNIOR, C. C. and DE CASTRO-PRADO, M. A. 2009. Genotoxicity of *Achillea millefolium* essential oil in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. *Phytother Res*, 23(2): 231-235.
- DE VINCENZI, M., STAMMATI, A., DE VINCENZI, A. and SILANO, M. 2004. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75(7): 801-804.
- DEVASAGAYAM, T., TILAK, J., BOLOOR, K., SANE, K. S., GHASKADBI, S. S. and LELE, R. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, 52(794804): 4.
- DEWICK, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, John Wiley & Sons. 507 p.
- DI SOTTO, A., MAZZANTI, G., CARBONE, F., HRELIA, P. and MAFFEI, F. 2011. Genotoxicity of laandnder oil, linalyl acetate, and linalool on human lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen*, 52(1): 69-71.
- DING, W., LEVY, D. D., BISHOP, M. E., LYN-COOK LASCELLES, E., KULKARNI, R., CHANG, C. W., AIDOO, A. and MANJANATHA, M. G. 2011. Methyleugenol genotoxicity in the Fischer 344 rat using the comet assay and pathway-focused gene expression profiling. *Toxicol Sci*, 123(1): 103-112.
- DING, W., LEVY, D. D., BISHOP, M. E., PEARCE, M. G., DAVIS, K. J., JEFFREY, A. M., DUAN, J. D., WILLIAMS, G. M., WHITE, G. A., LYN-COOK, L. E. and MANJANATHA, M. G. 2014. In vivo genotoxicity of estragole in male F344 rats. *Environ Mol Mutagen*. 56(4):356-65
- DORSAM, B., WU, C. F., EFFERTH, T., KAINA, B. and FAHRER, J. 2015. The eucalyptus oil ingredient 1,8-cineol induces oxidatiand DNA damage. *Arch Toxicol*, 89(5): 797-805.
- DUFFAUD, F., ORSIERE, T., VILLANI, P., PELISSIER, A. L., VOLOT, F., FAVRE, R. and BOTTA, A. 1997. Comparison between micronucleated lymphocyte rates obserandd in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis*, 12(4): 227-231.

- ECCLES, R. 1994. Menthol and related cooling compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(8): 618-630.
- ELGAYYAR, M., DRAUGHON, F. A., GOLDEN, D. A. and MOUNT, J. R. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J Food Prot*, 64(7): 1019-1024.
- EREL, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38(12): 1103-1111.
- EVANS, H. J. 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (Eds.), Second edition. Elsevier Science Publishers, BV, pp. 405-427.
- FAHLBUSCH, K. G., HAMMERSCHMIDT, F. J., PANTEN, J., PICKENHAGEN, W., SCHATKOWSKI, D., BAUER, K., GARBE, D. and SURBURG, H. 2003. Flavors and fragrances. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- FARNSWORTH, N. R., AKERELE, O., BINGEL, A. S., SOEJARTO, D. D. and GUO, Z. 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ*, 63(6): 965-981.
- FDA: <http://www.fda.gov>
- FENECH, M. 2002. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181-182: 411-416.
- FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W. P., ZEIGER, E. and BONASSI, S. 1999. The Human MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*, 428(1-2): 271-283.
- FERNANDEZ-BEDMAR, Z., ANTER, J., DE LA CRUZ-ARES, S., MUNOZ-SERRANO, A., ALONSO-MORAGA, A. and PEREZ-GUISADO, J. 2011. Role of citrus juices and distinct components in the modulation of degenerative processes: genotoxicity, antigenotoxicity, cytotoxicity and longevity in *Drosophila*. *J Toxicol Environ Health A*, 74(15-16): 1052-1066.

