



T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

CHILOSCYPHUS POLYANTHOS CİĞEROTU EKSTRAKTLARININ İNSAN
PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

CANSU AYDIN

HAZİRAN 2015

T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

CHILOSCYPHUS POLYANTHOS CİĞEROTU EKSTRAKTLARININ İNSAN
PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

CANSU AYDIN

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Recep KARA

Haziran 2015

Cansu AYDIN tarafından **Doç. Dr. Recep KARA** danışmanlığında hazırlanan **“CHILOSCYPHUS POLYANTHOS CİĞEROTU EKSTRAKTLARININ İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Güray UYAR, Gazi Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. İbrahim DEMİR, Niğde Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Recep KARA, Niğde Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Songül BUDAK DİLER, Niğde Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Tülay EZER, Niğde Üniversitesi

ONAY:

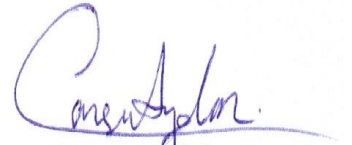
Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Cansu AYDIN

ÖZET

CHILOSCYPHUS POLYANTHOS CİĞEROTU EKSTRAKTLARININ İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

AYDIN, Cansu

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Recep KARA
İkinci Danışman : Doç. Dr. Songül BUDAK DİLER

Haziran 2015, sayfa 64

Bu çalışmada, Marchantiophyta bölümünde Geocalycaceae familyasına dahil *Chiloscyphus polyanthos* ciğerotu türünden elde edilen ekstraktın, insan periferal kan lenfositlerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bitki ekstraktı ile 2.5, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlarda, kromozom anomalilerini saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılmasında in vitro kromozom aberasyon testi yapılmıştır. Konsantrasyonlar 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Kromozomlarda oluşan anomaliler SPSS istatistik programında, ONE WAY ANOVA (Post Hoc Analiz-LSD Test) testi ile analiz edilmiştir. Yapılan istatistik analizine göre, konsantrasyonların mitotik indeks değerleri düşürdüğü saptanmıştır ve önemli ($P \leq 0.05$) bulunmuştur. Çalışmanın sonucuna göre, *Chiloscyphus polyanthos* ciğerotu türünün ekstraktı ile hazırlanan konsantrasyonlarda genotoksik etkisinin olmadığı; ancak sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Chiloscyphus polyanthos*, Ciğerotu, Sitotoksik, Genotoksik, Kromozom Aberasyonu

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF *CHILOSCYPHUS POLYANTHOS* LIVERWORT EXTRACTS ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

AYDIN, Cansu

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Associate Professor Dr. Recep KARA

Second Supervisor : Associate Professor Dr. Songül BUDAK DILER

June 2015, pages 64

In this study, it is aimed to determine the potential cytotoxic and genotoxic effects of *Chiloscyphus polyanthos* liverwort species extract in Marchantiophyta divisio Geocalycaceaea family on human peripheral blood lymphocytes. This plant extract was prepared with 2.5, 5 ve 10 µg/mL concentrations. In the prepared concentrations, construction of cell cultures in vitro chromosome aberration test was done to detect chromosomal abnormalities. Concentrations were treated at 24 and 48 hours. Chromosome abnormalities were analyzed with ONE WAY ANOVA (Post Hoc Analysis-LSD Test) test in the SPSS statistics program. According to the statistical analysis, concentrations were found to reduce the mitotic index value and significant ($P \leq 0.05$) was found. As a result, the plant extract was found on human peripheral blood lymphocytes that had no genotoxic effect but there was cytotoxic effect.

Keywords: *Chiloscyphus polyanthos*, Liverwort, Cytotoxic, Genotoxic, Chromosome Aberration

ÖN SÖZ

Bu yüksek lisans tezinde, *Chiloscyphus polyanthos* ciğerotu türünün ekstraktının insan periferel kan lenfositlerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada, genotoksik etkiyi belirlemek için, metafaz safhasındaki kromozomlar incelenmiş ve kromozom oluşan anomalileri kaydedilmiştir. Ayrıca sitotoksik etkinin belirlenmesi için mitotik indeks hesaplanmıştır. Elde edilen bulgulardan yapılan istatistik analiz göre bu bitki ekstraktının, genotoksik etkisinin olmadığı, ancak sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, araştırma konusunun belirlenmesinde, çalışılacak bitkinin arazide toplanmasında ve teşhisinin yapılmasında, gerekli literatürlere ulaşmada, bilgi birikimi ve önerileri ile bana yol gösteren ve her türlü desteği sağlayan danışman hocam sayın Doç. Dr. Recep KARA'ya ve araştırma konum gereğince beni genetik laboratuvarında yalnız bırakmayan, deneylerin yapılmasında yardımcı olan ve her türlü desteği sağlayan ikinci danışman hocam sayın Doç. Dr. Songül BUDAK DİLER'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Literatür çalışmaları ile bu tezin hazırlanması esnasında sık sık yardımına başvurduğum, çalışmalarımnda her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli meslektaşım ve nişanlım Emin DEMİRTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu noktaya gelmemde büyük emekleri olan annem Gülbiye AYDIN'a ve babam Bekir AYDIN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu çalışma, Niğde Üniversitesi Yüksek Lisans Tez Projesi (YÜLTEP) tarafından desteklenmektedir (Proje No: YÜLTEP, FEB2014/28).

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
ÖN SÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
FOTOĞRAF VB. MALZEMELER DİZİNİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	xiv
BÖLÜM I GİRİŞ.....	1
1.1 Briyofitlerin Genel Özellikleri.....	1
1.2 Briyofitlerin Kullanım Alanları.....	2
1.3 Briyofitlerin Karakteristik Bileşenleri (Sekonder Metabolitler).....	7
1.4 <i>Chiloscyphus polyanthos</i> 'un Genel Özellikleri.....	9
1.5 <i>Chiloscyphus polyanthos</i> 'un Kullanım Alanları.....	10
1.5.1 <i>Chiloscyphus polyanthos</i> 'un antimikrobiyal etkisi.....	10
1.5.2 <i>Chiloscyphus polyanthos</i> 'un doracryl mavi ve astrozon kırmızı renk boyanın giderimi.....	10
BÖLÜM II LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	12
2.1 Bitkiler Üzerinde Yapılan Sitotoksik ve Genotoksik Çalışmalar.....	12
2.1.1 Briyofitler ile ilgili yapılan sitotoksik ve genotoksik çalışmalar.....	12
2.1.2 Vasküler bitkiler ile ilgili yapılan sitotoksik ve genotoksik çalışmalar.....	14
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT.....	21
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	21
3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler.....	21
3.1.1.1 <i>Chiloscyphus polyanthos</i> (L.) Corda.....	21

3.1.1.2 Etanol.....	23
3.1.1.3 Kromozom medyumu.....	23
3.1.1.4 Kolşisin (colchicine).....	23
3.1.1.5 Hipotonik eriyik.....	24
3.1.1.6 Fiksatif.....	24
3.1.1.7 Sorensen tamponu (sorensen buffer).....	24
3.1.1.8 Giemsa (merck).....	24
3.1.1.9 Entellan (merck).....	24
3.1.1.10 Nitrik asit (HNO ₃).....	25
3.1.1.11 Mitomycin c (MMC).....	25
3.1.2 Kullanılan deney ekipmanları.....	25
3.1.2.1 Hassas terazi.....	25
3.1.2.2 Santrifüj.....	25
3.1.2.3 İnkübatör.....	25
3.2 Lamların Temizlenmesi.....	26
3.3 Ekstraksiyon.....	26
3.3.1.Bitki materyalinin toplanması.....	26
3.3.2 Bitki ekstraktı hazırlama.....	26
3.4 Sitotoksisite ve Genotoksisite Çalışmaları.....	27
3.4.1 Kromozom anomalilerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması, test maddelerinin kültüre ilave edilmesi ve preparatların hazırlanması.....	27
3.4.1.1 Hücre kültürünün yapılması ve test maddelerinin kültüre ilave edilmesi.....	27
3.4.1.2 Preparatların boyanması ve daimi preparatların hazırlanması.....	28
3.4.2 Kromozom anomalîği için hazırlanan preparatlarda mikroskopik inceleme....	29
3.4.2.1 Sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik inceleme.....	29
3.4.2.2 Genotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik inceleme.....	29

3.4.2.3 Mikroskopta fotoğraf çekimi.....	30
3.4.2.4 İstatistiksel analiz ve sonuçların değerlendirilmesi.....	30
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1 <i>Chiloscyphus polyanthos</i> Bitki Ekstraktının Kromozom Anomalilerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	31
4.2 <i>Chiloscyphus polyanthos</i> Bitki Ekstraktının Mitotik İndeks (MI) Üzerindeki Etkileri.....	44
4.3 Tartışma.....	48
4.4 <i>Chiloscyphus polyanthos</i> Ciğerotu Türünün Aktif Bileşenlerinin GC/MS Analizi İle Belirlenmesi.....	51
4.4.1 Alpha selinene.....	52
4.4.2 Beta selinene.....	53
4.4.3 Neophytadiene.....	53
4.4.4 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl.....	54
4.4.5 Octadecanoic acid, ethyl ester.....	54
4.4.6 Hexadecanoicacid, 2,3-dihydroxypropyl ester.....	54
4.4.7 Octadecanoic acid, 2-3-dihydroxypropyl ester.....	54
4.4.8 Cholest-5-en-3-ol (3.beta).....	55
BÖLÜM V SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR	57
ÖZ GEÇMİŞ	63
TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER (MAKALE, BİLDİRİ, POSTER VB.).....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Marchantia convoluta</i> ciğerotu türü, H1299 ve HepG2 hücrelerinin ekstraktlara duyarlılığı.....	13
Çizelge 4.1. Değişik konsantrasyonlarda <i>Chiloscyphus polyanthos</i> ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerindeki kromozom anomalileri.....	32
Çizelge 4.2. SPSS ANOVA analizindeki MI önemliliği.....	44
Çizelge 4.3. Değişik konsantrasyonlarda <i>Chiloscyphus polyanthos</i> ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerindeki MI değerleri..	45
Çizelge 4.4. <i>Chiloscyphus polyanthos</i> ciğerotu türünün aktif bileşenlerinin GC/MS analiz sonuçları	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünyada, briyofitlerin çeşitli kullanım alanları.....	3
Şekil 1.2. Briyofitlerin en çok kullanıldığı ülkeler ve kullandıkları tür sayıları.....	3
Şekil 2.1. Etil asetat ekstraktının H1299 (A) ve HepG2 (B) hücreleri üzerinde inhibitör etkisi.....	13
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki (2.5, 5ve 10 µg/mL) <i>Cp</i> bitki ekstraktı ile 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde, yapısal KA taşıyan hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı	33
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki (2.5, 5ve 10 µg/mL) <i>Cp</i> bitki ekstraktı ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde, yapısal KA taşıyan hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	34
Şekil 4.3. <i>Cp</i> ekstraktının 2.5, 5ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde mitotik indeksdeki konsantrasyona bağlı azalmayı gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	47
Şekil 4.4. <i>Cp</i> ekstraktının 2.5, 5ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde mitotik indeksdeki konsantrasyona bağlı azalmayı gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	48
Şekil 4.5. Alpha selinene açık formülü.....	52
Şekil 4.6. Beta selinene açık formülü.....	53
Şekil 4.7. Neophytadiene açık formülü.....	53
Şekil 4.8. 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl açık formülü.....	54
Şekil 4.9. Octadecanoic acid, ethyl ester'in açık formülü.....	54
Şekil 4.10. Cholest-5-en-3-ol (3.beta) açık formülü.....	55

FOTOĞRAFLAR VB. MALZEMELER DİZİNİ

Fotoğraf 1.1. Hücresel yağ damlacıkları.....	8
Fotoğraf 1.2. <i>Chiloscyphus polyanthos</i> ciğerotu türünün mikroskopik görüntüleri	9
Fotoğraf 3.1. <i>Chiloscyphus polyanthos</i> (L.) Corda.....	22
Fotoğraf 3.2. <i>Chiloscyphus polyanthos</i> (L.) Corda.....	22
Fotoğraf 3.3 Kurutma kağıdına bırakılan briyofit örneği.....	27
Fotoğraf 3.4. Mikroskopta fotoğraf çekimi.....	30
Fotoğraf 4.1. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saatlik muamele, ♂, X1000).....	35
Fotoğraf 4.2. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 24 saat muamele, ♂, X1000).....	35
Fotoğraf 4.3. Sister union (SU) bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 24 saat muamele, ♀, X1000).....	36
Fotoğraf 4.4. Sister union (SU) ve kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saat muamele, ♀, X1000).....	36
Fotoğraf 4.5. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 24 saatlik muamele, ♀, X1000).....	37
Fotoğraf 4.6. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (10 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 24 saat muamele, ♀, X1000).....	37
Fotoğraf 4.7. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saatlik muamele, ♂, X1000).....	38
Fotoğraf 4.8. Tek kol birleşmesi bulunan metafaz plağı (5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saat muamele, ♀, X1000).....	38
Fotoğraf 4.9. Tek kol birleşmesi bulunan metafaz plağı (10 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 24 saat muamele, ♀, X1000).....	39
Fotoğraf 4.10. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saat muamele, ♂, X1000).....	39
Fotoğraf 4.11. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 24 saat muamele, ♂, X1000).....	40
Fotoğraf 4.12. Fragment (F) bulunan metafaz plağı (10 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saat muamele, ♂, X1000).....	40

Fotoğraf 4.13. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (10 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saatlik muamele, ♂, X1000).....	41
Fotoğraf 4.14. Kromatid kırığı (B') ve kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saat muamele, ♂, X1000).....	41
Fotoğraf 4.15. Kromatid kırıkları (B'), fragment (F) ve disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saat muamele, ♀, X1000).....	42
Fotoğraf 4.16. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saat muamele, ♀, X1000).....	42
Fotoğraf 4.17. Kromatid kırığı (B') ve disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 24 saat muamele, ♀, X1000).....	43
Fotoğraf 4.18. Tek kol birleşmesi bulunan metafaz plağı (5 µg/mL <i>Chiloscyphus polyanthos</i> , 48 saat muamele, ♀, X1000).....	43

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
g	Gram
dk	Dakika
°C	Santigrat
%	Yüzde
rpm	Dakikadaki devir sayısı
N	Normal
ppm	Milyonda bir
pH	Bir çözeltinin asidik ya da bazik derecesi
P	Önemlilik
R ²	Regresyon
♀	Dişi
♂	Erkek
Kısaltmalar	Açıklama
<i>Cp</i>	<i>Chiloscyphus polyanthos</i>
<i>Sp</i>	<i>Stachys petrokosmos</i>
<i>Sf</i>	<i>Salvia fruticosa</i>
<i>Av</i>	<i>Aloe vera</i>
KA	Kromozom Aberasyonu
MMC	Mitomycin C
MI	Mitotik İndeks
MN	Mikronükleus

KKD	Kardeş Kromatit Değişimi
B'	Kromatid Kırığı
B''	Kromozom Kırığı
DS	Disentrik Kromozom
SU	Sister Union
F	Fragment
APT	Adeninfosforibosil transferaz
Cyp	Cyclophosphamide
PI	Proliferasyon İndeksi
NBI	Nükleus Bölünme İndeksi
H1299	Akciğer Kanser Hücresi
HepG2	Karaciğer Kanser Hücresi
EC ₅₀	Etkili Konsantrasyon

BÖLÜM I

GİRİŞ

Briyofitler, bitkiler aleminde Bryophyta (Yapraklı Karayosunları), Hepatophyta (Ciğerotları) ve Anthocerotophyta (Boynuzlu Ciğerotları) olmak üzere üç bölüm ile temsil edilmektedirler (Kara, 2008). Biyolojik ve ekolojik özelliklerinden dolayı çok farklı alanlarda kullanıma sahiptirler. Ancak zehirli olmaları nedeniyle insanlar ve hayvanlar tarafından yiyecek maddesi olarak tüketilmemektedirler. Günümüzde içerdikleri antibiyotik ve antitümoral etkili maddeler nedeniyle ilaç yapımındaki kullanımları ön plandadır. Dünyada floradan farklı olarak antibakteriyel, antimikrobiyal, antifungal, antitümoral, sitotoksik ve genotoksik etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Ülkemizde ise bu bitkiler üzerine yapılan çalışmalar daha çok flora ve vejetasyon üzerine olmakla birlikte, antimikrobiyal, antifungal etkileri üzerine az da olsa çalışmalar vardır. Fakat ülkemizde briyofitlerin sitotoksik ve genotoksik etkileri üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

1.1 Briyofitlerin Genel Özellikleri

Briyofitler (karayosunları), küçük boyutlarıyla fazla göze çarpmayan ve genellikle birçok botanikçi tarafından ihmal edilmiş tohumlu bitkilerdir. Dünya üzerinde tohumlu bitkilerden daha fazla yayılım alanına sahiplerdir (Arıöz, 2010). Orman ekosistemi içerisinde ve dışında çok değişik habitatlarda yaşama yeteneği olan briyofitler, ekosistemi oluşturan zincirin önemli halkalarından birini oluşturmaktadır. En eski kara bitkileri olarak bilinen briyofitlerin en kalabalık bölümünü yaklaşık 24.000 tür ile Bryophyta (yapraklı karayosunları) oluşturmaktadır (Asakawa vd., 2013).

Su hayatından karasal habitatlara geçişte öncü olan bu bitkiler, dünyadaki biyolojik çeşitliliğin oluşmasında çok büyük bir öneme sahiptirler. Evrimsel açıdan alglerden ve mantarlardan daha yüksek, eğreltiotu ve çiçekli bitkilerden daha ilkel bir seviyede bulunurlar (Abay ve Kamer, 2010).

Briyofitler birkaç mm'den 70 cm'ye kadar ulaşabilen, genellikle küçük ve basit yapıdaki bitkilerdir. Sürgünleri çoğunlukla gövde ve yapraklara ayrılan, fakat yüksek

yapılı bitkiler gibi belirgin bir kök ve gövde yapısına sahip olmayan briyofitler, gelişmiş bitkilerin yapılarına göre daha zayıf bir şekilde yapılanmışlardır. Vasküler bitkilerde bulunan bir iç farklılaşmadan yoksun olan briyofitlerin yaprakları genellikle küçük ve homojen bir şekilde dağılmış tek bir hücre tabakasından ibarettir (Richardson, 1981; Altuner, 1998).

Vasküler bitkilerin aksine kutikula ve epidermal tabaka farklılaşması yoktur. Bu sebeple ihtiyaçları olan suyu, buldukları ortamdan tüm yüzeyleri ile almaktadırlar (Kara, 2008).

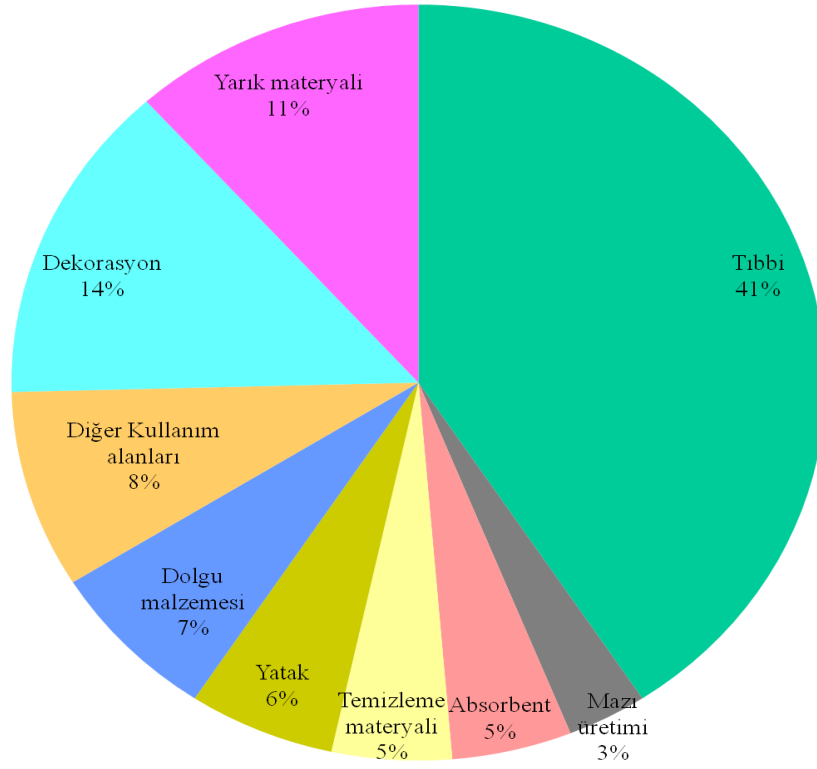
Yaşam döngüsü sporofit ve gametofit olarak iki şekildedir; ancak uzun ömürlü olan gametofit baskındır. Sporofit kısa ömürlü ve dallanmamıştır. Yaşamının önemli kısmında fotosentetik özelliktedir. Gametofite bir ayak ile bağımlı halde yaşar (Kırmacı, 2007).