- FOWLER, P., SMITH, K., YOUNG, J., JEFFREY, L., KIRKLAND, D., PFUHLER, S. and CARMICHAEL, P. 2012. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutat Res*, 742(1-2): 11-25.
- GEZGIN, D. (2007). Bitki mitoslari, Sel Yayinevi, 144 s.
- GMINSKI, R., TANG, T. and MERSCH-SUNDERMANN, V. 2010. Cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial A549 cells caused by airborne volatile organic compounds emitted from pine wood and oriented strand boards. *Toxicol Lett*, 196(1): 33-41.
- GOMES-CARNEIRO, M. R., FELZENSZWALB, I. and PAUMGARTTEN, F. J. 1998. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. *Mutat Res*, 416(1-2): 129-136.
- GOMES-CARNEIRO, M. R., VIANA, M. E., FELZENSZWALB, I. and PAUMGARTTEN, F. J. 2005. Evaluation of beta-myrcene, alpha-terpinene and (+)- and (-)-alpha-pinene in the Salmonella/microsome assay. *Food Chem Toxicol*, 43(2): 247-252.
- GORELICK, N. J. 1995. Genotoxicity of trans-anethole in vitro. *Mutat Res*, 326(2): 199-209.
- GRANSTRÖM, K. M. 2009. Underestimation of terpene exposure in the Nordic wood industry. *Journal of occupational and environmental hygiene*, 7(3): 144-151.
- GUPTA, S. C., HEVIA, D., PATCHVA, S., PARK, B., KOH, W. and AGGARWAL, B. B. 2012. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal*, 16(11): 1295-1322.
- HAGMAR, L., BROGGER, A., HANSTEEN, I. L., HEIM, S., HOGSTEDT, B., KNUDSEN, L., LAMBERT, B., LINNAINMAA, K., MITELMAN, F., NORDENSON, I. et al. 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*, 54(11): 2919-2922.

- HARBORNE, J. B. and BAXTER, H. (2001). Chemical dictionary of economic plants, John Wiley & Sons, 224 p.
- HARD, G. C. and WHYSNER, J. 1994. Risk assessment of d-limonene: an example of male rat-specific renal tumorigens. *Crit Rev Toxicol*, 24(3): 231-254.
- HARMA, M., M. HARMA and O. EREL, 2003. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* 133(41-42): 563-566.
- HASHEMINEJAD, G. and CALDWELL, J. 1994. Genotoxicity of the alkenylbenzenes alpha- and beta-asarone, myristicin and elimicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol*, 32(3): 223-231.
- HEDDLE, J. A., CIMINO, M. C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M. D., TUCKER, J. D., VANPARYS, P. and MACGREGOR, J. T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen*, 18(4): 277-291.
- HEINRICH, M., BARNES, J., GIBBONS, S. and WILLIAMSON, E. M. (2012). Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy, Elsevier Health Sciences, 336 p.
- HELLEDAY, T. 2003. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res*, 532(1-2): 103-115.
- HIKIBA, H., WATANABE, E., BARRETT, J. C. and TSUTSUI, T. 2005. Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *J Pharmacol Sci*, 97(1): 146-152.
- HORVATHOVA, E., NAVAROVA, J., GALOVA, E., SEVCOVICOVA, A., CHODAKOVA, L., SNAHNICANOVA, Z., MELUSOVA, M., KOZICS, K. and SLAMENOVA, D. 2014. Assessment of antioxidant, chelating and DNA-protectant effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. *J Agric Food Chem*, 62(28): 6632-6639.

- HORVATHOVA, E., TURCANIOVA, V. and SLAMENOVA, D. 2007. Comparatiand study of DNA-damaging and DNA-protectiand effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma*, 54(6): 478-483.
- HOWES, A. J., CHAN, V. S. and CALDWELL, J. 1990. Structure-specificity of the genotoxicity of some naturally occurring alkenylbenzenes determined by the unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol*, 28(8): 537-542.
- HWANG, E. S. and KIM, G. H. 2013. Safety Evaluation of *Chrysanthemum indicum* L. Flower Oil by Assessing Acute Oral Toxicity, Micronucleus Abnormalities and Mutagenicity. *Prev Nutr Food Sci*, 18(2): 111-116.
- IPEK, E., TUYLU, B. A. and ZEYTIÑOGLU, H. 2003. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 43(1-3): 145-148.
- IRANI, K., XIA, Y., ZWEIER, J. L., SOLLOTT, S. J., DER, C. J., FEARON, E. R., SUNDARESAN, M., FINKEL, T. and GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. 1997. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*, 275(5306): 1649-1652.
- JIN, M., KIJIMA, A., SUZUKI, Y., HIBI, D., INOUE, T., ISHII, Y., NOHMI, T., NISHIKAWA, A., OGAWA, K. and UMEMURA, T. 2011. Comprehensiand toxicity study of safrole using a medium-term animal model with gpt delta rats. *Toxicology*, 290(2-3): 312-321.
- KARPOUHTSIS, I., PARDALI, E., FEGGOU, E., KOKKINI, S., SCOURAS, Z. G. and MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. 1998. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J Agric Food Chem*, 46(3): 1111-1115.
- KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTTEN, F. J. and SPEIT, G. 1991. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells in vitro. *Environ Mol Mutagen*, 18(1): 28-34.
- KAYA, Z., KÜN, E. and GÜNER, A. 1997. National Plan for in situ conservation of plant genetic diandrsity in Turkey. Ministry of Environment. Ankara, 125 p.

- KEANDKORDES, S., SPIELBERGER, J., BURGHAUS, C. M., BIRKENKAMP, P., ZIETZ, B., PAUFLER, P., DIEZ, M., BOLTEN, C. and DUNKELBERG, H. 2001. Micronucleus formation in human lymphocytes and in the metabolically competent human hepatoma cell line Hep-G2: results with 15 naturally occurring substances. *Anticancer Res*, 21(1A): 461-469.
- KIM, J. Y., KIM, S. S., OH, T. H., BAIK, J. S., SONG, G., LEE, N. H. and HYUN, C. G. 2009. Chemical composition, antioxidant, anti-elastase, and anti-inflammatory activities of *Illicium anisatum* essential oil. *Acta Pharm*, 59(3): 289-300.
- KIM, S. G., LIEM, A., STEWART, B. C. and MILLER, J. A. 1999. New studies on trans-anethole oxide and trans-asarone oxide. *Carcinogenesis*, 20(7): 1303-1307.
- KIRSCH-VOLDERS, M., ELHAJOUJI, A., CUNDARI, E. and VAN HUMMELEN, P. 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res*, 392(1-2): 19-30.
- KLOCKE, J. A., DARLINGTON, M. V. and BALANDRIN, M. F. 1987. 1,8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia fitchii* (Asteraceae). *J Chem Ecol*, 13(12): 2131-2141.
- KNIGHT, T. E. and HAUSEN, B. M. 1994. Melaleuca oil (tea tree oil) dermatitis. *J Am Acad Dermatol*, 30(3): 423-427.
- KOSECİK, M., EREL, O., SEVINC, E. and SELEK, S., 2005. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol* 100(1): 61-64.
- KUO, M. L., LEE, K. C. and LIN, J. K. 1992. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the *Salmonella* and CHO systems. *Mutat Res*, 270(2): 87-95.

- L. LANA-RUIZ-CABELLO, M., MAISANABA, S., PUERTO, M., PRIETO, A. I., PICHARDO, S., JOS, A. and CAMEAN, A. M., 2014. Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames Salmonella test and alkaline, Endo III- and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. *Food Chem Toxicol*, 72: 122-128.
- LAN, Y., WANG, J. Y., LIU, Y., RU, Q. G., WANG, Y. F., YU, J. X. and WU, Q. 2015. Effect of terpene penetration enhancer and its mechanisms on membrane fluidity and potential of HaCaT keratinocytes. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 40(4): 643-648.
- LEAL-CARDOSO, J. H. and FONTELES, M. C. 1999. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. *An Acad Bras Cienc*, 71(2): 207-213.
- LEWIN, R. 1997. Modern insanın kökeni, Çev. Nazım Özüaydın. TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, 246 s.
- LOI, R. X., SOLAR, M. C. and WEIDENHAMER, J. D. 2008. Solid-phase microextraction method for in vivo measurement of allelochemical uptake. *J Chem Ecol*, 34(1): 70-75.
- LOIZZO, M. R., MENICHINI, F., TUNDIS, R., BONESI, M., CONFORTI, F., NADJAFI, F., STATTI, G. A., FREGA, N. G. and MENICHINI, F. 2009. In vitro biological activity of *Salvia leriifolia* benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *J Oleo Sci*, 58(8): 443-446.
- LOIZZO, M. R., SAAB, A. M., TUNDIS, R., STATTI, G. A., MENICHINI, F., LAMPRONTI, I., GAMBARI, R., CINATL, J. and DOERR, H. W. 2008. Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seandn Lebanon species. *Chem Biodiandrs*, 5(3): 461-470.
- MACE, ML JR., DASKAL, Y. and WRAY, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, 52:199-206.
- MAKSIMOVIC, Z. A., DORDEVIC, S. and MRAOVIC, M. 2005. Antimicrobial activity of *Chenopodium botrys* essential oil. *Fitoterapia*, 76(1): 112-114.