Kendilerine özgü biyokimyasal yapıları ve biyolojik özellikleri sebebiyle yaşamlarını oldukça farklı çevresel koşullar altında sürdürebilirler. Bitkiler aleminin diğer üyeleri gibi klorofil a, b, ksantofil ve karoten ihtiva ederler. Hücre çeperleri ise selüloz içerir (Ezer, 2008).

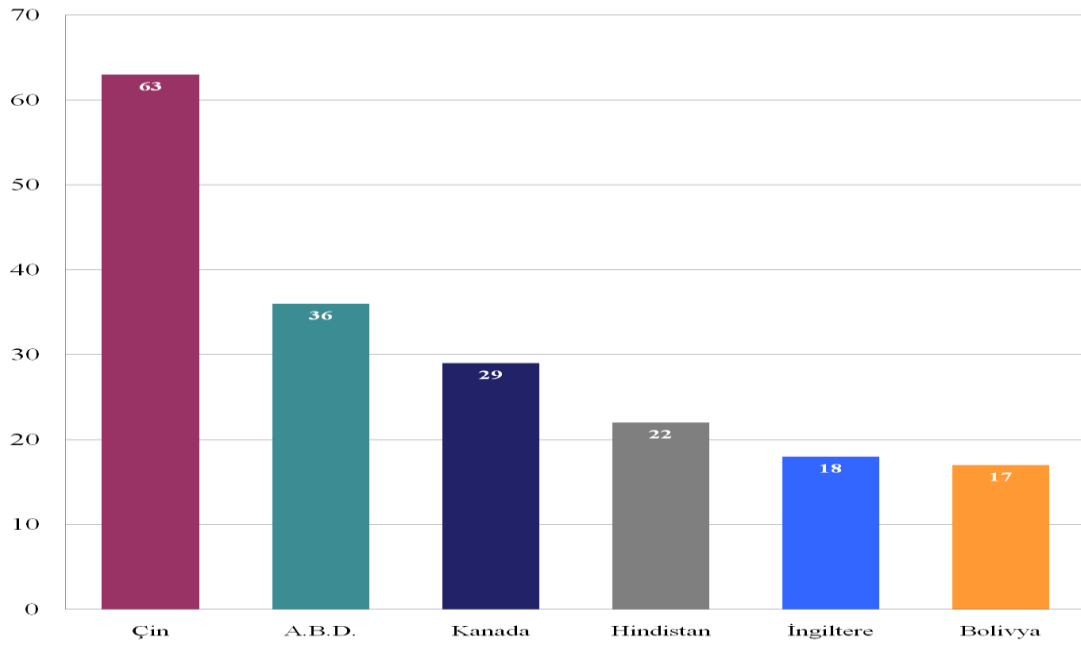
1.2 Briyofitlerin Kullanım Alanları

Briyofitler; tıbbi amaçlı, yarı materyali, dekorasyon, dolgu malzemesi, yatak yapımında, temizlik malzemesi olarak, absorbent, mazı üretimi ve pek çok alanda kullanılmaktadır (Kara vd., 2011), (Şekil 1.1).

Briyofitlerin en çok kullanıldığı ülkeler ve kullandıkları tür sayıları; Çin (63), ABD (36), Kanada (29), Hindistan (22), İngiltere (18) ve Bolivya (17)'dir (Kara vd., 2011), (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Dünyada, briyofitlerin çeşitli kullanım alanları (Kara vd., 2011)



Şekil 1.2. Briyofitlerin en çok kullanıldığı ülkeler ve kullandıkları tür sayıları (Kara vd., 2011)

Briyofitler 400 yıldan fazla süredir; Çin, Avrupa ve Kuzey Amerika'da çeşitli hastalıkların tedavisi için şifalı bitkiler olarak kullanılmaktadır. Yaralar, yılan ısırması, deri hastalıkları, akciğer tüberkülozu, yanık, çürük, kırıklar, kardiyovasküler sistem, bronşit, ortakulak iltihabı, sistit gibi hastalıkların tedavisinde şifalı bitkiler olarak kullanılmıştır (Asakawa vd., 2013; Sawant, 2010; Saxena, 2004).

Briyofitlerle ilgili çeşitli biyolojik aktivitelere bakıldığı zaman Çin'de, *Polytrichum* ve *Fissidens* türleri saç büyümesini teşvik edici ilaç olarak kullanılmıştır. Kuzey Amerika'da yaşayan yerliler *Polytrichum sp.*, *Bryum sp.*, *Mnium sp.* ve *Philonotis sp.* briyofitlerini morluklar, yaralar ve yanıkları iyileştirmek için kullanmışlardır. Ayrıca briyofitlerin mantar ve bakterilere karşı antimikrobiyal etkilerini belirten çalışmalar yapılmıştır (Alam, 2012; Sawant, 2010).

Ayrıca Çin'de geleneksel olarak yaklaşık 40 çeşit briyofit kardiyovasküler sistem, bademcik iltihabı, bronşit, orta kulak iltihabı, idrar yolu enfeksiyonları, deri hastalıkları ve yanıklar için ilaç olarak kullanılmaktadır (Dülger vd., 2009).

Kuzey Amerika Kızılderilileri *Bryum*, *Minium*, *Philonotis spp.* ve *Polytrichum juniperinum* türlerini yanıkların, eziklerin, yaraların tedavilerinde, Fransa'da ise *Marchantia*, *Polymorpha* türleri idrar söktürücü olarak kullanılmıştır (Basile vd., 1998).

Birçok briyofit ekstraktı *in vitro* çalışmalarla antibakteriyel ve antikanser aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir (Abay vd., 2015). *Dicranum scoparium*'un Hela hücre dizilerine karşı antikanser özelliği ve bitki kimyasal profili incelenmiştir. Hücre çoğalmasını engellediği belirlenmiştir. Bu briyofitin biyolojik içeriğini ortaya çıkarma işleminde diklorometan kullanılmıştır. Yüksek hücre büyümesini engelleyici aktivitesi vardır. 7, 9, 19, 20 fraksiyonlar doymamış yağ asitlerinin zengin bir kaynağıdır. Anti-çoğalma etkinlikleri iyileştirmek ve aynı zamanda da doymamış yağ asidi içeriğini artırmak durumunda Fr-19-olabilir. Çoğalma aktivitesinin etkisi, heksan ekstraktı içinde *D. scoparium*'un doymuş yağ asidi bileşimine bağlanabilir. Fr-9, 50 ve 100 µg mL⁻¹ comparedto 5-FU konsantrasyonlarında güçlü antiproliferatif aktivite göstermiştir. Diklorometan ekstreleri 7, 9, 19 ve 20 fraksiyonlar 100 µg mL⁻¹ konsantrasyonda anti-çoğalma etkinliklerini göstermiştir. HPLC-TOF / MS çalışmasında diklorometanın 100 ve 250 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarında en aktif fraksiyonu dokuz bileşiği vermiştir. Alt

faaliyetleri steroid türevleri dahil olmak üzere fraksiyonlar elde edilmiştir (Abay vd., 2015).

Fontinalis antipyretica Hedw var. *antipyretica*, *Hypnum cupressiforme* Hedw., ve *Ctenidium molluscum* (Hedw.) türleri ile yapılan çalışmada, bu türlerin metanol ile ekstraksiyonlarında, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri incelenmiştir. *Fontinalis antipyretica*'nın metanol ekstraktının mikobakteri ve bakterilerde güçlü bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu türlerin metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkisinin gram (-) bakterilerde, gram (+) bakterilerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Veljic vd. 2009).

Briyofitlerin ilginç bir özelliği de bakteri veya mantar tarafından zarara ya da sivrisinek ve salyangoz tarafından saldırıya uğramamasıdır. Birçok karayosunu bazı çürükçül organizmalara karşı gösterdiği etki ile uzun yıllar bozulmadan kalabilmektedir. Briyofitlerin antimikrobiyal madde kaynağı olarak kullanımları yaygın değildir. Ancak yüzyıllar boyunca yaraların iyileştirilmesinde kullanılmıştır (Kang vd.,2007; Sawant,2010).

Polytrichum juniperinum türünün alkol ya da asit ekstraktlarının sarkom 37'nin CAF faresinin kasına enjekte edilmesinden kaynaklanan karsinoma hastalığına karşı antitümoral aktivite gösterdiği saptanmıştır (Basile vd., 1998).

Polytrichum cinsinden elde edilen bir yağ çeşidi kozmetik sektöründe saçların güçlenmesinde etkilidir. Ayrıca *Sphagnum* cinsi tuvalet kağıdı, çocuk bezi yapımında kullanılmaktadır ve bu alanda su tutma kapasitesine sahiptir (Çolak, 2010).

Turba olarak adlandırılan, *Sphagnum* tarafından oluşturulan bataklık kömürü uzun zamandan beri yakıt olarak kullanılmaktadır. Odunun verdiği ısıdan çok daha fazla ısı vermektedir. Ekoloğlara göre bu enerji kaynağı yenilenme hızının yüksek olması açısından değerlendirilebilir olduğunu savunmaktadırlar (Canlı, 2009). Türkiye'nin yıllık petrol gereksinimi 150 milyon ton civarındadır. Yapılan araştırmalara göre 1981 yılından itibaren 50 ülke *Sphagnum* türleri tarafından oluşturulan turbayı elde etmiş, 2000'li yıllarda da 50-60 milyon ton petrole eşdeğer kullanımın söz konusu olduğu belirlenmiştir (Glime, 1998).

Briyofitlerden bazıları sadece özel bir pH'da geliştiklerinden, toprak pH'sının indikatörü olarak kullanılabilirler. Yapılan araştırmalarda bazı sucul karayosunlarının (*Sphagnum auriculatum* ve *Fontinalis antipyretica*) akarsulardaki radyoaktif ve ağır metal kontaminasyonuna (Pb, Fe, Zn, Ni) karşı biyomonitör özellik gösterdikleri tespit edilmiştir (Cymerman ve Kempers, 1999).

Alman hekim Christian Heinrich Erndtel tarafından 1730 yılında yapılan, Avrupa'nın pre- Linnaeus briyofit florasında tıbbi yosunlar ve Polonya'nın doğal tarihinden örnek başlıklı çalışmada (o zamanlarda briyofitler kesin olarak anlaşılmamış), birçok durumda likenler ve yosunlar ile ilgili karışıklık olmuştur. 1590-1801 yılları arasından, pre- ve post- Linnaeus botanik monograflarından kullanılan briyofit taksonları (18 isim) tanımlanmıştır. Briyofit türlerinin güncel isimleri ve farmakolojik değerleri briyofitler hakkında eski etnobotanikal bilgiler temin edilmiştir. 18 briyofit türü bütün yanlarıyla Warsaw'ın çevresinden (17 karayosunu ve 1 ciğerotu) tanımlanmıştır. Bazı türler hala bu alanda mevcutken (*Climacium dendroides*, *Plagiomnium undulatum* ve *Polytrichum juniperinum*), bazıları ise (*Neckeracrispa* ve *Rhodobryumroseum*) nadir ya da nesli tükenmiştir. Briyofitler arasında mikroskopik farklılıklar gözlenmesine rağmen, 18. yüzyıl hekimleri ilaç stoklarından neredeyse hiçbirini kullanmamıştır. Pre- Linnaeus bryolojisinde 18. yüzyılın materia medica yosun çıkarımını kullanarak uygulamaya koymadığı (sadece istisna olarak *Fontinalis antipyretica* ve *Polytrichum spp.*) sonucu çıkarılmıştır (Drobnik ve Stebel, 2014).

Bahecilikte, süs bitkilerinde, ev izolasyonunda, absorbent madde olarak, dekorasyon amaçlı, dolgu malzemesi olarak, temizleyici madde olarak ve bunların dışında daha farklı birçok farklı alanlarda kullanılmaktadırlar. Bunların yanı sıra ekolojik olarak önemleri de büyüktür. Mikro iklimi değiştirirler, dağlık yamaçlarda erozyonu önlemek ve toprak nemini korumak için hizmet ederler ve ormanlarda tohum yatağı olarak kullanılmaktadırlar. Mineralleri depo ederler, bazı hayvanlar için besin kaynağı ve barınak oluştururlar ve erozyonu önlerler (Bodade, 2008).

Geleneksel halk hekimliğinde kullanılan bitkiler yeniden değerlendirilmiş ve fitoterapi bir bilim dalı haline gelmiştir. Bu bilim dalı giderek gelişmekte ve daha fazla önem kazanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, gelişmekte olan ülkelerde

insanların % 80'nin bu terapi yöntemlerini kullandığını ve 3.3 milyar insanın da tıbbi bitkilerden terapi aracı olarak yararlandığını ortaya koymuştur (Çelik ve Çelik, 2007).

Özellikle ilaç olarak tedavide kullanılan, doğal (taxol; Pasifik porsuk ağacından elde edilir, vincristine; Cezayir menekşesinden elde edilir) ve sentetik maddelerin etkileri araştırılmış, bunların kontrolsüz ve aşırı düzeyde kullanıldıklarında, insanlar üzerinde genotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Diler, S.B., 2006).

Bitkilerin tedavi amaçlı kullanılmalarının yanı sıra, bunların insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması da son derece önemlidir. Bir kimyasal maddenin böyle bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi, kısa süreli genotoksikite testleri ile mümkün olabilmektedir. Bugün kısa süreli genotoksikite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin genotoksik veya anti-genotoksik olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan metotlar; kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronükleus (MN) testleridir (Kopar, 2010).

Bitkilerden elde edilen ikincil metabolitler uzun zamandan beri ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu doğal ürünlere talep gün geçtikçe artmaktadır. İnsanlar, yüksek bitkilerden elde edilen maddeleri geniş alanlarda değerlendirmelerine rağmen karayosunundan elde edilen maddeler yüksek bitkiler kadar ilgi görmemiştir (Basile vd., 1998). Konunun önemli bir yanı da bazı şifalı bitkilerin bazı yan etkilere ve hatta ölümlere yol açabilecek zehirli maddeler içerdiklerinin bilincine yeterince varılmamış olmasıdır (Qu vd., 1992; Chiang vd., 1997). Bitkisel flavonoidlerin, anti-inflamatuar, anti-mutajenik ve anti-allerjik özellikleri ortaya konulmuştur (Hollman vd., 1996).

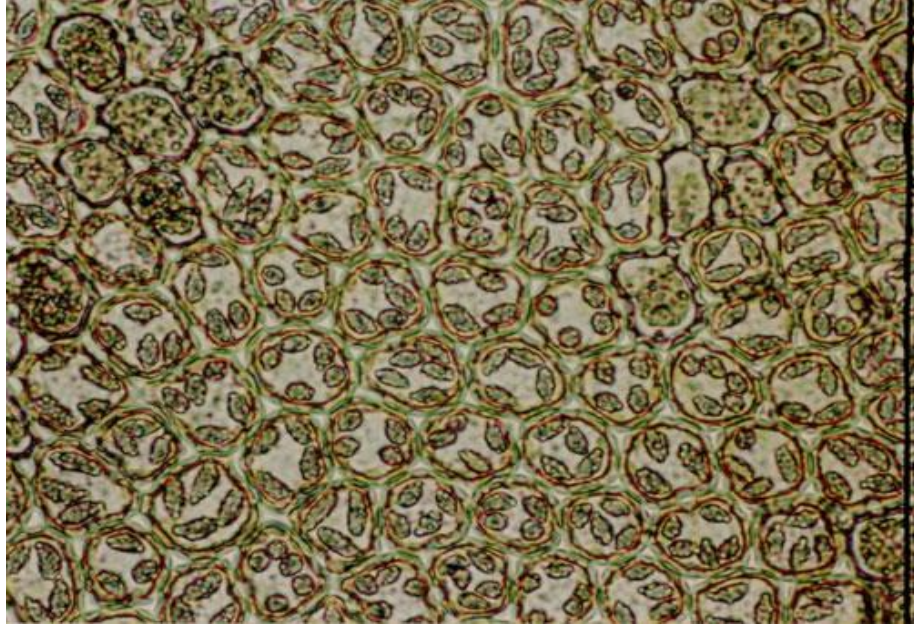
Aşağıda, çeşitli briyofitlerin etken maddeleri olan sekonder metabolitler verilmiştir. Son yıllarda, bitkilerdeki bu metabolitler belirlenerek, bitkilerin faydalı ve zararlı etkileri ortaya çıkartılmaktadır.

1.3 Briyofitlerin Karakteristik Bileşenleri (Sekonder Metabolitler)

Sekonder metabolitler bitkinin faaliyetlerini doğrudan etkilemeyen fakat temel olan bu faaliyetlerle doğrudan ilişkilidir ve primer metabolitler kadar yaşamsal öneme sahip bileşiklerdir (Çolak, 2010).

Briyofitler arasında özellikle ciğerotlarında (Marchantiophyta); lipofil (yağı seven) mono-, sesqui-, ve diterpenoid (küçük aromatik bileşikler) gibi bileşenler bulunmuştur. Son zamanlarda yüzlerce bileşiğe ek olarak yeni bileşenler de izole edilmiştir. Avrupa'da 7 yosun türünden hidrodamıtma yolu ile eterik yağlar elde edilmiştir. Briyofitlerin bileşenleri arasında nitrojen ve sülfür içeren bileşikler çok nadir olarak bulunmuştur (Asakawa vd., 2013).

Briyofitler arasında ciğerotlarında hücrel yağ damlacıkları (Fotoğraf 1.1.) karakteristik özelliklerdendir. Yağ damlacıkları ciğerotlarının sınıflandırılmasında çok önemli yere sahiptir (Asakawa vd., 2013).



Fotoğraf 1.1. Hücrel yağ damlacıkları (Asakawa vd., 2013)

Briyofitlerin çok yaygın bileşeni flavonoidlerdir. Flavonoidler Marchantiophyta (ciğerotları) ve Bryophyta (yapraklı karayosunları) üyelerinden izole edilmiştir. Hemen hemen her ciğerotunda stigmasterol ve squalene bulunmaktadır. Yapraklı karayosunlarında; doymamış yağ asitleri, alkanonlar, triterpenoidler karakteristik özelliklerdir. Boynuzlu ciğerotlarında ise bazı neolignanlar karakteristiktir (Asakawa vd., 2013).

Marchantiophyta'nın biyolojik olarak aktif bileşenleri; güzel kokululuk, acılık, keskinlik, tatlılığın yanı sıra alerjik kontakt dermatit, kalp kuvvetlendirici, kas gevşetici,

bitki büyüme düzenleyici, süperoksit salınımı engelleyici, tromboksan sentez engelleyici, vasopressin aktivitesine karşı çıkıcı, böcek öldürücü, 5-oksijenaz engelleyici, antimikrobiyal, antifungal, sitotoksik etkilerdir (Asakawa vd., 2013).

1.4 *Chiloscyphus polyanthos*'un Genel Özellikleri

Chiloscyphus polyanthos yapraklı bir ciğerotu türüdür. Yapraklar kökten gövdeye doğru üst üste gelecek şekilde dizilidir. Saydam yapraklar yuvarlaktır (Fotoğraf 1.2.) ve altigen hücreler ile 2-4 yağ damlacığı vardır. Bu hücreler nispeten küçüktür. Yaprak altlarında 2 akuminat lob vardır ve her bir tarafında 1 diş bulunur. Bunları görmek zordur. Çok kırılgan ve kolayca tahrip edilebilir. Rizoidleri alt yaprakların düzleminden başlar. *Chiloscyphus polyanthos* kaya üzerinde, ıslak alanlarda yaşar.