- MARALHAS, A., MONTEIRO, A., MARTINS, C., KRANENDONK, M., LAIRES, A., RUEFF, J. and RODRIGUES, A. S. 2006. Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. *Mutagenesis*, 21(3): 199-204.
- MARSHALL, A. D. and CALDWELL, J. 1996. Lack of influence of modulators of epoxide metabolism on the genotoxicity of trans-anethole in freshly isolated rat hepatocytes assessed with the unscheduled DNA synthesis assay. *Food Chem Toxicol*, 34(4): 337-345.
- MARTINS, C., CACAO, R., COLE, K. J., PHILLIPS, D. H., LAIRES, A., RUEFF, J. and RODRIGUES, A. S. 2012. Estragole: a weak direct-acting food-borne genotoxin and potential carcinogen. *Mutat Res*, 747(1): 86-92.
- MARTINS, C., DORAN, C., LAIRES, A., RUEFF, J. and RODRIGUES, A. S. 2011. Genotoxic and apoptotic activities of the food flavourings myristicin and eugenol in AA8 and XRCC1 deficient EM9 cells. *Food Chem Toxicol*, 49(2): 385-392.
- MENDANHA, S. A., MOURA, S. S., ANJOS, J. L., VALADARES, M. C. and ALONSO, A. 2013. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicol In Vitro*, 27(1): 323-329.
- MEZZOUG, N., ELHADRI, A., DALLOUH, A., AMKISS, S., SKALI, N. S., ABRINI, J., ZHIRI, A., BAUDOUX, D., DIALLO, B., EL JAZIRI, M. and IDAOMAR, M. 2007. Inandstigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat Res*, 629(2): 100-110.
- MILLER, E. C., SWANSON, A. B., PHILLIPS, D. H., FLETCHER, T. L., LIEM, A. and MILLER, J. A. 1983. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatiands related to safrole and estragole. *Cancer Res*, 43(3): 1124-1134.



- MIMICA-DUKIC, N., BUGARIN, D., GRBOVIC, S., MITIC-CULAFIC, D., VUKOVIC-GACIC, B., ORCIC, D., JOVIN, E. and COULADIS, M. 2010. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules*, 15(4): 2759-2770.
- MITIC-CULAFIC, D., ZEGURA, B., NIKOLIC, B., VUKOVIC-GACIC, B., KNEZEVIC-VUKCEVIC, J. and FILIPIC, M. 2009. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chem Toxicol*, 47(1): 260-266.
- MIYAMOTO, C. T., SANT'ANNA, J. R., FRANCO, C. C., CUNICO, M. M., MIGUEL, O. G., COCCO, L. C., YAMAMOTO, C. I., CORREA, C., JR. and CASTRO-PRADO, M. A. 2009. Genotoxic activity of *Eucalyptus globulus* essential oil in *Aspergillus nidulans* diploid cells. *Folia Microbiol (Praha)*, 54(6): 493-498.
- MOTEKI, H., HIBASAMI, H., YAMADA, Y., KATSUZAKI, H., IMAI, K. and KOMIYA, T. 2002. Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. *Oncol Rep*, 9(4): 757-760.
- MULLER, F. L., LUSTGARTEN, M. S., JANG, Y., RICHARDSON, A. and VAN REMMEN, H. 2007. Trends in oxidative and aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4): 477-503.
- MUNERATO, M. C., SINIGAGLIA, M., REGULY, M. L. and DE ANDRADE, H. H. 2005. Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 582(1-2): 87-94.
- MURATA, S., SHIRAGAMI, R., KOSUGI, C., TEZUKA, T., YAMAZAKI, M., HIRANO, A., YOSHIMURA, Y., SUZUKI, M., SHUTO, K., OHKOHCHI, N. and KODA, K. 2013. Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer. *Oncol Rep*, 30(6): 2647-2652.
- MURTHY, P. B., AHMED, M. M. and REGU, K. 1991. Lack of genotoxicity of menthol in chromosome aberration and sister chromatid exchange assays using human lymphocytes in vitro. *Toxicol In Vitro*, 5(4): 337-340.

- NAPOLI, E. M., SIRACUSA, L., SAIJA, A., SPECIALE, A., TROMBETTA, D., TUTTOLOMONDO, T., LA BELLA, S., LICATA, M., VIRGA, G., LEONE, R., LETO, C., RUBINO, L. and RUBERTO, G. 2015. Wild Sicilian Rosemary: Phytochemical and Morphological Screening and Antioxidant Activity Evaluation of Extracts and Essential Oils. *Chem Biodivers*, 12(7): 1075-1094.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM 2003. NTP toxicology and carcinogenesis studies of citral (microencapsulated) (CAS No. 5392-40-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*(505): 1-268.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM 2010. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of beta-myrcene (CAS No. 123-35-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*(557): 1-163.
- NESSLANY, F., ZENNOUCHE, N., SIMAR-MEINTIERES, S., TALAHARI, I., NKILI-MBOUI, E. N. and MARZIN, D. 2007. In vivo Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. *Mutat Res*, 630(1-2): 28-41.
- NIKOLIC, B., MITIC-CULAFIC, D., VUKOVIC-GACIC, B. and KNEZEVIC-VUKCEVIC, J. 2011. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food Chem Toxicol*, 49(9): 2035-2045.
- NORPPA, H., BONASSI, S., HANSTEEN, I. L., HAGMAR, L., STROMBERG, U., ROSSNER, P., BOFFETTA, P., LINDHOLM, C., GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., SRAM, R. J., KNUDSEN, L. E., BARALE, R. and FUCIC, A. 2006. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*, 600(1-2): 37-45.
- NORPPA, H. and FALCK, G. C. 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18(3): 221-233.

- OBOH, G., AKINBOLA, I. A., ADEMOSUN, A. O., SANNI, D. M., ODUBANJO, O. V., OLASEHINDE, T. A. and OYELEYE, S. I. 2015. Essential Oil from Cloand Bud (*Eugenia aromatica* Kuntze) Inhibit Key Enzymes Relevant to the Management of Type-2 Diabetes and Some Pro-oxidant Induced Lipid Peroxidation in Rats Pancreas in vitro. *J Oleo Sci*, 64(7): 775-782.
- ODA, Y., ZHANG, Y., BUCHINGER, S., REIFFERSCHIED, G. and YANG, M. 2012. Roles of human sulfotransferases in genotoxicity of carcinogens using genetically engineered umu test strains. *Environ Mol Mutagen*, 53(2): 152-164.
- OHNISHI, N. and YOKOYAMA, T. 2004. Interactions between medicines and functional foods or dietary supplements. *Keio J Med*, 53(3): 137-150.
- OHWA, M., KOGURE, T. and ELIEL, E. L. 1986. An asymmetric synthesis of enantiomerically pure (S)-(+)-linalool (3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol) and a formal synthesis of (R)-(-)-linalool. *The Journal of Organic Chemistry*, 51(13): 2599-2601.
- ORAV, A., KAILAS, T. and JEGOROVA, A. (2003). Composition of the essential oil of dill, celery, and parsley from Estonia. *Proceedings-Estonian academy of sciences chemistry, truekitud ou*.
- ÖZGÜANDN, M., SEKIN, S., GÜRBÜZ, B., ŞEKEROĞLU, N., AYANOĞLU, F. and EKREN, S. 2005. Tütün, tıbbi and aromatik bitkiler üretimi and ticareti. *Türkiye Ziraat Mühendisleri Odası Teknik Kongresi, Ankara*: 481-501.
- PAZ-Y-MINO, C., BUSTAMANTE, G., SANCHEZ, M. E. and LEONE, P. E. 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect*, 110(11): 1077-1080.
- PEREIRA, T. S., DE SANT'ANNA, J. R., SILVA, E. L., PINHEIRO, A. L. and DE CASTRO-PRADO, M. A. 2014. In vitro genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. *J Ethnopharmacol*, 151(2): 852-857.
- PERKIN, W. H. and TRIKOJUS, V. M. 1927. CCXII.—A synthesis of safrole and o-safrole. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*: 1663-1666.