Fotoğraf 1.2. *Chiloscyphus polyanthos* ciğerotu türünün mikroskopik görüntüleri (http://www.wnmu.edu/academic/nspages/gilafiora/chiloscyphus_polyanthos.html).

1.5 *Chiloscyphus polyanthos*'un Kullanım Alanları

1.5.1 *Chiloscyphus polyanthos*'un antimikrobiyal etkisi

Tekerlek'in (2013), yaptığı yüksek lisans çalışmasında 5 farklı briyofit türünün (*Dicranum scoparium* Hedw., *Racomitrium canescens* (Hedw.) Brid., *Neckera complanata* (Hedw.) Hub., *Isothecium myosuroides* Brid., *Chiloscyphus polyanthos* (L.) Corda) antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon metodu ve minimal inhibisyon konsantrasyonu belirlenmesi metotları kullanılarak araştırılmıştır. Bitkilere ait ekstraktlar maserasyon yöntemi ile 5 farklı çözücü kullanarak (etanol, metanol, dH₂O, aseton, kloroform) 30 °C ve 40 °C sıcaklıklarda 2, 3, 4 ve 5 saat sürelerde elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan ekstraktların, *Proteus mirabilis* 235 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerine yakın etki gösterdiği ve briyofit ekstraktlarına karşı bu iki bakteri suşunun duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak briyofit ekstraktlarının *Candida albicans* ATCC 26231 suşu üzerinde hiç etkisi görülmemiş ve bu suşun en dirençli suş olduğu tespit edilmiştir (Tekerlek, 2013).

1.5.2 *Chiloscyphus polyanthos*'un doracryl mavi ve astrozon kırmızı renk boyanın giderimi

Tekstil endüstrisinde kullanılan Doracryl Blue ve Astrozon Kırmızı renkli boyar madde oldukça renklidir ve çevre sorunlarına neden olmaktadır. Yapılan bu çalışmada *Chiloscyphus polyanthos* (Erciyes Dağı - Kayseri), Doracryl Blue ve Astrozon Kırmızı renkli boyanın giderimi için belirlenmiştir ve Niğde'de BIRKO'dan örnek alınmıştır. *Cp* tekstil boyalarının renksizleştirilmesi başlangıç pH'ı ve ilk boya konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak incelenmiştir. En uygun pH değeri, renk giderme yüzde verim ile Astrozon Red için pH:4 ve Doracryl Blue için pH:6 olarak saptanmıştır. *C. polyanthos*'un Doracryl Blue boyanın renksizleştirilme kapasitesi başlangıç 100, 200, 300, 400, 500 ppm için ardışık olarak %96,44, % 97,54, % 97.67, % 97.68, % 97,65 boya konsantrasyonu kurulmuştur. Ayrıca *Cp*'un Astrozon Red boyanın giderim kapasitesi 100, 200, 300, 400, 500 ppm için ardışık olarak %,92,60, % 97,45, % 98.05, % 98,22, % 98,42 boya konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, *Cp* ciğerotu türünün yüksek ayırma kapasitesinden dolayı Doracryl mavi ve Astrozon

kırmızı boyanın renksizleşmesi için kullanılabilir olduğu belirlenmiştir (Onat vd., 2013).

BÖLÜM II

LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1 Bitkiler Üzerinde Yapılan Sitotoksik ve Genotoksik Çalışmalar

Son yıllarda etnobotanik çalışmalarla halk arasında ilaç olarak kullanılan bitkilerin ortaya çıkarılması önem kazanmıştır. Bunun sonucu olarak da, bu bitkilerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi zorunlu hale gelmektedir.

2.1.1 Briyofitler ile ilgili yapılan sitotoksik ve genotoksik çalışmalar

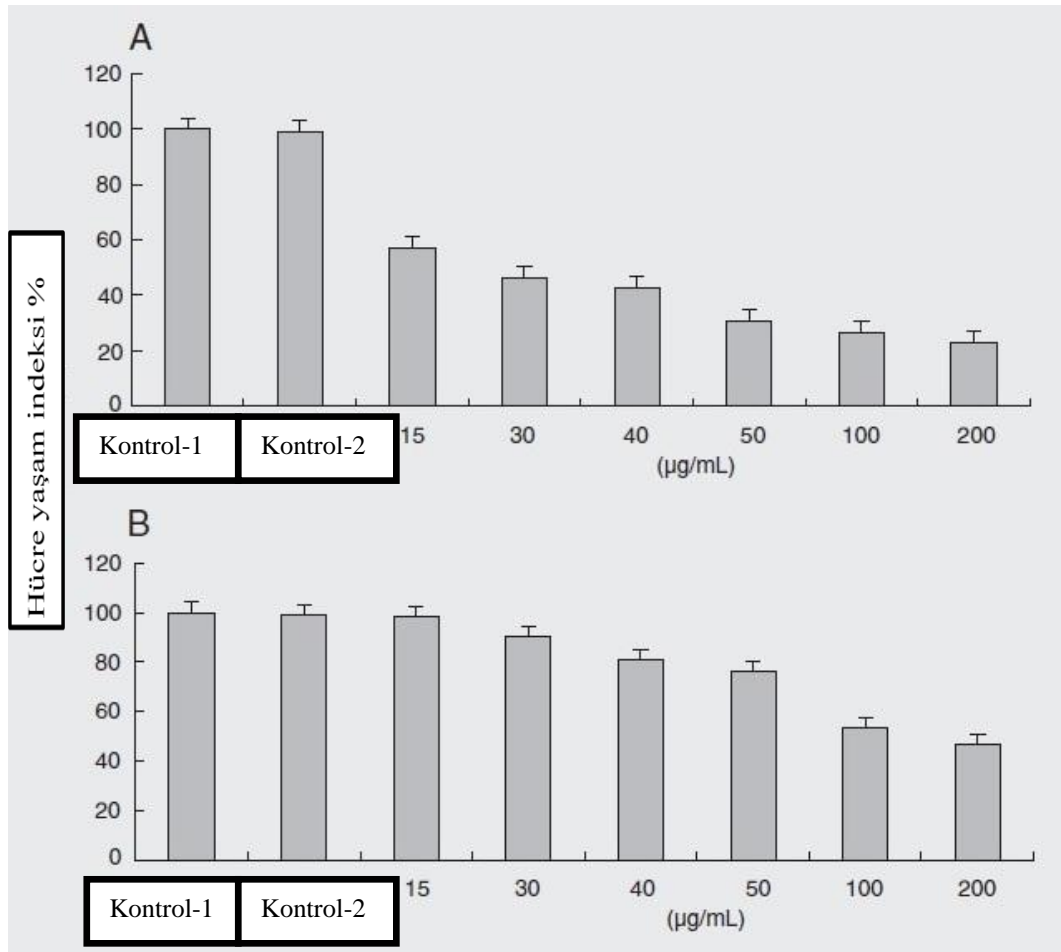
Dünyada briyofitler üzerinde yapılan çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Bu konu üzerine yapılan çeşitli çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Çin'de deri hastalıklarında, karaciğer korumasında, karaciğer iltihabı tedavisinde kullanılan *Marchantia convoluta* ciğerotu türünün insan akciğer kanser hücreleri (H1299) ve karaciğer kanser hücrelerinde (HepG2) sitotoksik etkisi araştırılmıştır. *Marchantia convoluta* bitkisi petrolum eter, etil asetat ve n-bütanol ile ekstre edilip (Çizelge 2.1.); 0, 15, 30, 40, 50, 100, 200 µg/mL ile konsantre edilmiştir. 72 saat inkübasyon süresinden sonra sitotoksisite, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide analizi ile belirlenmiş ve hücrelerin yaşayabildiği koşullar rapor edilmiştir. Ekstraktların önemli derecede sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Etil asetat ekstraktının en yüksek konsantrasyonu 100 µg/mL de akciğer kanserli hücrelerin sayılarını azaltmıştır (Şekil 2.1.). En düşük 15, 30 ve 40 µg/mL konsantrasyonunda karaciğer kanserli hücre sayılarında belirgin olarak azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Etil asetat ekstraktının bileşenleri gas chromatography-mass spectrometry analizi ile tanımlanmış; phytol (23.42%), 1,2,4-tripropylbenzene (13.09%), 9-cedranone (12.75%), ledene oxide (7.22%), caryophyllene (1.82%), caryophyllene oxide (1.15%) bileşenler tespit edilmiştir. HPLC analizi sonucunda etil asetat ekstraktı içinde flavanoidlerin olmadığı, n-bütanol ekstraktında bol miktarda bulunduğu saptanmıştır (Xiao vd., 2006).

Çizelge 2.1. *Marchantia convoluta* ciğerotu türü, H1299 ve HepG2 hücrelerinin ekstraktlara duyarlılığı (Xiao vd., 2006)

Ekstraktlar	IC ₅₀ (µg/mL)	
	H1299	HepG2
Petrolüm eter	>500	>500
Etil asetat	100	30
n-bütanol	>200	>200

Çizelge 2.1.' de H1299 ve HepG2 hücrelerinin tedavisinde, hücre çizgileri petrolum eter ve n-bütanol ekstraktlarına daha dirençli iken, etil asetat ekstraktında hücrelerin kaybolduğu gözlenmiştir. Tabloda etil asetatın IC₅₀ değeri gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Etil asetat ekstraktının H1299 (A) ve HepG2 (B) hücreleri üzerinde inhibitör etkisi (Xiao vd., 2006)

Ulusal Kanser Enstitüsü'nde yaklaşık 35.000 bitki türünden elde edilen ekstraktlar incelenmiş ve bu bitkilerin tümör engelleyici etki gösterip göstermedikleri fareler üzerinde test edilmiş ve türlerin yaklaşık %10' unun etkili olduğu saptanmıştır. Bu belirlenen türlerdeki aktif ajanlar izole edilmiş ve bunların pek çok farklı sınıfın bileşenlerini temsil ettiği bulunmuştur. Bu çalışmada Ulusal Kanser Enstitüsü *Claopodium* cinsine ait 8 türden 3'ü de incelenmiştir. *Claopodium crispifolium*, insan üst yutak epidermoid karsinom hücre kültüründe ve *C. bolanderi* ile *C. whippleanum* lenfotik lösemili (P388) farelerde analiz edilmiştir. Sadece *Claopodium crispifolium*'un hem hücre kültüründe hem de P388 farelerde aktif olduğu belirlenmiştir (Spjut vd., 1988).

Bir karayosunu türü olan *Physcomitrella patens*'in genotoksin kaynaklı mutajenez etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmada, *Physcomitrella patens*'in homolog rekombinasyonu, haploid durumu ve vejetatif büyümenin önceki aşaması olan iplikli büyüme bakımından benzersiz olduğu belirlenmiştir. *Physcomitrella patens* DNA hasarı çalışmalarında mükemmel bir model bitki görevi görmektedir. Bleomycin ile uyarılmış bitkilerde, DNA oksidatif hasarını ve DNA tek-çift iplik kırıklarını belirlemek için tek hücre jel elektroforez deneyi kullanılmıştır. *Physcomitrella* hatlarında LIG_4 mutantları belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, nükleotid seviyesinde mutasyonları tespit etmek için APT geninin, bir marker olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir. LIG_4 fonksiyonlarının yokluğunda DNA çift iplik kırılmalarının tamirinin oluştuğunu, DNA tek iplik tamirini ise tehlikeye düşürdüğünü göstermiştir. Uyarılmış mutasyonların, hücre döngüsündeki ilerlemeyi bloke edici olduğu, normal bitki büyüme ve gelişmesi ile uyumlu olmadığı ve hassas fenotipe yol açtığı saptanmıştır (Hola vd., 2013).

2.1.2 Vasküler bitkiler ile ilgili yapılan sitotoksik ve genotoksik çalışmalar

Lygodium venustum eğreltiotu bitkisinin fenol bileşenlerinin sitotoksik ve anti-kinetoplastik aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışma, layşmanyaz ve şagaz hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde yeni terapötik (şifalı) maddeler bulmak için yapılmıştır. Pek çok ilacın yan etkilerinde sitotoksiteleri değerlendirilip test edilmiştir. *Lygodium venustum* eğreltiotu bitkisinin etanol, etil asetat ve metanol ekstraktları elde edilmiştir. En iyi aktivite metanol ekstraktının 500 µg/mL konsantrasyonunda yaklaşık %63-%68 oranında hastalığı engellediği bulunmuştur. Bitkinin yüksek oranda sitotoksik olduğu

saptanmıştır. *Lygodium venustum*'un sitotoksik ve tripanosidal aktivitesi için ilk rapor olarak sunulmuştur (Morais-Braga vd., 2013).

Şagaz hastalığı halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Günümüzde kemoterapi, bu hastalık için tek mevcut tedavidir ve elde olan kemoterapik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçların değiştirilmesi için bir alternatif olarak Lamiaceae familyasına ait *Hyptis martiusii* bitkisinin doğal ekstreleri antimikrobiyal ve biyolojik faaliyetler nedeniyle geleneksel tıpta kullanılmıştır. *Hyptis martiusii*'nin doğal ürünlerinin tripanosid, sitotoksik ve anti-*Candida* aktiviteleri üzerine çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, *Hyptis martiusii* bitkisinin tripanosid, sitotoksik ve anti-*Candida* aktivitelerini değerlendirmektir. *Hyptis martiusii* bitkisinin etanolik ekstraktı hazırlanmıştır. In vitro antiepipimastigote aktivitesi araştırmak için *Trypanosoma cruzi* CL-B5 paraziti kullanılmıştır. (Bu parazit, şagaz hastalığına sebep olmaktadır.) Epimastigot, $1 \times 10^5 \text{mL}^{-1}$ konsantrasyonunda 200 μL triptoz karaciğeri infüzyonu içerisine aşılacaktır. Sitotoksikite deneyi için J774 makrofajlar kullanılmıştır. Antifungal aktivite için, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* ve *Candida krusei* türleri kullanılmıştır. Bu çalışma *Hyptis martiusii*'nin tripanosid aktivitesi için ilk kayıt olmuştur. Parazitin %50 (IC_{50}) öldürme yeteneğinin etkili konsantrasyonu 4606 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Antifungal minimal önleyici konsantrasyon ≤ 1024 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Metronidazol *H. martiusii* etanol ekstresi ile bir araya getirildiğinde mantara karşı etkinin belirli bir miktar kuvvetlendiğini göstermiştir. Sonuç olarak, *H. martiusii* orta derecede toksisite ile antiepipimastigote ve antifungal değiştirici etkinliğe sahip bir bitki türevli doğal bir ürün kaynağı olabileceğini göstermektedir (Santos vd., 2013).

Verbenaceae familyasının iki tıbbi türünün (*Lantana camara* ve *Lippia alba*) *Lactuca sativa* (marul) kök ucu meristem hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri üzerine çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada bitkilerin sulu ekstraktların en yüksek konsantrasyonlarının, marul kök ucu meristem hücrelerinde mitotik indeksi düşürdüğü ve kromozom aberasyonuna sebep olduğu göstermiştir. *Lantana camara* ve *Lippia alba* özellikle Orta ve Güney Amerika'da yaygın olarak halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada marul tohumları, 72 saat boyunca *L. camara* ve *L. alba*'nın farklı konsantrasyonları (5, 10, 20 ve 30g/L) ile muamele edilerek sitotoksik ve genotoksik etkisi belirlenmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca çimlenme yüzdesi, kök gelişimi ve hücresel davranışı da analiz edilmiştir. Sonuçlara göre, *L. camara* sulu ekstraktının 30g/L

konsantrasyonunda ve *L. alba* sulu ekstraktının 20g/L konsantrasyonunun tohumların çimlenmesini, marulun kök gelişimini ve mitotik indeksi düşürdüğünü göstermiştir ($p < 0.05$). *L. camara* 30g/L konsantrasyonunda 33.76 (± 4.92), *L. alba* 20g/L konsantrasyonunda 39.21 (± 7.87) yüzdesinde hücrel ölüm gerçekleştirdiği de belirlenmiştir (Sousa vd., 2009).

Lamiaceae familyasına ait *Salvia fruticosa* (*Sf*) bitkisinin yaprak ekstraktının metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkileri; kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormallığı (KA), mikronükleus (MN) testleri ile araştırılmıştır. *Sf* yaprak ekstraktının sitotoksik etkisi de mitotik indeks (MI), proliferasyon indeksi (PI) ve nükleus bölünme indeksinin (NBI) hesaplanması ile saptanmıştır. Bu amaçla *Sf* yaprak ekstraktının 1.5, 3.0 ve 6.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir. Metabolik aktivatör yokluğunda *Sf* yaprak ekstraktı KKD sayısını sadece 48 saatlik muamele süresinde artırmıştır. Tüm muamele sürelerinde ise KA sayısını artırmış, Mitomycin C (MMC) ile beraber uygulandığında da MMC'nin etkisini sinerjik bir şekilde indüklemiş fakat en yüksek dozda KKD oluşumu üzerine MMC'nin etkisini artırmamıştır. Bu sonuçlara paralel olarak *Sf* yaprak ekstraktı MN sayısını da artırmış, 24 saatlik muamele süresinde MMC'nin etkisini indüklerken 48 saatlik muamele sürelerinde MMC'nin etkisini azaltmıştır. Metabolik aktivatör varlığında *Sf* yaprak ekstraktı KKD sayısını sadece muamelesiz kontrole nazaran artırmış ama cyclophosphamide (Cyp)'nin etkisini azaltmıştır. En yüksek dozda *Sf* yaprak ekstraktı KA sayısını ve anormal hücre yüzdesini indüklemiş fakat Cyp'nin etkisini artırmamıştır. *Sf* yaprak ekstraktı tek başına MN oluşumunu artırırken Cyp ile beraber kullanıldığında MN oluşumunu indüklememiştir. Metabolik aktivatör yokluğunda *Sf* yaprak ekstraktı tek başına MI'yi düşürerek sitotoksik etki yapmış fakat PI ve NBI'yi düşürmemiştir. Metabolik aktivatör varlığında ise sitotoksik olmadığı, yüksek dozlarda ise Cyp'nin sitotoksik etkisini artırdığı saptanmıştır (Kopar, 2010).

Lamiaceae familyasına ait *Stachys petrokosmos* (*Sp*) bitkisinin yaprak ekstraktının metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla insan lenfositleri, metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda *Sp* bitkisinin 1.5, 3.0 ve 6.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonlarındaki yaprak metanol ekstraktları ile 24 ve 48 saat muamele

edilmiştir. *Sp* bitki ekstraktının in vitro genotoksik etkisi, KKD, KA ve MN testleriyle, sitotoksik etkisi de NBI, PI ve MI saptanmasıyla belirlenmiştir. Ayrıca *Sp* yaprak ekstraktının mitomycin C ve Cyclophosphamide'ye karşı anti-genotoksik etkisi de yine metabolik aktivatör yokluğunda ve varlığında çalışılmıştır. Metabolik aktivatör yokluğunda *Sp* yaprak ekstraktı tek başına KKD sayısını sadece en yüksek dozlarda artırmış, KA'yı tüm dozlarda uyarılmış fakat MN sayısını artırmamıştır. Bununla birlikte *Sp* yaprak ekstraktı MMC'nin KA oluşumu üzerindeki etkisini azaltmıştır. *Sp* yaprak ekstraktının tek başına sadece yüksek dozlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu, yine sadece yüksek dozlarda MMC'nin sitotoksik etkisini artırdığı saptanmıştır. Metabolik aktivatör varlığında *Sp* yaprak ekstraktının genotoksik ve sitotoksik olmadığı, fakat Cyp'nin KKD ve MN oluşumu üzerindeki etkisini azaltarak anti-genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Yıldız, 2010).