- PERRY, P. and EVANS, H. 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258(5531): 121-125.
- PERRY, P. and THOMPSON, E. J. 1984. The methodology of sister chromatid exchanges, in: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition. Elsevier, Amsterdam, pp. 459–529.
- PORRES-MARTINEZ, M., GONZALEZ-BURGOS, E., CARRETERO, M. E. and GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. 2015. Major selected monoterpenes alpha-pinene and 1,8-cineole found in *Salvia lavandulifolia* (Spanish sage) essential oil as regulators of cellular redox balance. *Pharm Biol*, 53(6): 921-929.
- PRASHAR, A., LOCKE, I. C. and EVANS, C. S. 2004. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif*, 37(3): 221-229.
- QATO, M. K. and GUENTHNER, T. M. 1995. 32P-postlabeling analysis of adducts formed between DNA and safrole 2',3'-epoxide: absence of adduct formation in vivo. *Toxicol Lett*, 75(1-3): 201-207.
- RASKOVIC, A., MILANOVIC, I., PAVLOVIC, N., CEBOVIC, T., VUKMIROVIC, S. and MIKOV, M. 2014. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotectant potential. *BMC Complement Altern Med*, 14: 225.
- REHMAN, M. U., TAHIR, M., ALI, F., QAMAR, W., LATEEF, A., KHAN, R., QUAIYOOM, A., ODAY, O. H. and SULTANA, S. 2012. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protectant effect of Ellagic acid. *Mol Cell Biochem*, 365(1-2): 119-127.
- RENCÜZOĞULLARI, E. and TOPAKTAŞ, M. 1991. The relationship between quantities of bromodeoxyuridine and human peripheral blood with determination of the best differential staining of sister chromatids using Chromosome Medium-B. *Fen and Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(3): 19-24.

- RIBEIRO, D. A., MARQUES, M. E. and SALVADOR, D. M. 2006. In vitro cytotoxic and non-genotoxic effects of gutta-percha solandnts on mouse lymphoma cells by single cell gel (comet) assay. *Braz Dent J*, 17(3): 228-232.
- ROSCHEISEN, C., ZAMITH, H., PAUMGARTTEN, F. J. and SPEIT, G. 1991. Influence of beta-myrcene on sister-chromatid exchanges induced by mutagens in V79 and HTC cells. *Mutat Res*, 264(1): 43-49.
- ROTHFUSS, A., SCHUTZ, P., BOCHUM, S., VOLM, T., ELBERHARD, E., KREINBERG, R., VOGEL, V. and SPEIT, G., 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carries of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.*, 60:390-394.
- SAAB, A. M., TUNDIS, R., LOIZZO, M. R., LAMPRONTI, I., BORGATTI, M., GAMBARI, R., MENICHINI, F., ESSEILY, F. and MENICHINI, F. 2012. Antioxidant and antiproliferatiand activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) leaands and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukaemia cells. *Nat Prod Res*, 26(18): 1741-1745.
- SAVAGE, J. R. 1993. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environ Mol Mutagen*, 22(4): 198-207.
- SAANDRINI, M., CATANZARO, I., SCIANDRELLO, G., AANDLLONE, G., INDELICATO, S., MARCI, G. and PALMISANO, L. 2012. Genotoxicity of citrus wastewater in prokaryotic and eukaryotic cells and efficiency of heterogeneous photocatalysis by TiO(2). *J Photochem Photobiol B*, 108: 8-15.
- SCHIESTL, F. P. and ROUBIK, D. W. 2003. Odor compound detection in male euglossine bees. *J Chem Ecol*, 29(1): 253-257.
- SCHIPPMANN, U., LEAMAN, D. and CUNNINGHAM, A. 2006. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. *Frontis*, 17: 75-95.
- SCHNITZLER, P., WIESENHOFER, K. and REICHLING, J. 2008. Comparatiand study on the cytotoxicity of different Myrtaceae essential oils on cultured andro and RC-37 cells. *Pharmazie*, 63(11): 830-835.