Asphodelaceae familyasına ait *Aloe vera* (*Av*) bitkisinin yaprak ekstraktının genotoksik ve anti-genotoksik etkileri sıçan kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyon testi (KA), insan lenfositlerinde KKD, MN, KA testleri ve Ames/Salmonella/Mikrozom test sistemleri ile araştırılmıştır. *Aloe vera* ekstraktı sıçan kemik iliği hücrelerinde uygulanan tüm konsantrasyon ve muamele sürelerinde yapısal ve total kromozom anormalliklerini önemli düzeyde uyarmıştır. *Av*, insan lenfositlerinde ortalama KKD sayısını artırmamış; fakat MN frekansı ve yapısal kromozom anormalliklerini istatistiksel olarak önemli düzeyde artırmıştır. *Av* insan lenfositlerinde replikasyon indeksini, mitotik indeksi ve nükleus bölünme indeksini düşürerek, sıçan kemik iliği hücrelerinde ise sadece mitotik indeksi düşürerek sitotoksik etki göstermiştir. *Av*, sıçan kemik iliği hücrelerinde uretanın (etil karbamat) insan lenfositlerinde ise mitomisin-C'nin genotoksik ve sitotoksik etkisini düşürmemiştir. *Av*, *Salmonella typhimurium*'un TA98 suşu üzerinde S9mix yokluğunda zayıf mutajenik etki gösterirken, *Av*+NPD (4-nitro-o-phenylenediamine) ve *Av*+SA (sodium azide) karışımları TA98 ve TA100 suşlarında S9mix'in yokluğunda revertantların sayısını sinerjistik olarak artırmıştır (Kayraldız vd., 2010).

Fabaceae familyasına ait *Cerotonia siliqua* bitkisinin, n-hegzane, metanol, etanol, etil asetat ve su ekstraktlarının, antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri, bakteri olarak *Escherichia coli* ATCC 29998, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 11230, *Staphylococcus aureus*

ATCC 6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella thyphimurium* CCM 5445, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve mantar olarak *Candida albicans* ATCC 10239'a karşı disk difüzyon metodu ile tayin edildi. Ekstraktların sitotoksik aktiviteleri brine shrimp yöntemiyle değerlendirilmiştir. Etanol, metanol ve su ekstraktları brine shrimp'e karşı sitotoksik aktivite göstermiştir (Kıvçak vd., 2002).

Asteraceae familyasına ait *Centaurea* bitkisinin antiinflamatuar, antipiretik, antimalaryal, antimikrobiyal, antiviral, antifitoviral, antiülserojenik, düz kaslar üzerine etki, hipoglisemik etki, immunolojik etki, nörotoksik etki, sitotoksik etki ve vazodilatör etkisi üzerinde derleme yapılmıştır. *Centaurea* türleri halk arasında tek başına veya diğer bitkilerle birlikte antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antiinflamatuar, kolagog, koleretik, dijestif, stomaşık, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotansif, antipiretik, sitotoksik, antibakteriyel amaçla kullanılmaktadır. Gürkan ve Sarioğlu, *C.behe*n toprak üstü kısımlarından izole ettikleri solstitialin monoasetat'ın Brine Shrimp yöntemi ile yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Gürkan ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada Asteraceae familyasına ait bazı bitkilerin sitotoksik etkileri incelenmiştir. *C. behe*n ve *C. kotshyi*'nin de yer aldığı bu çalışmada, bitkilerin toprak üstü kısımlarından izole edilen bileşiklerin Brine Shrimp yöntemiyle sitotoksik etkileri incelenmiştir. İncelenen 8 madde arasında en fazla sitotoksik etkiyi *C. behe*n'den izole edilen solstitialin monoasetat'ın gösterdiği belirlenmiştir (Arif vd., 2004).

Adoxaceae familyasına ait *Sambucus ebulus* bitkisinin çiçek, meyve ve yapraklarının alkol ekstraktları ile yaprak ekstraktlarının toluen, kloroform ve etil asetat fraksiyonları, sitotoksik ve anti-karsinojenik etkileri bakımından değerlendirilmiştir. Çözücünün (%0.05-0.1 konsantrasyonlarında DMSO) hücreler üzerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir sitotoksik etkisi saptanmamıştır. 1= Çiçek; 2= Meyve; 3= Yaprak; 3a= Yaprak-toluen; 3b= Yaprak-kloroform; 3c= Yaprak-etilasetat olmak üzere 6 adet ekstraktın sitotoksik ve anti-karsinojenik aktivitesi test edilmiştir. L-929 hücre hattında 10µg/mL konsantrasyonda denenen ekstraktlar ile elde edilen maksimum büyüme engelleyici değeri 3c ekstraktı ile elde edilen % 33.25 dir (p<0.05). %50 ve üzeri sitotoksikite değerleri sitotoksik olarak değerlendirilir. Çalışmada elde edilen

değer % 50'nin altında olduğu için denenen ekstraktlar L-929 hücre hattı için sitotoksik olmadığı belirlenmiştir. HeLa hücre hattında 10 µg/mL konsantrasyonda gerçekleştirilen anti-karsinojenik aktivitenin belirlenmesine yönelik çalışmada ise 3c ekstraktı ile % 46,67 düzeyinde büyüme engelleyici olduğu elde edilmiştir. Elde edilen değerlerin neredeyse %50 olması dikkate değerdir. Büyümeyi engelleme açısından ekstraktlar arasında bir sıralama yapılması istendiğinde 3c (%46,67) > 3 (%33,81) > 3b (%29,76) > 1 (%27,38) şeklinde bir sıralama yapılabilir (p<0.05) (Meriç vd., 2010).

5 tıbbi bitkinin (*Azadirachta indica*, *Morinda lucida*, *Cymbopogon citratus*, *Mangifera indica* ve *Carica papaya*) sulu ekstraktlarının sitotoksik ve genotoksik etkisi araştırılmıştır. Sitotoksik ve genotoksik etkiyi belirlemek için *Allium cepa* analizi kullanılmıştır. Ekstraktlar yerel olarak musluk suyu ile uygulanarak hazırlanmıştır. Soğan ampulleri makroskobik ve mikroskobik analizler için ekstraktların her biri sırasıyla %1, %5, %10, %25 ve %50 konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Konsantrasyon- bağıllık ilişkisi, kök büyümesinin engellenmesi kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) bulunmuştur. *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus*, *Mangifera indica* ve *Carica papaya* türlerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla %0.6, %3.0, %1.4 ve %0.8 olarak gözlenmiştir. *Azadirachta indica* ve *Morinda lucida* türlerinin sıkılmış özlerinin EC₅₀ değeri sırasıyla % 2.6 ve % 0.8 olarak bulunmuştur. *Allium cepa* analizinde test edilen tüm ekstraktlar, hücre bölünmesi ve indüklenen mitotik iğ rahatsızlığı üzerinde mitodepresif etkileri olduğu saptanmıştır (Akinboro ve Bakare, 2007).

Manyok atıklarının sitotoksik ve genotoksik etkileri, *Allium cepa* analizi kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada, üç popüler Nijerya yemeği olan garri, lafun ve akpu yemeklerinin atıkları modifiye edilmiştir. *Allium cepa* analizi uygulanarak, manyok yumrularından elde edilen atıkların potansiyel genotoksik etkileri araştırılmıştır. 10 soğan ampul serisine, test örneklerinin her biri (garri, lafun ve akpu) %0.001, %0.01, %0.1, %1.0 ve %10 konsantrasyonları içerisine kültüre edilmiştir. 48 saatte tedavi ampullerden kök uçları asetokarmin ya da orceinorcein kabak tekniği ile sitotoksik çalışmalar için işleme alınmıştır. Atıklarla 72 saat muamele edilen soğan kök uçlarında (özellikle yüksek konsantrasyonlarda) güçlü büyüme geriliği saptanmıştır. Garri, lafun ve akpu atıkları için sırasıyla EC₅₀ değerleri %1.5, %2.5 ve %3.5 bulunmuştur. Atıkların fiziko-kimyasal özellikleri siyanür ve ağır metallerin önemli miktarda varlığını ortaya

koymaktadır. Kök uzunluğu inhibisyonu, kırılma ve malformasyonlar 'tığ kancaları' ve c-tümör varlığı düşük konsantrasyonlarda (10^{-1} , 10^{-2} , ve 10^{-3}) karakterize edilmiştir. Atık konsantrasyonunun artması ile mitotik indekste hızlı bir düşüş olmuştur. Kök ucu hücrelerinde atıklar ile indüklenen kromozom aberasyonu istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. Mevcut bulgular, manyok atığında bulunan maddelerin, yaşayan organizmalar için toksik olabileceği ve çevreyi kirletebileceği yönündedir (Olorunfemi vd., 2010).

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada materyal olarak ilaç ve alkol kullanmayan, sigara içmeyen 20-24 yaşları arasında sağlıklı iki bayan ve iki erkekten alınan periferik kan ve test maddesi olarak Geocalycaceae familyasına ait *Chiloscyphus polyanthos* (Cp) ciğerotu türünün ekstraktı kullanılmıştır.

Bu çalışmanın etik kurallara uygunluğu, Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 09.05.2014 tarih ve 2014/292 no'lu kararı ile onaylanmıştır.

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

3.1.1.1 *Chiloscyphus polyanthos* (L.) Corda

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Cp bitkisi (Fotoğraf 3.1. ve Fotoğraf 3.2.), akarsular başta olmak üzere sulak alanları seven, sucul bir ciğerotu türüdür. Özellikle akarsu içerisindeki kayalar üzerinde bulunurlar. Aynı zamanda ıslak zeminlerde de yaşarlar. Yaprakları yarı saydam, 2 mm uzunluğunda ve yaprakları altında küçük yan dişlere sahiptir (Tekerek, 2013).

Yayılışı; Türkiye, Avrupa, Asya, Kuzey Amerika, Faroe Adaları, İzlanda, Japonya, Azor, Madeira Adaları, Tunus' tur (Bozdoğan, 2012).

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Bryobiotina

Divisio: Marchantiophyta

Familiya: Geocalycaceae H. Klinggr.

Genus: *Chiloscyphus*

Species: *Chiloscyphus polyanthos* (L.) Corda (Bozdoğan, 2012)



Fotoğraf 3.1. *Chiloscyphus polyanthos* (L.) Corda (Tekerlek, 2013)



Fotoğraf 3.2. *Chiloscyphus polyanthos* (L.) Corda (Tekerlek, 2013)

3.1.1.2 Etanol

Bu çalışmada etanol (Merck), hem *Cp* bitkisinin ekstrakte edilmesinde hem de çözücü kontrol olarak kullanılmıştır.

3.1.1.3 Kromozom medyumunu

Bu çalışmada Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (cat. no. F 5023), hücre kültürü için kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki bileşikler verilen miktarlarda bulunmaktadır:

MEM JOKLIK with

Non essential Amino Acids.....	850 mL
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin M.....	2.5 mg

Bu medyum steril kültür tüplerine 2.5 mL olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır.

3.1.1.4 Kolşisin (colchicine)

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (kolşisin) (Sigma Cat. No. C-9754) kullanılmıştır. 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 ilave edilmiştir. Kolşisine ait özellikler aşağıda verilmiştir:

Kimyasal adı: Colchicine

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅NO₆

Molekül ağırlığı: 399.4

Etil asetat içeriği: % 3,4

Kloroform içeriği: < % 0,1

Sigma No: C-9754

3.1.1.5 Hipotonik eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı bir cam kaptaki buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar alınıp 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.1.6 Fiksatif

Kromozom Aberasyonu (KA) deneylerinde 1 hacim glasiyel asetik asetin 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu fiksatif hazırlanmıştır. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce taze olarak hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her preparasyon işleminden önce aynı şekilde tekrar edilmiştir.

3.1.1.7 Sorensen tamponu (sorensen buffer)

%5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında kullanılan sorensen tamponu, tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmıştır.

Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH₂PO₄, 250 mL saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 gr Na₂HPO₄.12H₂O, 250 mL saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

3.1.1.8 Giemsa (merck)

Giemsa boyası (Merck, Cat. No. 9204), Sorensen tamponu ile %5'lik boya eriyiği şeklinde hazırlanarak, kromozom preparatlarını boyamak için kullanılmıştır.

3.1.1.9 Entellan (merck)

Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek için lam ile lameli birbirine yapıştırmak amacıyla kullanılmıştır (Merck, Cat. No. 7961).

3.1.1.10 Nitrik asit (HNO₃)

Lamları temizlemek amacıyla 1 N HNO₃ çözelti olarak hazırlanmıştır. Şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.1.1.11 Mitomycin c (MMC)

Bu çalışmada, Mitomycin C pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Mitomycin C

Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

Molekül ağırlığı: 334.327 g/mol

Erime noktası: 360 °C

CAS no: 50-07-7

3.1.2 Kullanılan deney ekipmanları

3.1.2.1 Hassas terazi

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 g hassasiyetindeki RADWAG - AS 220/C/2 marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.2 Santrifüj

4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, maksimum 30 dakikalık zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli KA-1000 marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2.3 İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye kadar ısıtılmasında ST-055 marka inkübatör kullanılmıştır.

3.2 Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üstlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak 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 saklanmıştır.

3.3 Ekstraksiyon

3.3.1.Bitki materyalinin toplanması

Cp ciğerotu türüne ait örnekler, Kayseri ili Develi ilçesinde Büyüleyen Göl çevresinden toplanmıştır.

3.3.2 Bitki ekstraktı hazırlama

Çalışılan bitki saf su ile yıkanıp, kurutulmuştur (Fotoğraf 3.3.). Kuruyan bitki porselen havanda ezilip toz haline getirilmiştir. Toz haldeki bitki hassas terazi yardımıyla tartılmış ve filtre kağıdına sarılıp 96 saat %96'lık etil alkolde bekletilmiştir. 96 saatin bitiminde alkol petri kaplarına doldurulup uçurulmuştur. Alkolü uçan bitkiden arta kalan bitki etken maddesi bistüri yardımıyla kazanarak deney tüpüne konulmuştur. Daha sonra gerekli seyreltmeler yapılarak istenen konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Ayrıca ekstrakt içerisindeki etken maddeler Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi (GC/MS) kullanılarak belirlenmiştir.



Fotoğraf 3.3. Kurutma kağıdına bırakılan briyofit örneği

3.4 Sitotoksisite ve Genotoksisite Çalışmaları

3.4.1 Kromozom anomalilerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması, test maddelerinin kültüre ilave edilmesi ve preparatların hazırlanması

3.4.1.1 Hücre kültürünün yapılması ve test maddelerinin kültüre ilave edilmesi

Evans'ın geliştirdiği hücre kültürü yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (Evans, 1984).

Sigara içmeyen 20-24 yaşları arasında ilaç ve alkol kullanmayan sağlıklı iki bayan ve iki erkekten alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örneklerinden 6 damla (0.2 mL) kromozom medyumlarına steril şartlarda ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Kanın ilavesinden hemen sonra kültür 37°C'deki inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir. Test maddesinin ön çalışma sonucu belirlenen 3 konsantrasyonu (2.5, 5 ve 10 µg/mL) kültür ortamına kültürün başlangıcından 24 ve 48 saat sonra ilave edilmiş ve hücrelerin test maddesiyle 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 µg/mL) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 2000 devir/dk (rpm)'da 5 dk santrifüj edilmiş, hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Üstte kalan

süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 mL'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik olarak KCl ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun olmayan preparatlar hazırlanmaktadır. Her tüpe 5 mL hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 15 dk hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk 1200 devir/dk'da santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 mL olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekir. 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 pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine 75 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla hücre süspansiyonu damlatılarak 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.

3.4.1.2 Preparatların boyanması ve daimi preparatların hazırlanması

Kuruyan preparatlar şalelere dizilmiştir. Preparatların boyanması için %5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır. Hazırlanan %5'lik Giemsa boyası; 5 mL tampon A, 5 mL tampon B ve 5 mL Giemsa'nın karıştırılarak 100 mL saf suya tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan boya preparatların bulunduğu şalelere dökülerek yaklaşık olarak 20 dk bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmıştır. 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 daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

3.4.2 Kromozom anomaliji için hazırlanan preparatlarda mikroskopik inceleme

3.4.2.1 Sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik inceleme

Sitotoksik etkiyi belirlemek için, mitotik indeks (MI) hesaplanmıştır. Hazırlanmış olan preparatlar OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskopunda 40'lık objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). İnceleme sırasında her preparat için 3000 hücre sayılmıştır. 3000 hücre içerisinde bölünen hücreler belirlenmiş ve yüzdesi alınmıştır. MI yüzdesi belirlenen preparatların verileri, SPSS 15.0 analiz programı kullanılarak bilgiler girilmiştir. Analiz sonucuna göre yapılan *Cp* bitki ekstraktının sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

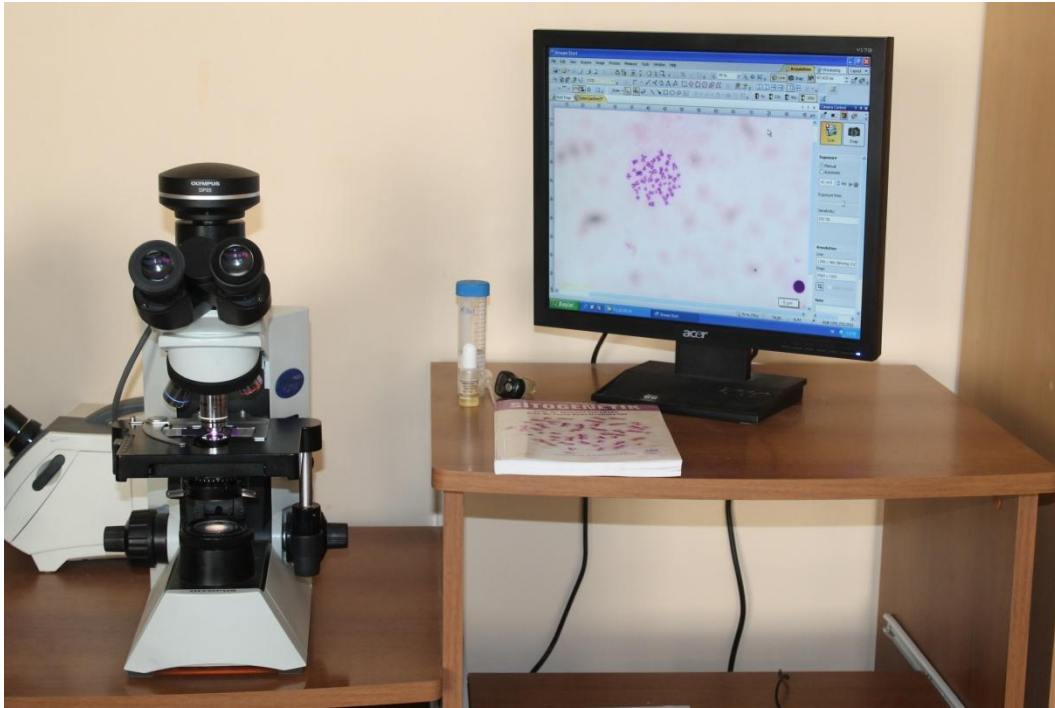
3.4.2.2 Genotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik inceleme

MI' sını belirlenmiş olan daimi preparatların genotoksik etkisi OLYMPUS CX31 marka binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10 x 100 = 1000 büyütmede).

İki bayan ve iki erkek olmak üzere dört kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (dört kişiden 400 hücre) kromozom anomalijini (KA) saptamak amacıyla incelenmiştir. İnceleme sırasında hücrelerde gözlenen kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, sister union (kardeş kromatit birleşimi) gibi yapısal KA verileri kaydedilmiştir. Sayısal KA verileri kromatit birleşimi) gibi yapısal KA verileri kaydedilmiştir. Yaptığımız incelemelerde poliploidi ve endoreduplikasyon gözlenmediği için sayısal KA verisi saptanmamıştır. Bu çalışmada 'gap' lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir.

3.4.2.3 Mikroskopta fotoğraf çekimi

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS CX31 marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğrafların görüntülenmesi için, TÜBİTAK tarafından sağlanmış olan bütçe ile laboratuvarımıza alınan OLYMPUS DP25 marka mikroskop kamerası ve ACER marka bilgisayar monitörü ile sağlanmıştır (Fotoğraf 3.4.).



Fotoğraf 3.4. Mikroskopta fotoğraf çekimi

İncelemeler sırasında rastlanan bazı kromozom anomalilerinin fotoğrafları çekilmiştir.

3.4.2.4 İstatistiksel analiz ve sonuçların değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz SPSS 15.0 for Windows kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar $P \leq 0,05$ anlamlılık düzeyine göre istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. KA'lı hücre oranları, KA'lı hücre sayıları, MI oranları 24 ve 48 saat muameleler ile birlikte farkın olup olmadığı ONE WAY ANOVA (Post Hoc Analiz-LSD Test) ile analiz edilmiştir. Ayrıca doz etki ilişkisi olup olmadığı regresyon ve korelasyon analizi ile belirlenmiştir.

BÖLÜM IV

BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 *Chiloscyphus polyanthos* Bitki Ekstraktının Kromozom Anomalilerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

İnsan periferel kan lenfositlerine, *Chiloscyphus polyanthos* (*Cp*) bitki ekstraktından 2.5, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlar ile 24 ve 48 saat olmak üzere iki farklı muamele süresi uygulanmıştır.

İncelemeler sonucunda elde ettiğimiz KA verilerinin, ANOVA analizine göre $P \leq 0,05$ değerine göre önemli olduğu, fakat LSD analizinde önemli olmadığı tespit edilmiştir.

Cp bitki ekstraktı ile 24 saat muamele edilen insan periferel kan lenfositlerinde, tüm konsantrasyonlarda (2.5, 5 ve 10 µg/mL) yapısal KA taşıyan hücre %'si kontrol, eritici kontrol (etanol) ve pozitif kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 4.1.).

Cp bitki ekstraktı ile 48 saat muamele edilen insan periferel kan lenfositlerinde tüm konsantrasyonlarda (2.5, 5 ve 10 µg/mL), yapısal KA taşıyan hücre %'si kontrol, eritici kontrol (etanol) ve pozitif kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Değişik konsantrasyonlarda *Chiloscyphus polyanthos* ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerindeki kromozom anomalileri

Test maddesi	Muamele		Kromozomal Anomaliler Yapısal KA		Yapısal KA Taşıyan Hücre %'si ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/mL)	Kromatid tipi	Kromozom tipi	
Kontrol	--	--	16	10	6,50±1,19
Etanol (EK)	24	10µL/mL	20	8	7,00±3,46
MMC (PK)	24	0,20	71	63	27.50±6.24 a ₃ b ₃
<i>Cp</i> bitki konsantrasyonu	24	2,5 5 10	18 22 27	16 16 12	8,50±2,22 9,50±1,44 9,75±1,03
Etanol (EK)	48	10µL/mL	18	6	6,00±0,00
MMC (PK)	48	0,20	180	153	54.00±13.83 a ₃ b ₃
<i>Cp</i> bitki konsantrasyonu	48	2,5 5 10	28 26 27	14 19 27	10,50±2,87 11,25±3,54 13,50±1,94

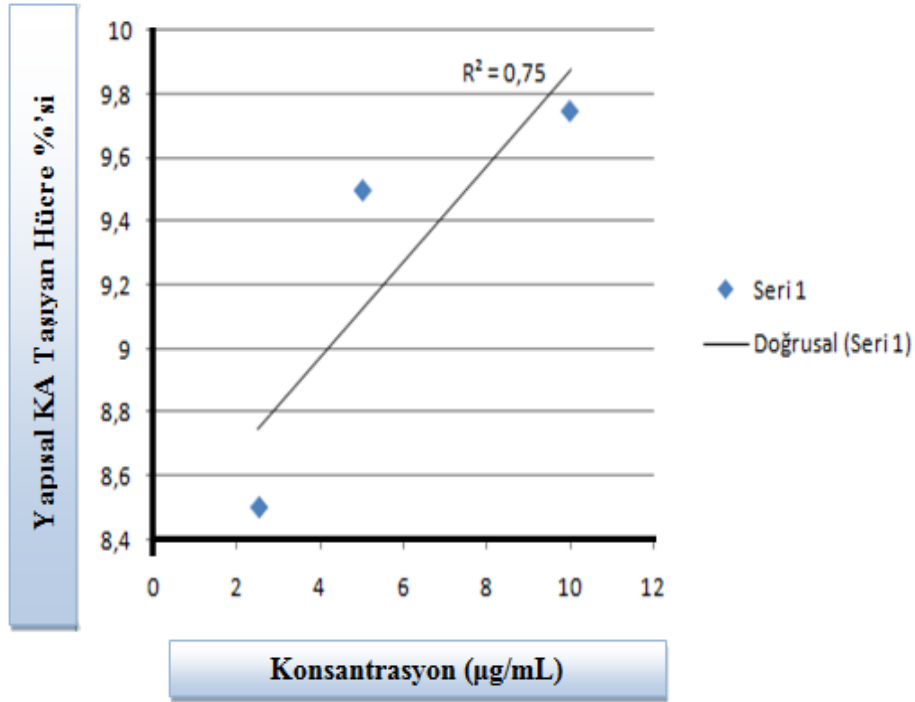
a: Kontrol ile; b: Alkol kontrol ile; c: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁c₁: P≤0,05

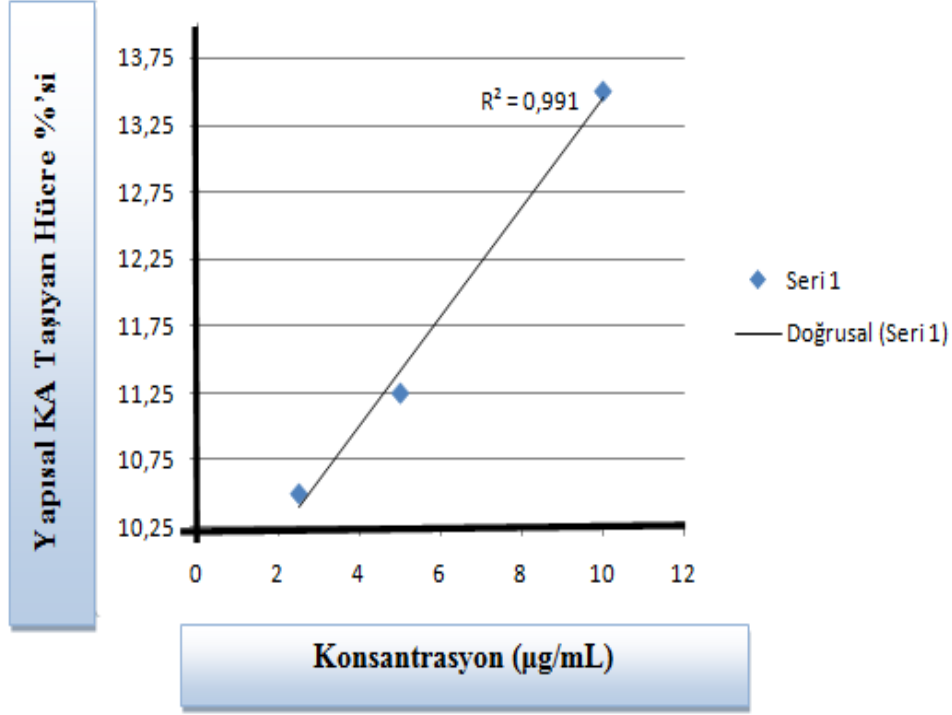
a₂b₂c₂: P≤0,01

a₃b₃c₃: P≤0,001

İnsan periferel kan lenfositleri, *Cp* bitki ekstraktı (2.5, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlar) ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Konsantrasyon-etki ilişkisi belirlemek için korelasyon ve regresyon analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda konsantrasyonların korelasyonu önemli çıkmıştır. Korelasyon önemli bulunduğundan regresyon analizi yapılmıştır. *Cp* bitki ekstraktı (2.5, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlar) ile 24 saat muamele edilen kültürlerde yapısal KA taşıyan hücre %'si istatistiksel olarak önemli bir şekilde konsantrasyonuna bağlı artış göstermiştir ($R^2=0,75$, **: $P=0,01$) (Şekil 4.1.). Aynı şekilde 48 saat muamelede de yapısal KA %'si istatistiksel olarak artmıştır ($R^2=0,991$, **: $P=0,01$) (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki (2.5, 5 ve 10 µg/mL) *Cp* bitki ekstraktı ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde, yapısal KA taşıyan hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P \leq 0,01$).

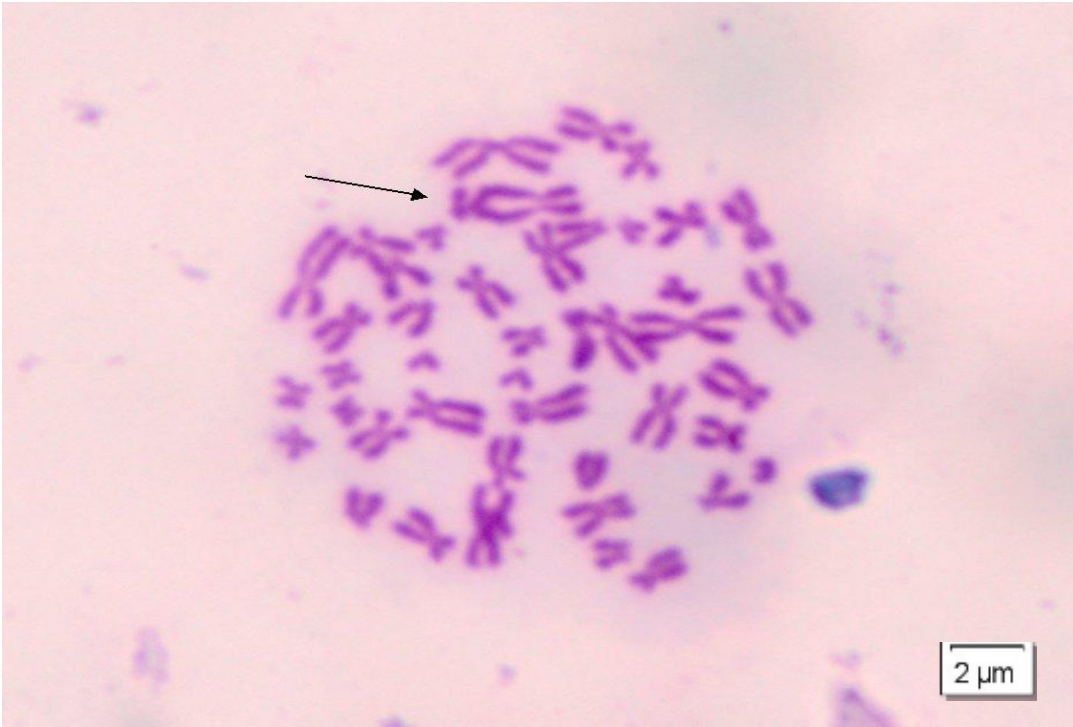


Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki (2.5, 5ve 10 µg/mL) *Cp* bitki ekstraktı ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde, yapısal KA taşıyan hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P \leq 0,01$).

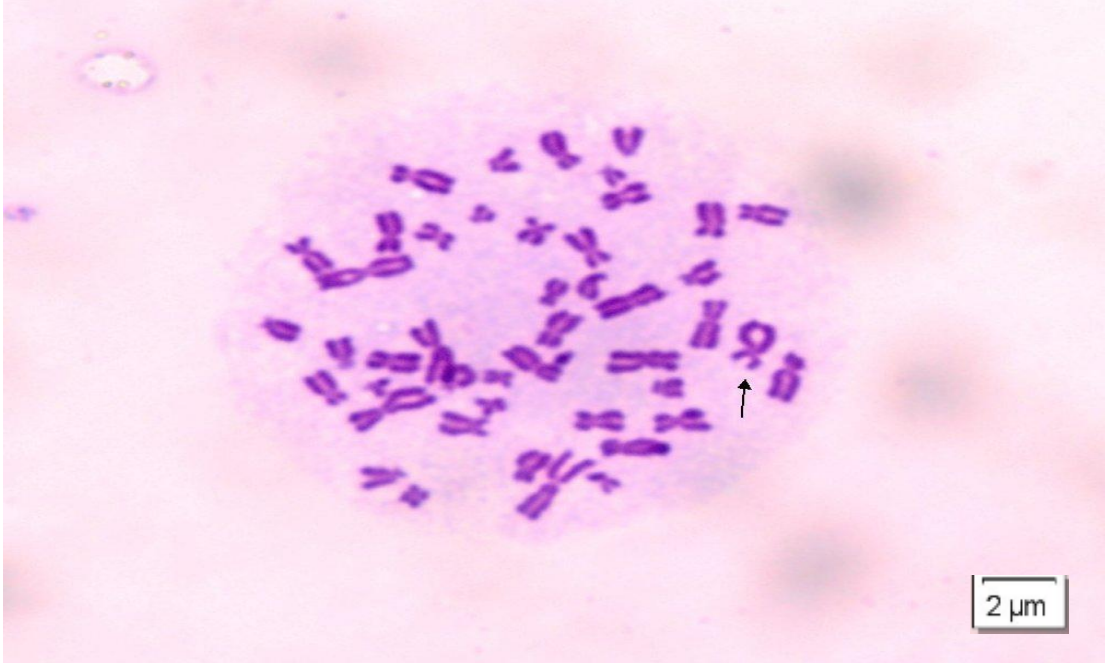
Cp bitki ekstraktının insan periferel kan lenfositlerinde farklı konsantrasyonlarda oluşan kromatid kırıkları (Fotoğraf 4.1., Fotoğraf 4.4., Fotoğraf 4.5., Fotoğraf 4.13., Fotoğraf 4.14., Fotoğraf 4.15., Fotoğraf 4.17.), kromozom kırıkları (Fotoğraf 4.7., Fotoğraf 4.10., Fotoğraf 4.11., Fotoğraf 4.14.), disentrik kromozom (Fotoğraf 4.2., Fotoğraf 4.6., Fotoğraf 4.15., Fotoğraf 4.16., Fotoğraf 4.17.), sister union (Fotoğraf 4.3., Fotoğraf 4.4., Fotoğraf 4.15.), kromozom exchange (Fotoğraf 4.8., Fotoğraf 4.9., Fotoğraf 4.18.) ve fragment (Fotoğraf 4.12., Fotoğraf 4.15.) gibi yapısal anomalilere yol açmıştır.



Fotoğraf 4.1. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL *Chiloscypus polyanthos*, 48 saatlik muamele, ♂, X1000)



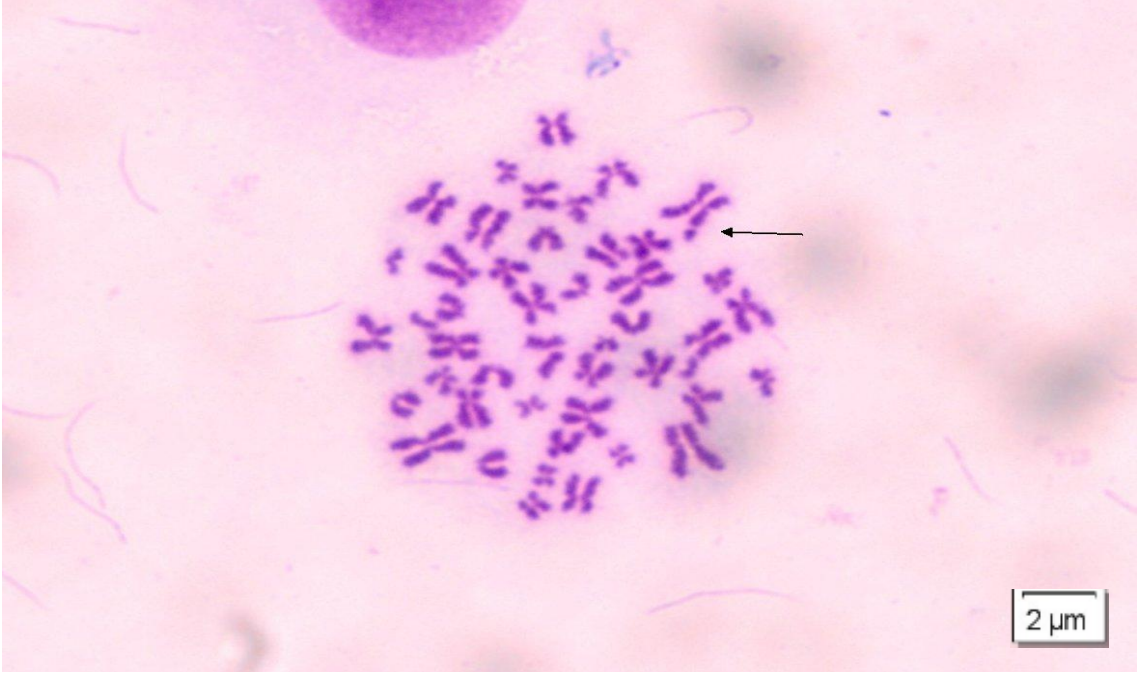
Fotoğraf 4.2. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL *Chiloscypus polyanthos*, 24 saat muamele, ♂, X1000)



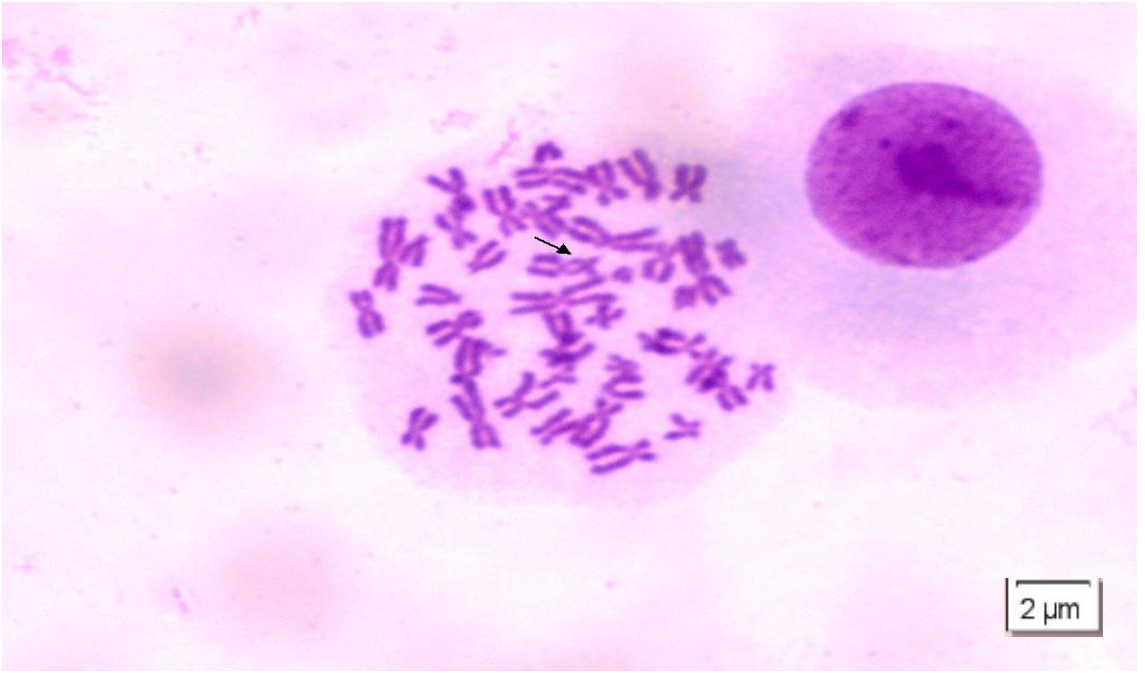
Fotoğraf 4.3. Sister union (SU) bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 24 saat muamele, ♀, X1000)