- SEERAM, N. P., ADAMS, L. S., HENNING, S. M., NIU, Y., ZHANG, Y., NAIR, M. G. and HEBER, D. 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6): 360-367.
- SEKIHASHI, K., YAMAMOTO, A., MATSUMURA, Y., UENO, S., WATANABE-AKANUMA, M., KASSIE, F., KNASMULLER, S., TSUDA, S. and SASAKI, Y. F. 2002. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutat Res*, 517(1-2): 53-75.
- SEKIZAWA, J. and SHIBAMOTO, T. 1982. Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems. *Mutat Res*, 101(2): 127-140.
- SFARA, V., ZERBA, E. N. and ALZOGARAY, R. A. 2009. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of plant essential oils and selected monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *J Med Entomol*, 46(3): 511-515.
- SHETTIGAR, N. B., DAS, S., RAO, N. B. and RAO, S. B. 2014. Thymol, a monoterpene phenolic derivative of cymene, abrogates mercury-induced oxidative stress resultant cytotoxicity and genotoxicity in hepatocarcinoma cells. *Environ Toxicol*, 980 p.
- SILVA, A. G., ALMEIDA, D. L., RONCHI, S. N., BENTO, A. C., SCHERER, R., RAMOS, A. C. and CRUZ, Z. M. 2010. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasit Vectors*, 3: 79.
- SIMONSEN, J. L. 1957. *The Terpenes* (2nd edition) Vol. 2 Cambridge. Cambridge University Press, pp 105-191.
- SINHA, S., JOTHIRAMAJAYAM, M., GHOSH, M. and MUKHERJEE, A. 2014. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and sandalwood in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol*, 68: 71-77.
- SOLIMAN, F. M., FATHY, M. M., SALAMA, M. M. and SABER, F. R. 2014. Chemical composition and bioactivity of the volatile oil from leaves and stems of *Eucalyptus cinerea*. *Pharm Biol*, 52(10): 1272-1277.

- SONODA, E., SASAKI, M. S., MORRISON, C., YAMAGUCHI-IWAI, Y., TAKATA, M. and TAKEDA, S. 1999. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in andrtebrate cells. *Mol Cell Biol*, 19(7): 5166-5169.
- SPEIT, G. and HAUPTER, S. 1985. On the mechanism of differential Giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Hum Genet*, 70(2): 126-129.
- STAMMATI, A., BONSI, P., ZUCCO, F., MOEZELAAR, R., ALAKOMI, H. L. and VON WRIGHT, A. 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chem Toxicol*, 37(8): 813-823.
- SUDHEER, A. R., MUTHUKUMARAN, S., DEVIPRIYA, N. and MENON, V. P. 2007. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology*, 230(1): 11-21.
- SURRALLES, J., XAMENA, N., CREUS, A. and MARCOS, R. 1995. The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat Res*, 342(1-2): 43-59.
- SUZUKI, Y., UMEMURA, T., HIBI, D., INOUE, T., JIN, M., ISHII, Y., SAKAI, H., NOHMI, T., YANAI, T., NISHIKAWA, A. and OGAWA, K. 2012a. Possible involandment of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Arch Toxicol*, 86(10): 1593-1601.
- SUZUKI, Y., UMEMURA, T., ISHII, Y., HIBI, D., INOUE, T., JIN, M., SAKAI, H., KODAMA, Y., NOHMI, T., YANAI, T., NISHIKAWA, A. and OGAWA, K. 2012b. Possible involandment of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the liandrs of female mice. *Mutat Res*, 749(1-2): 23-28.
- ŞARER, E. 1991. Uçucu yağların biyolojik etkileri and tedavide kullanımları, 9. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı, bildiriler kitapçığı, Eskişehir.

- THRESIAMMA, K. C., GEORGE, J. and KUTTAN, R. 1998. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res*, 17(4): 431-434.
- TINSETH, G. 1993. Hop Aroma and Flavor. January/February.
- TOBACCO, 1994. [Http://archiand.tobacco.org/Resources/599ingredients.html](http://archiand.tobacco.org/Resources/599ingredients.html)
- TOPAKTAS, M. and SPEIT, G. 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite and Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. *Ç. Ü Sağlık Bil. Der.*, 5(1, 2, 3):73-84.
- TOPAKTAŞ, M. ve RENCÜZOĞULLARI, E. (2010). Sitogenetik, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara 122 s.
- TUCKER, J. D., AULETTA, A., CIMINO, M. C., DEARFIELD, K. L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R. R. and CARRANO, A. V. 1993. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res*, 297(2): 101-180.
- TURKEZ, H. and AYDIN, E. 2013. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of alpha-pinene. *Toxicol Ind Health* 9 p.
- UNDEGER, U., BASARAN, A., DEGEN, G. H. and BASARAN, N. 2009. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem Toxicol*, 47(8): 2037-2043.
- WALIA, M., MANN, T. S., KUMAR, D., AGNIHOTRI, V. K. and SINGH, B. 2012. Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic Activity of Essential Oil of Leaves of *Malus domestica* Growing in Western Himalaya (India). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012: 649727.
- WANG, W., LI, N., LUO, M., ZU, Y. and EFFERTH, T. 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, 17(3): 2704-2713.
- WHYSNER, J. and WILLIAMS, G. M. 1996. d-limonene mechanistic data and risk assessment: absolute species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacol Ther*, 71(1-2): 127-136.



- YUMRU, M., SAVAS, H. A., KALENDEROGLU, A., BULUT, M., CELIK, H. and EREL, O., 2009. Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(6): 1070-1074.
- ZACCARO SCELZA, M. F., LIMA OLIANDIRA, L. R., CARVALHO, F. B. and CORTE-REAL FARIA, S. 2006. In vitro evaluation of macrophage viability after incubation in orange oil, eucalyptol, and chloroform. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102(3): e24-27.
- ZAMITH, H. P., VIDAL, M. N., SPEIT, G. and PAUMGARTTEN, F. J. 1993. Absence of genotoxic activity of beta-myrcene in the in vivo cytogenetic bone marrow assay. *Braz J Med Biol Res*, 26(1): 93-98.
- ZARRINI, G., DELGOSHA, Z. B., MOGHADDAM, K. M. and SHAHANDRDI, A. R. 2010. Post-antibacterial effect of thymol. *Pharm Biol*, 48(6): 633-636.
- ZHOU, G. D., MOORTHY, B., BI, J., DONNELLY, K. C. and RANDERATH, K. 2007. DNA adducts from alkoxyallylbenzene herb and spice constituents in cultured human (HepG2) cells. *Environ Mol Mutagen*, 48(9): 715-721.
- ZUZARTE, M., GONCALANDS, M. J., CRUZ, M. T., CAVALEIRO, C., CANHOTO, J., VAZ, S., PINTO, E. and SALGUEIRO, L. 2012. Lavandula luisieri essential oil as a source of antifungal drugs. *Food Chem*, 135(3): 1505-1510.

## **ÖZGEÇMİŞ**

18/05/1990 yılında Balıkesir’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Balıkesir’de tamamladı. 2008 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 2012 yılında mezun oldu ve aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.