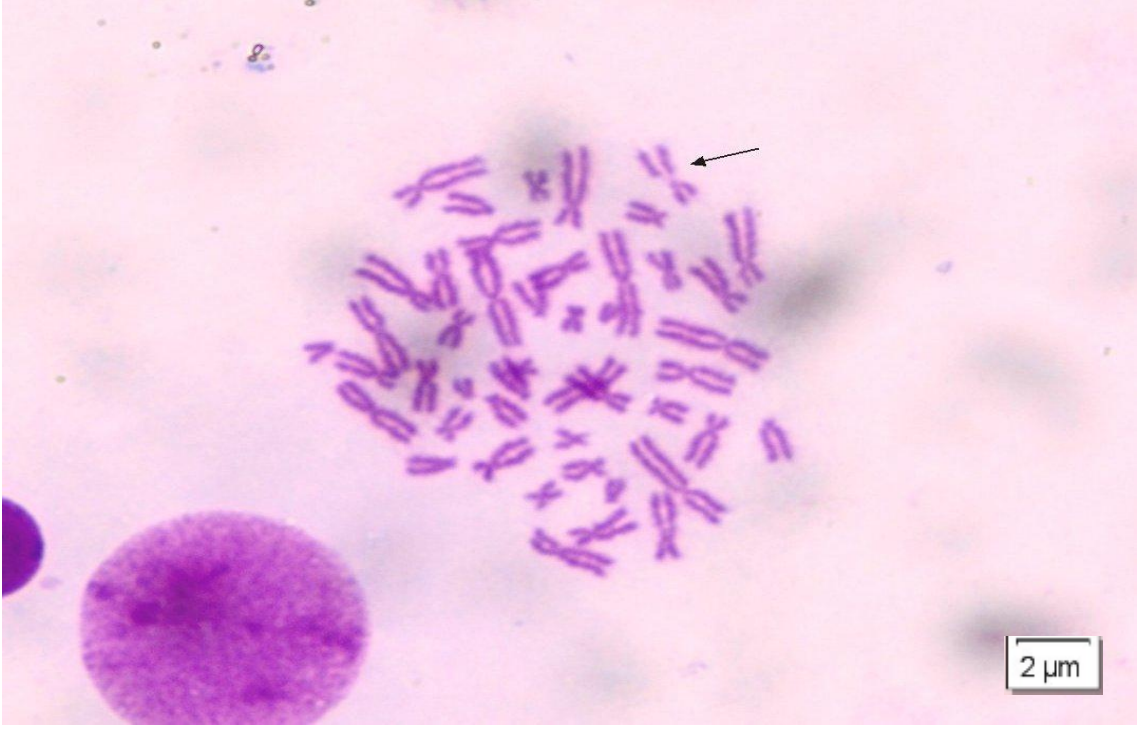
Fotoğraf 4.4. Sister union (SU) ve kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (5 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 48 saat muamele, ♀, X1000)



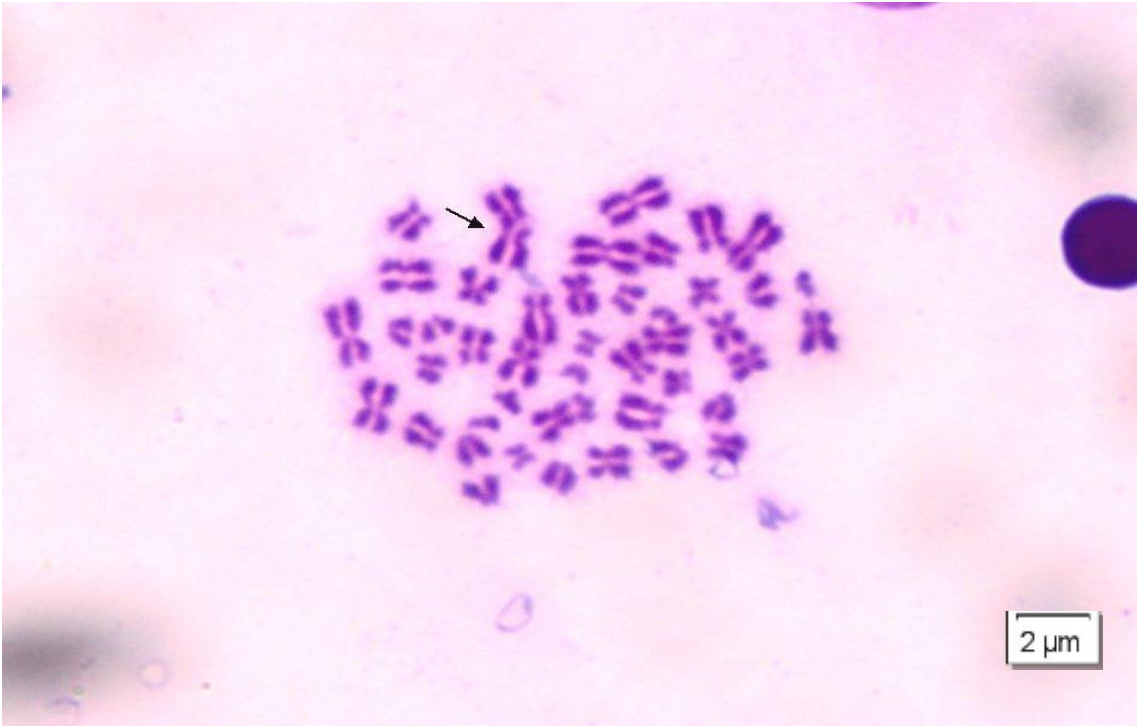
Fotoğraf 4.5. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (5 μg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 24 saatlik muamele, ♀ , X1000)



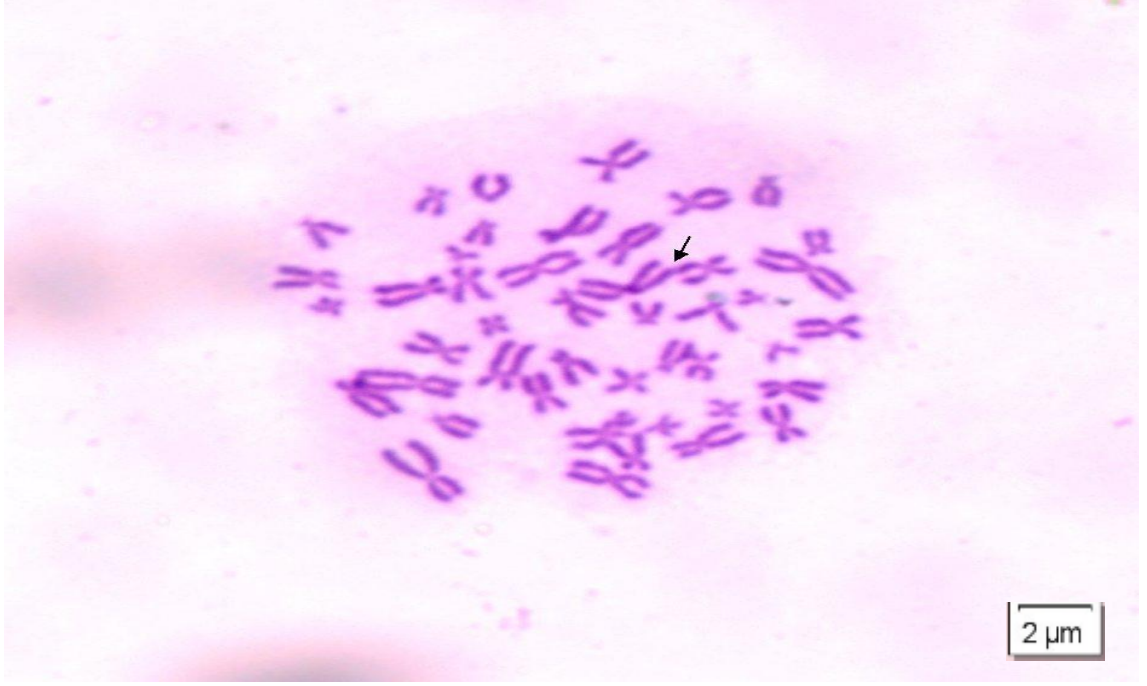
Fotoğraf 4.6. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (10 μg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 24 saat muamele, ♀ , X1000)



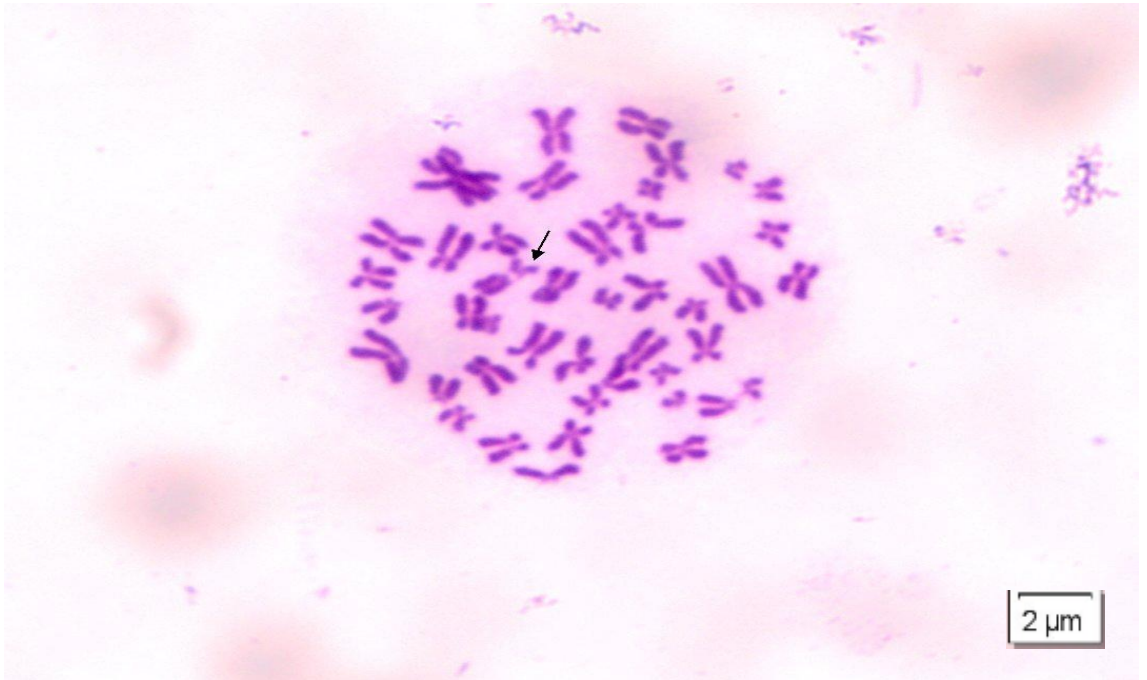
Fotoğraf 4.7. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (5 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 48 saatlik muamele, ♂, X1000)



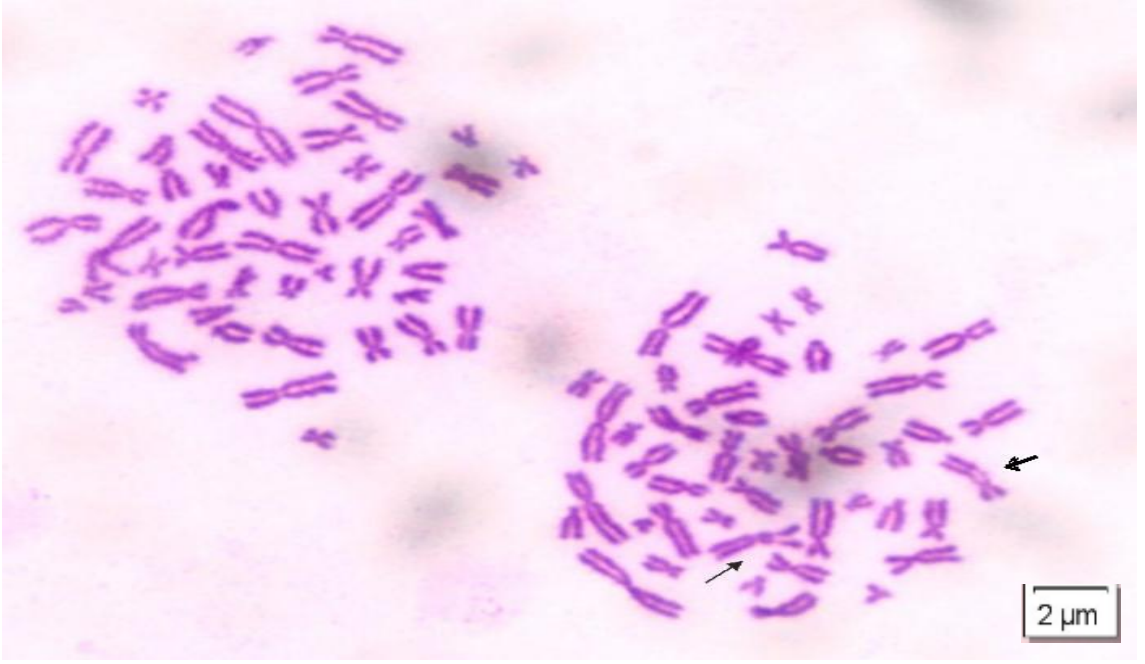
Fotoğraf 4.8. Tek kol birleşmesi bulunan metafaz plağı (5 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 48 saat muamele, ♀, X1000)



Fotoğraf 4.9. Tek kol birleşmesi bulunan metafaz plağı (10 µg/mL *Chiloscypus polyanthos*, 24 saat muamele, ♀, X1000)



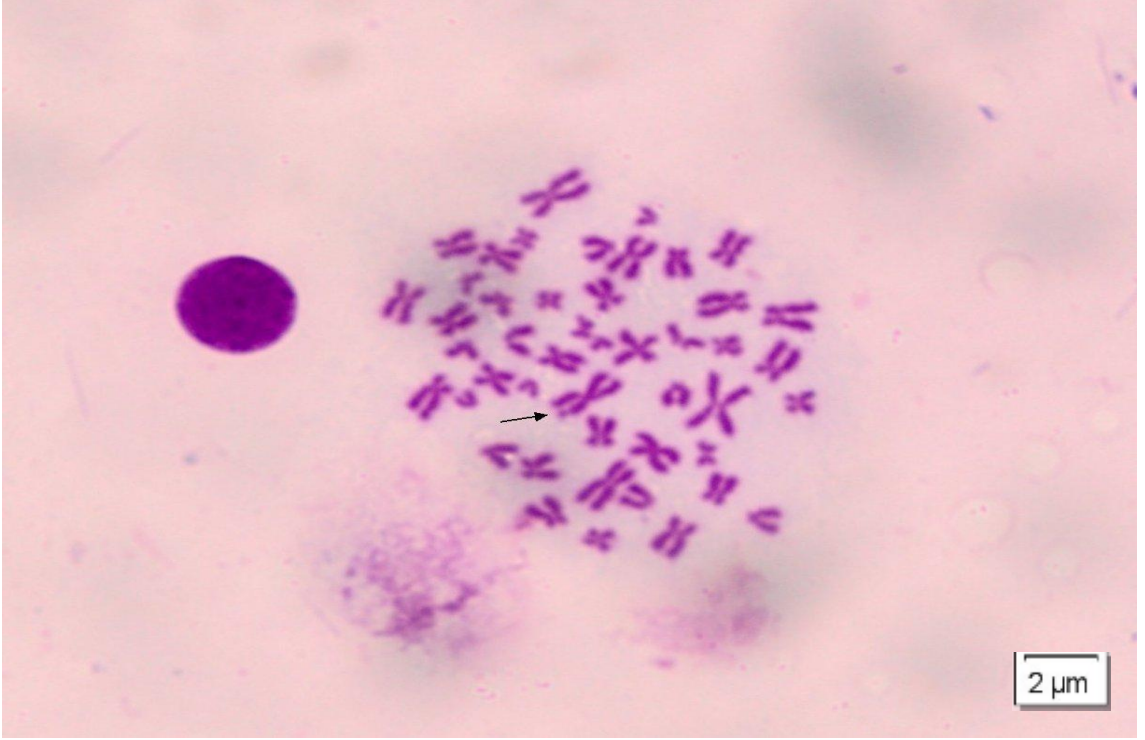
Fotoğraf 4.10. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (5 µg/mL *Chiloscypus polyanthos*, 48 saat muamele, ♂, X1000)



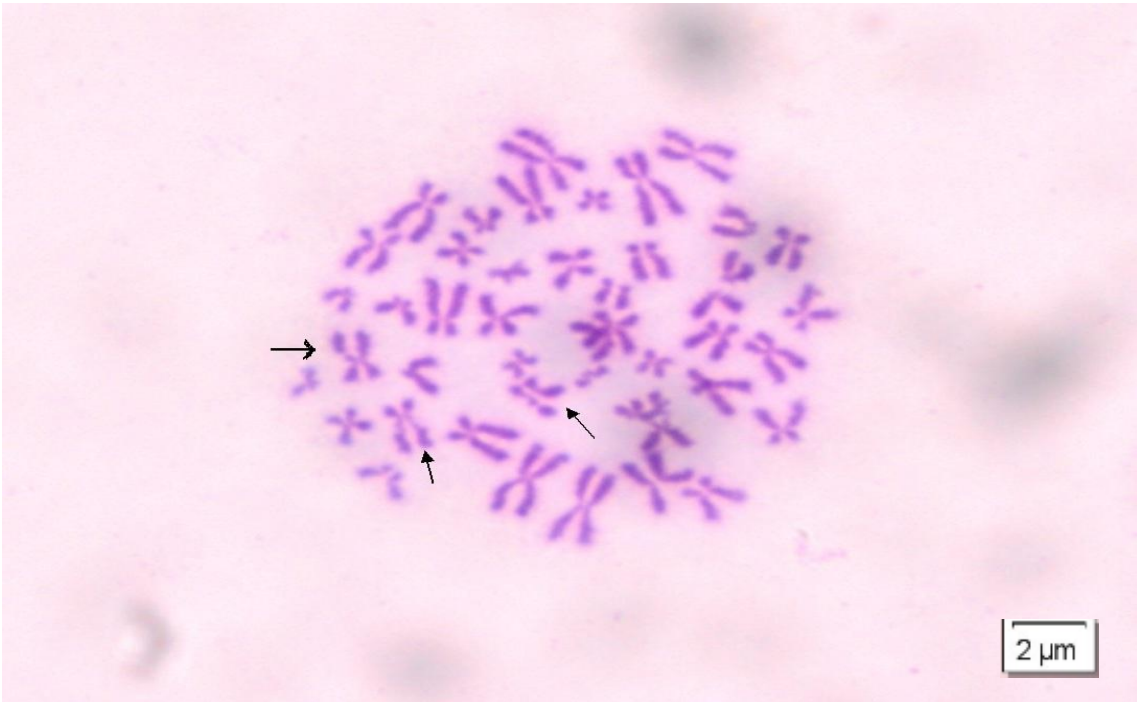
Fotoğraf 4.11. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 24 saat muamele, ♂, X1000)



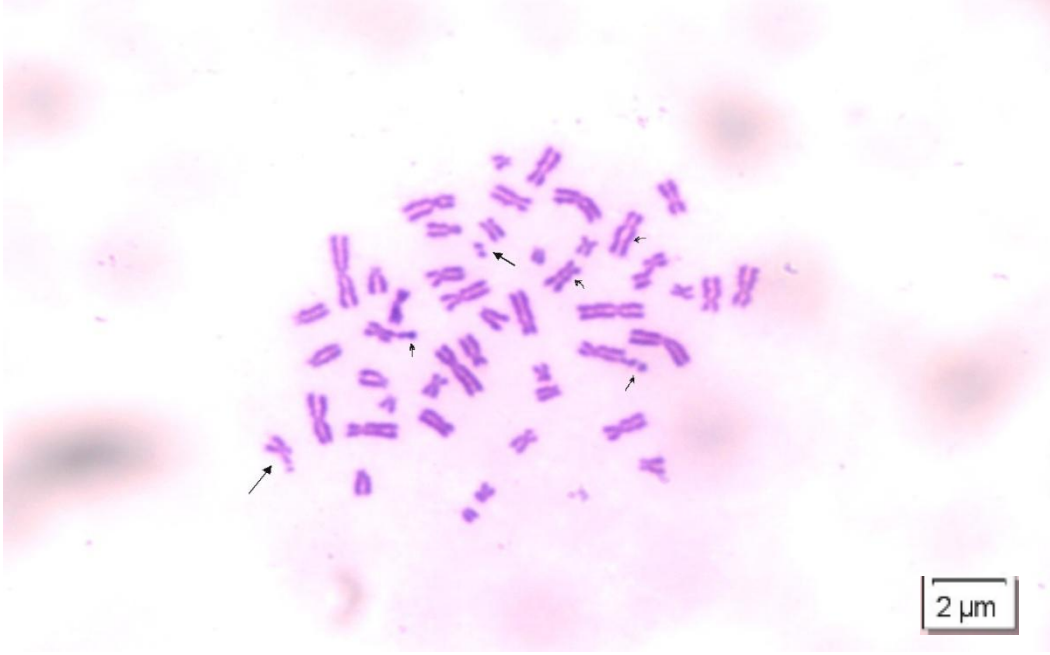
Fotoğraf 4.12. Fragment (F) bulunan metafaz plağı (10 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 48 saat muamele, ♂, X1000)



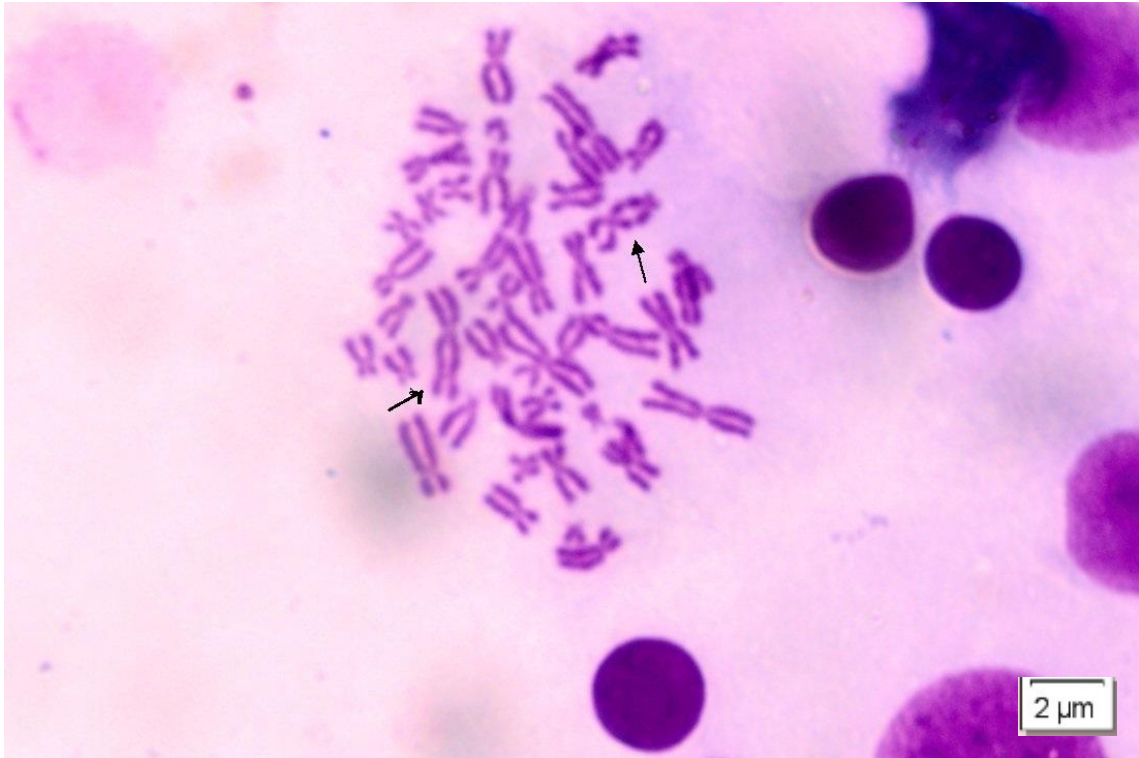
Fotoğraf 4.13. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (10 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 48 saatlik muamele, ♂, X1000)



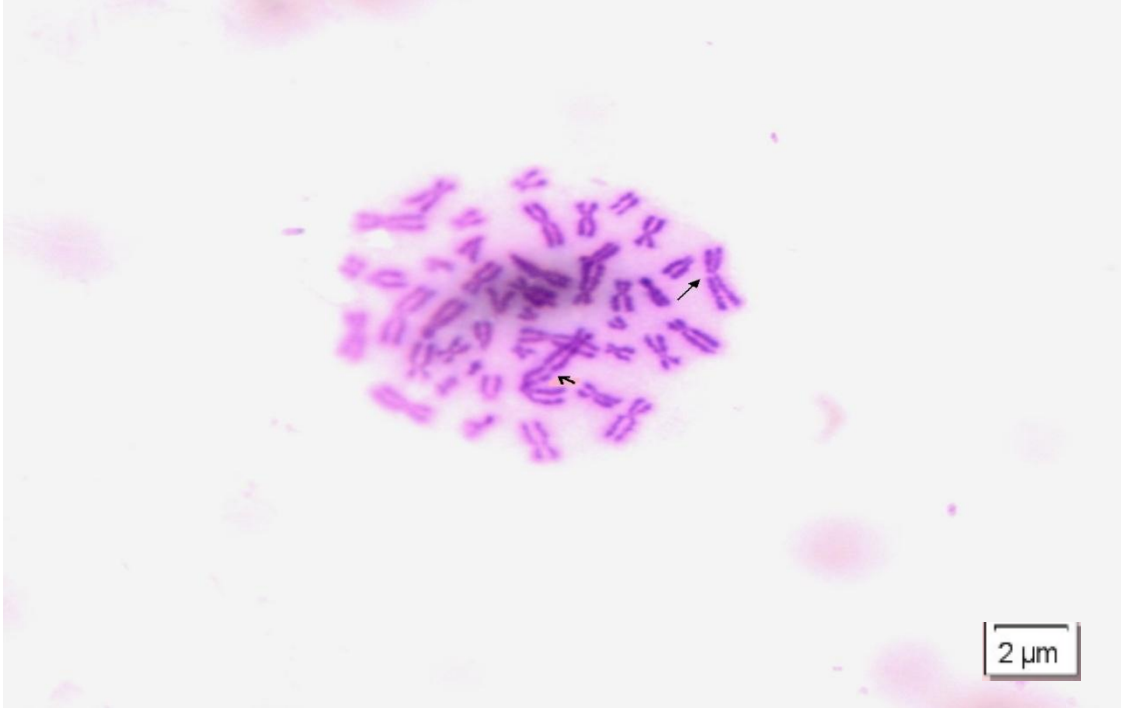
Fotoğraf 4.14. Kromatid kırığı (B') ve kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (5 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 48 saat muamele, ♂, X1000)



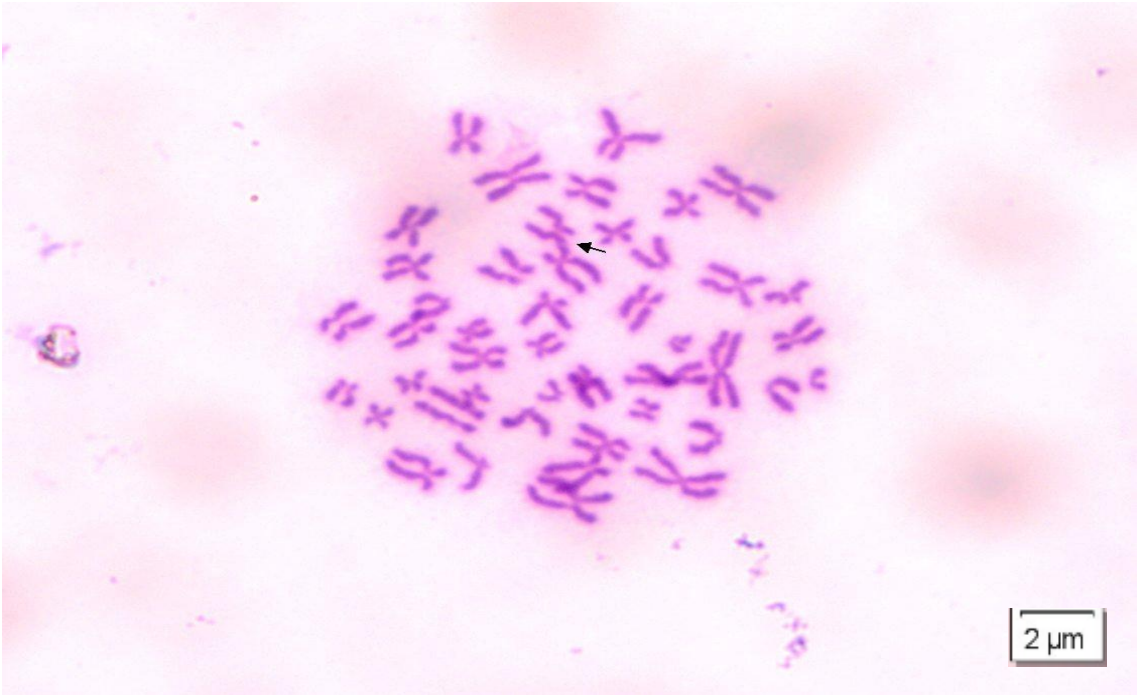
Fotoğraf 4.15. Kromatid kırıkları (B'), fragment (F) ve disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 48 saat muamele, ♀, X1000)



Fotoğraf 4.16. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (2.5 µg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 48 saat muamele, ♀, X1000)



Fotoğraf 4.17. Kromatid kırığı (B') ve disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (2.5 μg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 24 saat muamele, ♀, X1000)



Fotoğraf 4.18. Tek kol birleşmesi bulunan metafaz plağı (5 μg/mL *Chiloscyphus polyanthos*, 48 saat muamele, ♀, X1000)

4.2 *Chiloscyphus polyanthos* Bitki Ekstraktının Mitotik İndeks (MI) Üzerindeki Etkileri

Mitotik İndeks (MI), *Cp* bitki ekstraktının mitoz bölünme üzerindeki etkisini göstermektedir. *Cp* bitki ekstraktının, hem 24 saatlik hem de 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10 µg/mL) istatistiksel analiz sonucuna göre sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir ($P \leq 0.000$) (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. SPSS ANOVA analizindeki MI önemliliği

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	66,052	11	6,005	16,296	,000
Within Groups	13,265	36	,368		
Total	79,317	47			

Cp bitki ekstraktının, MI'yı 24 saatlik muamelede 2.5 ve 10 µg/mL konsantrasyonları, kontrol ve alkol kontrol gruplarını önemli derecede düşürdüğü belirlenmiştir. 5 µg/mL konsantrasyonu sadece kontrol grubunu önemli derecede düşürdüğü belirlenmiştir. Ancak hiçbir konsantrasyonun pozitif kontrol grubunu düşürdüğü belirlenmemiştir (Çizelge 4.3.).

Cp bitki ekstraktının, MI'yı 48 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10 µg/mL) kontrol ve alkol kontrole göre önemli derecede düşürdüğü tespit edilmiştir. Ancak konsantrasyonlardan hiçbirinde pozitif kontrolü düşürdüğü tespit edilememiştir. Konsantrasyonların kontrol gruplarına göre azalışları arasındaki fark dikkate değerdir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3.'te daha önce elde ettiğimiz mitotik indeks yüzdeleri SPSS programa girilmiştir ve konsantrasyonların kontrol gruplarına göre önemlilikleri karşılaştırılmıştır. 'a,b ve c' olarak harf verilmiştir.

Çizelge 4.3. Değişik konsantrasyonlarda *Chiloscyphus polyanthos* ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerindeki MI değerleri

Test maddesi	Muamele		MI ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/mL)	
Kontrol	--	--	5,55±0,46
Etanol (EK)	24	10µL/mL	4,74±0,30 c ₃
MMC (PK)	24	0,20	2,29±0,00 a ₃ b ₃
<i>Cp</i> bitki konsantrasyonu	24	2,5 5 10	3,16±0,39 a ₃ b ₃ 3,05±0,27a ₃ 2,70±0,22 a ₃ b ₃
Etanol (EK)	48	10µL/mL	3,83±0,25 c ₃
MMC (PK)	48	0,20	2,17±0,01 a ₃ b ₃
<i>Cp</i> bitki konsantrasyonu	48	2,5 5 10	2,68±0,48 a ₃ b ₃ 2,67±0,15 a ₃ b ₃ 2,45±0,18 a ₃ b ₃

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

a₁b₁c₁; P≤0,05

a₂b₂c₂; P≤0,01

a₃b₃c₃; P≤0,001

Çizelge 4.3.'te 'a' harfi kontrol grubuna göre karşılaştırmadır. Kontrol grubunun önemlilik ifadesi ' $a_1b_1c_1$; $P \leq 0,05$ ' bu şekildedir. Bu ifade de P önemlilik değeri 0.05'e eşit ya da 0.05'ten küçük çıkmış ise konsantrasyon kontrol grubuna göre önemlidir denilmektedir. $a_2b_2c_2$; $P \leq 0,01$: Buradaki 'b' harfi alkol kontrol grubuna göre karşılaştırmadır. P ifadesinin derecesi 0.01'e eşit ya da 0.01'den küçük çıkarsa alkol kontrolüne göre konsantrasyon önemlidir sonucu çıkmaktadır. $a_3b_3c_3$; $P \leq 0,001$: Buradaki 'c' harfi pozitif kontrol grubuna göre karşılaştırmadır. P önemlilik değeri 0.001'e eşit ya da 0.001'den küçük çıkması halinde konsantrasyon pozitif kontrole göre önemlidir denilmektedir.

Aşağıda konsantrasyonların 24 saat ve 48 saat muameleleri sonucunda mitotik indeks yüzdeleri ve önemlilikleri verilmiştir.

Cp bitki ekstaraktının, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunun insan periferal kan lenfositlerindeki 24 saatlik muamelesi sonucu SPSS analizine göre mitotik indeksi ve önemlilik durumu: $MI \pm SH : 3,16 \pm 0,39$ a_3b_3

Cp bitki ekstaraktının, 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunun insan periferal kan lenfositlerindeki 24 saatlik muamelesi sonucu SPSS analizine göre mitotik indeksi ve önemlilik durumu: $MI \pm SH 3,05 \pm 0,27$ a_3

Cp bitki ekstaraktının, 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunun insan periferal kan lenfositlerindeki 24 saatlik muamelesi sonucu SPSS analizine göre mitotik indeksi ve önemlilik durumu: $MI \pm SH 2,70 \pm 0,22$ a_3b_3

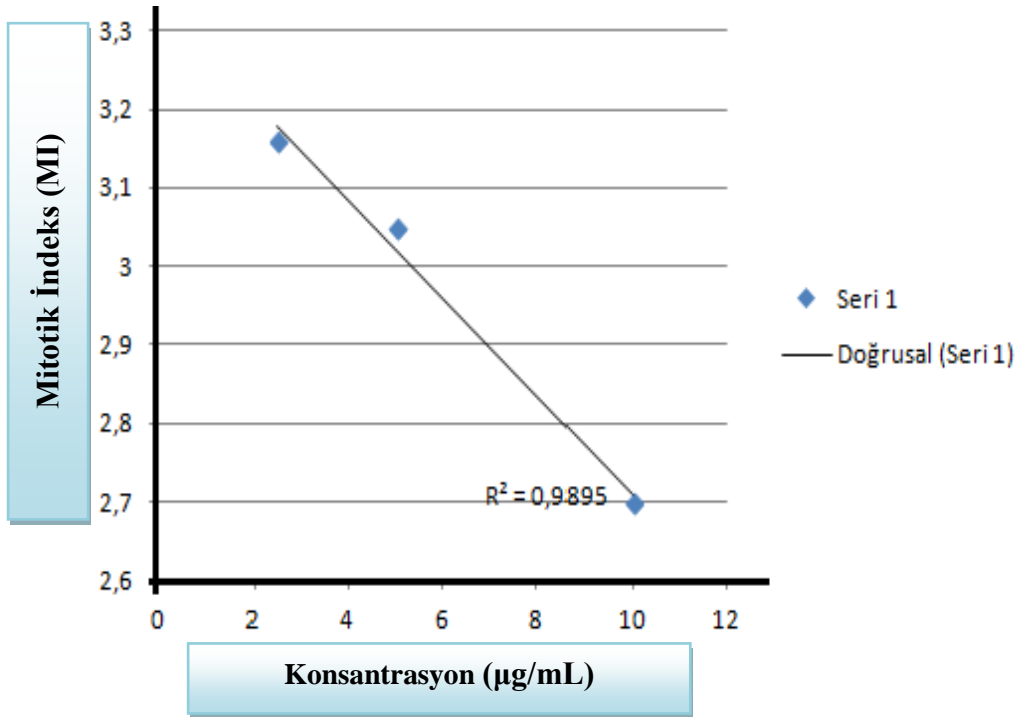
Cp bitki ekstaraktının, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunun insan periferal kan lenfositlerindeki 48 saatlik muamelesi sonucu SPSS analizine göre mitotik indeksi ve önemlilik durumu: $MI \pm SH : 2,68 \pm 0,48$ a_3b_3

Cp bitki ekstaraktının, 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunun insan periferal kan lenfositlerindeki 48 saatlik muamelesi sonucu SPSS analizine göre mitotik indeksi ve önemlilik durumu: $MI \pm SH : 2,67 \pm 0,15$ a_3b_3

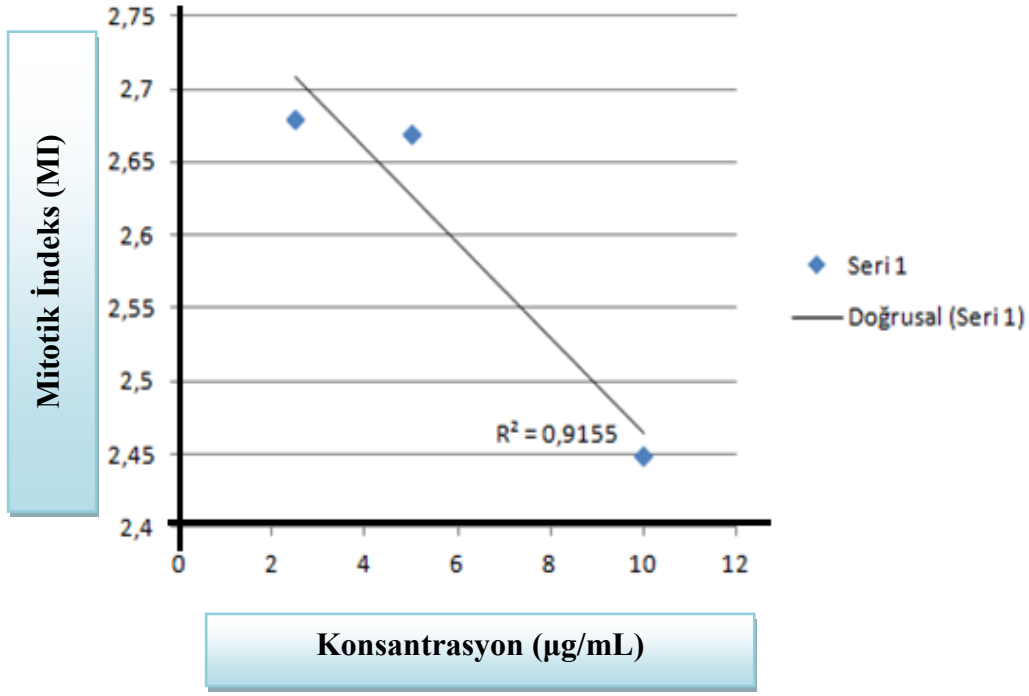
Cp bitki ekstraktının, 10 µg/mL konsantrasyonunun insan periferel kan lenfositlerindeki 48 saatlik muamelesi sonucu SPSS analizine göre mitotik indeksi ve önemlilik durumu: MI ± SH : 2,45±0,18 a₃b₃

Çizelge 4.3.'te konsantrasyonların kontrol grubu ile alkol kontrol grubuna göre değerleri önemli çıkmıştır. Ancak pozitif kontrole göre önemlilik bulunmamıştır.

Mitotik indeksdeki; konsantrasyon-etki ilişkisi regresyon ve korelasyon analizi ile belirlenmiştir. Yapılan analize göre konsantrasyonların korelasyonu önemli çıkmıştır. Korelasyon önemli olduğundan regresyon analizi yapılmıştır. *Chiloscyphus polyanthos* bitki ekstraktı ile 24 saat ($R^2=0,9895$, **: P=0,01) ve 48 saat ($R^2= 0,9155$, **: P=0,01) muamele edilen kültürlerde konsantrasyona bağlı düşüş göstermiştir (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. *Cp* ekstraktının 2,5, 5ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde mitotik indeksdeki konsantrasyona bağlı azalmayı gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (**:P=0,01)



Şekil 4.4. *Cp* ekstraktının 2,5, 5ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde mitotik indeksdeki konsantrasyona bağlı azalmayı gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (**:P=0,01)

4.3 Tartışma

Literatür araştırmamıza göre, *Chiloscyphus polyanthos* ciğerotu türünün ekstraktı ile insan periferel kan lenfositleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Xiao ve arkadaşları (2006), Çin’de deri hastalıklarında, karaciğer korumasında, karaciğer iltihabı tedavisinde kullanılan *Marchantia convoluta* ciğerotu türünün insan akciğer kanser hücreleri (H1299) ve karaciğer kanser hücrelerinde (HepG2) sitotoksik etkisi araştırmışlardır. Bu bitki ekstraktının önemli derecede sitotoksik etki gösterdiğini saptamışlar ve özellikle etil asetat ekstraktının en yüksek konsantrasyonunun (100 µg/mL) akciğer kanserli hücrelerin sayısını azalttığını belirlemişlerdir. Ayrıca düşük konsantrasyonların da (15, 30 ve 40 µg/mL) karaciğer kanserli hücre sayılarında belirgin olarak azalmaya neden olduğu saptamışlardır. Bizim yaptığımız bu çalışmada *Chiloschyphus polyanthos* ciğerotu türünün etanol ekstraktı, 2,5, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Bizim uyguladığımız konsantrasyonlar ile yukarıdaki

yapılan çalışmadaki konsantrasyonlar ve testler birbirinden farklı olmasına rağmen her iki çalışmada da bitki ekstraktlarının sitotoksik etki gösterdiği belirlendi.

Sousa ve arkadaşları (2009), Verbenaceae familyasının iki tıbbi türünün (*Lantana camara* ve *Lippia alba*) *Lactuca sativa* (marul) kök ucu meristem hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri üzerine çalışma yapmışlar ve bu araştırmacılar en yüksek konsantrasyonun, marul kök ucu meristem hücrelerinde mitotik indeksi düşürdüğü ve kromozom aberasyonuna sebep olduğu göstermişlerdir. Bizim yaptığımız bu çalışmada, *Cp* ekstraktının sadece sitotoksik etki gösterdiğini ve mitotik indeksi düşürdüğünü tespit ettik.

Kopar (2010), Lamiaceae familyasına ait *Salvia fruticosa* (*Sf*) bitkisinin yaprak ekstraktının metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkileri; KKD, KA, MN testi ile araştırılmıştır. Sitotoksik etkisi de MI, PI ve NBI'nin hesaplanması ile saptanmıştır. *Sf* bitkisi metanol ile ekstraktının 1.5, 3.0 ve 6.0 µL/mL'lik dozları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir. Metabolik aktivatör yokluğunda *Sf* yaprak ekstraktı tek başına MI'yi düşürerek sitotoksik etki yapmış fakat proliferasyon indeksi ve nükleus bölünme indeksini düşürmemiştir. Metabolik aktivatör varlığında ise sitotoksik olmadığı, yüksek dozlarda ise Cyclophosphamide'nin sitotoksik etkisini artırdığı saptanmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada 2.5, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonları hazırlandı. Sadece sitotoksik etki gösterdiği ve $P \leq 0,05$ anlamlılık değerine göre önemli bulundu.

Yıldız (2010), Lamiaceae familyasına ait *Stachys petrokosmos* (*Sp*) bitkisinin yaprak ekstraktının metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkileri; KKD, KA, MN testi ile araştırılmıştır. Sitotoksik etkisi de MI, PI ve NBI'nin hesaplanması ile saptanmıştır. *Sp* bitkisi metanol ile ekstraktının 1.5, 3.0 ve 6.0 µL/mL'lik dozları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir. Metabolik aktivatör yokluğunda zayıf genotoksik etki göstermiştir. Metabolik aktivatör varlığında ise *Sp* yaprak ekstraktının genotoksik ve sitotoksik olmadığı, fakat Cyclophosphamide'in KKD ve MN oluşumu üzerindeki etkisini azaltarak anti-genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada sadece KA testi uygulandı ve sitotoksik etki gösterdiği ($P \leq 0,05$) saptandı.

Morais-Braga ve arkadaşları (2013), *Lygodium venustum* eğreltiotu bitkisinin fenol bileşenlerinin sitotoksik ve anti-kinetoplastik aktivitesini incelemişlerdir. Etanol, etil asetat ve metanol ekstraktları hazırlanmıştır. En iyi aktivitesi metanol ekstraktı ile hazırlanan 500 µg/mL konsantrasyonunda, yaklaşık %63-%68 oranında hastalığı engellediği bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada ciğerotu türü etanol ile ekstrakt edilmiştir. Sitotoksik ve genotoksik etkisi incelenmiştir. Hazırlanan 2.5, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonları sitotoksik olduğu belirlendi.

Kıvçak ve arkadaşları (2002), Fabaceae familyasına ait *Cerotonia siliqua* bitkisinin, n-hegzane, metanol, etanol, etil asetat ve su ekstraktlarının, antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi için çeşitli bakteri ve mantar türleri kullanılmıştır. Ekstraktların sitotoksik aktiviteleri brine shrimp yöntemiyle değerlendirilmiştir. Etanol, metanol ve su ekstraktları brine shrimp'e karşı sitotoksik aktivite göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmanın da ekstraktında etanol kullanıldı. Kromozom anomalileri için kromozom aberasyon testi uygulandı.

Meriç ve arkadaşları (2010), Adoxaceae familyasına ait *Sambucus ebulus* bitkisinin çiçek, meyve ve yapraklarının alkol ekstraktları ile yaprak ekstraktlarının toluen, kloroform ve etil asetat fraksiyonları, sitotoksik ve anti-karsinojenik etkileri bakımından değerlendirilmiştir. 6 adet ekstraktın sitotoksik ve anti-karsinojenik aktivitesi test edilmiştir. L-929 hücre hattında 10µg/mL konsantrasyonda denenen ekstraktlar ile elde edilen maksimum büyüme engelleyici değeri bitkinin yaprak-etilasetat ekstraktı ile elde edilen % 33.25 dir (p<0.05). %50 ve üzeri sitotoksikite değerleri sitotoksik olarak değerlendirilir. Bizim yaptığımız çalışmada ciğerotu türü etanol ile ekstrakt edilmiştir. Hazırlanan konsantrasyonların sitotoksik olduğu belirlendi (P≤0,05).

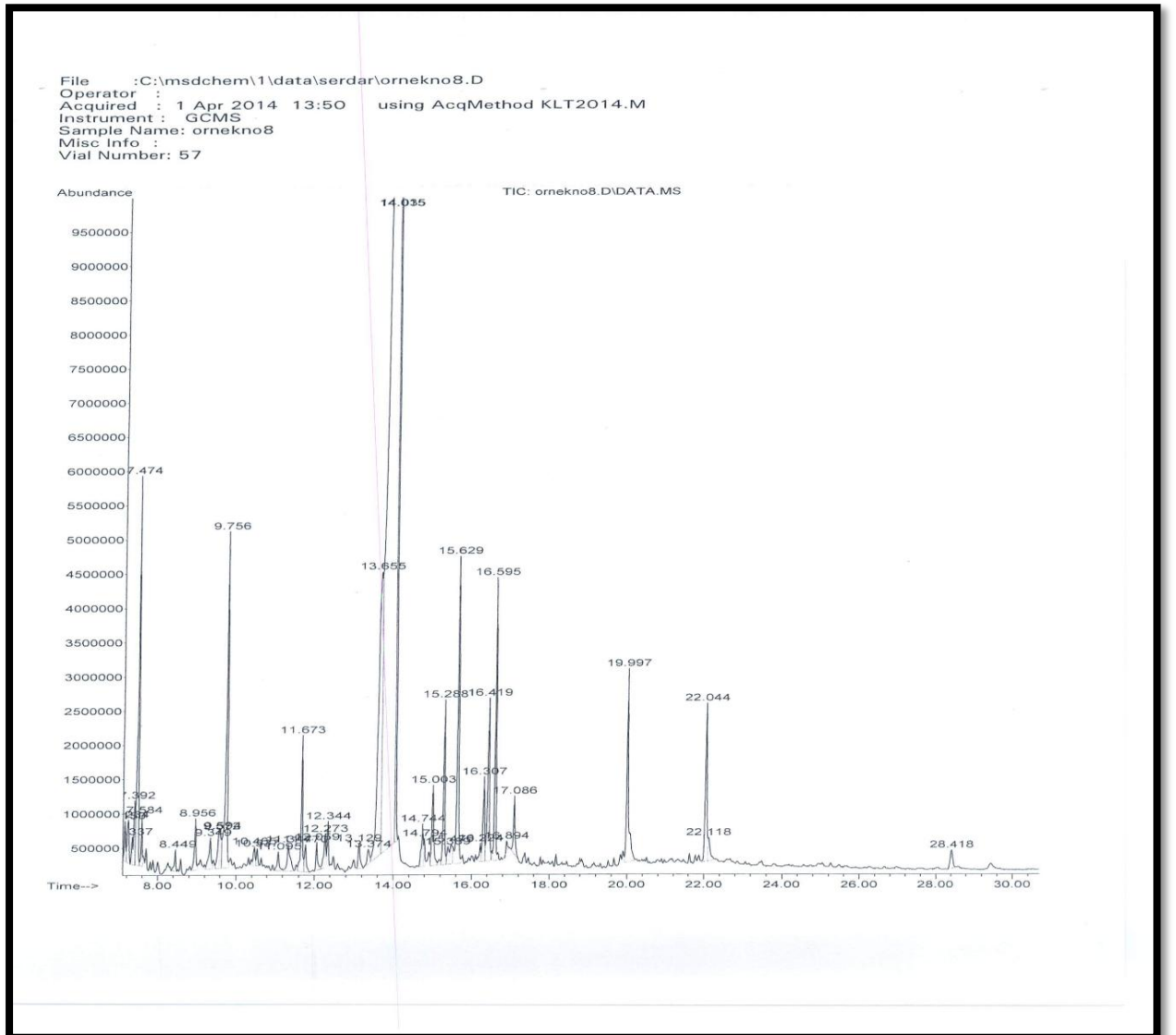
Akinboro ve Bakare (2007), 5 tıbbi bitkinin (*Azadirachta indica*, *Morinda lucida*, *Cymbopogon citratus*, *Mangifera indica* ve *Carica papaya*) sulu ekstraktlarının sitotoksik ve genotoksik etkisi araştırılmıştır. Sitotoksik ve genotoksik etkiyi belirlemek için *Allium cepa* analizi kullanılmıştır. Ekstraktlar yerel olarak musluk suyu ile uygulanarak hazırlanmıştır. Ekstraktların her biri sırasıyla %1, %5, %10, %25 ve %50 konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Konsantrasyon-bağıllık ilişkisi, kök büyümesinin engellenmesi kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p≤0.05) bulunmuştur. Bu çalışmada *Allium cepa* analizi kullanarak sitotoksik ve

genotoksik etki belirlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada kromozom aberasyonu ile belirlendi. Hem bizim yaptığımız çalışmada hem de bu çalışmada sonuçlar $p \leq 0.05$ anlamlılık değerine göre önemli bulundu.

4.4 *Chiloscyphus polyanthos* Çiğertü Türünün Aktif Bileşenlerinin GC/MS Analizi İle Belirlenmesi

Chiloscyphus polyanthos çiğertü türü ekstraktı ile hazırlanan konsantrasyonlardan üç ayrı örnek alınmıştır. Alınan örneklerden biri kullanılmıştır. GC/MS Analizi ile etki eden aktif bileşenleri belirlenmiştir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. *Chiloscyphus polyanthos* çiğertü türünün aktif bileşenlerinin GC/MS analiz sonuçları



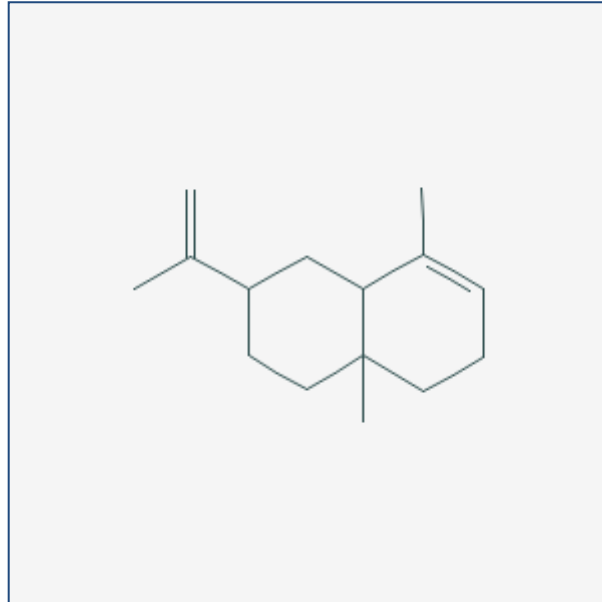
Aktif bileşenleri;

- Alpha selinene
- Beta selinene
- Alpha
- Neophytadiene 1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dimethoxy-1-methylpyrrolo1-(2-Methylprop-2-en-1-yl)-2-thiox
- 1,3,4,5-Tetrahydro-7,8-dimethoxyl-1-methylpyrrolo (4,3,2 - de) quinoline
- 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl
- Octadecanoic acid, ethyl ester, stearik acid, etyl stearate
- Hexadecanoicacid, 2,3-dihydroxypropyl ester
- Octadecanoic acid, 2-3-dihydroxypropyl ester
- Cholest-5-en-3-ol (3.beta)

4.4.1 Alpha selinene

Molekül ağırlığı: 204.35106 (g/mol)

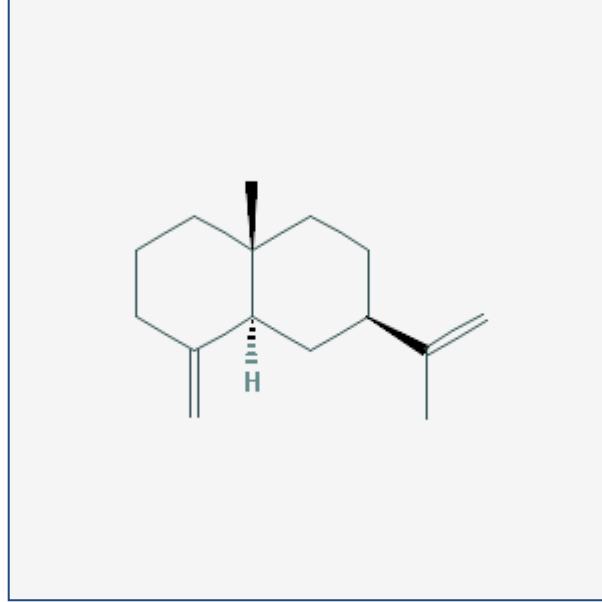
Molekül formülü: C₁₅H₂₄



Şekil 4.5. Alpha selinene açık formülü

4.4.2 Beta selinene

Molekül formülü: C₁₅H₂₄

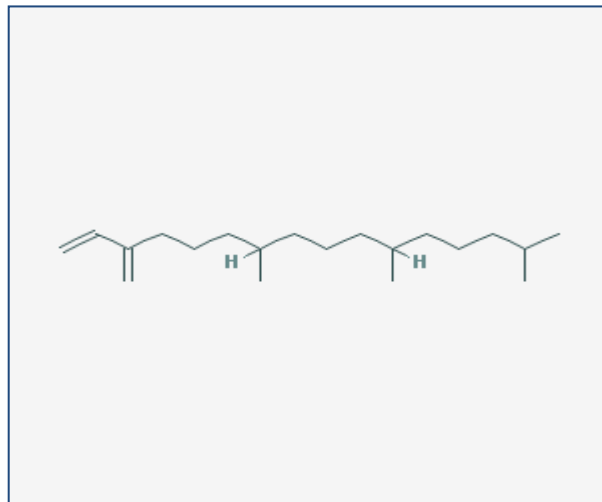


Şekil 4.6. Beta selinene açık formülü

4.4.3 Neophytadiene

Molekül ağırlığı: 278.51572 (g/mol)

Molekül formülü: C₂₀H₃₈

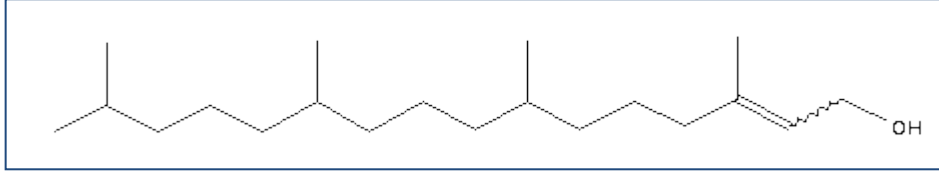


Şekil 4.7. Neophytadiene açık formülü

4.4.4 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl

Molekül ağırlığı: 296.53 (g/mol)

Molekül formülü: C₂₀H₄₀O

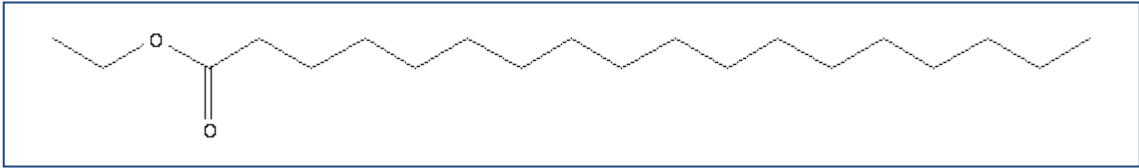


Şekil 4.8. 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl açık formülü

4.4.5 Octadecanoic acid, ethyl ester

Molekül ağırlığı: 312.5304 (g/mol)

Molekül formülü: C₂₀H₄₀O₂



Şekil 4.9. Octadecanoic acid, ethyl ester'in açık formülü

4.4.6 Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester

Molekül ağırlığı: 330.50262 (g/mol)

Molekül formülü: C₁₉H₃₈O₄

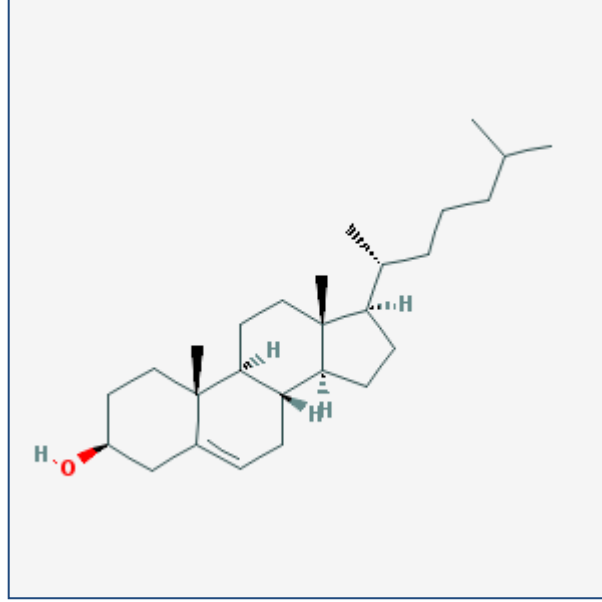
4.4.7 Octadecanoic acid, 2-3-dihydroxypropyl ester

Molekül ağırlığı: 358.5558 (g/mol)

Molekül formülü: C₂₁H₄₂O₄

4.4.8 Cholest-5-en-3-ol (3.beta)

Molekül formülü: $C_{27}H_{46}O$



Şekil 4.10. Cholest-5-en-3-ol (3.beta) açık formülü

BÖLÜM V

SONUÇ

Bu çalışma, *Cp bitki* ekstraktının insan periferel kan lenfositleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada bitki ekstraktının 2.5, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonları hazırlanarak, 24 ve 48 saatlik iki farklı muamele süresi, insan periferel kan lenfositlerine uygulanmıştır. Yapılan bu çalışmada öncelikle sitotoksik etki, daha sonra da genotoksik etki belirlenmiştir. Sitotoksik etki için mitotik indeks (MI) saptanmıştır. İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows kullanılmış ve sonuçlar $P \leq 0,05$ anlamlılık düzeyine göre istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. KA'lı hücre oranları, KA'lı hücre sayıları, MI oranları 24 ve 48 saat muameleler ile birlikte farkın olup olmadığı ONE WAY ANOVA (Post Hoc Analiz-LSD Test) ile analiz edilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında kullanılan *Chiloscyphus polyanthos* ciğerotu türünün ekstraktı sitotoksik etki göstermiştir. İçerisindeki aktif bileşenleri GC/MS analizi ile belirlenmiştir. Sitotoksik etkisinden dolayı kontrolsüz çoğalan hücreleri durdurucu etkisinin olabileceği ve tıp alanlarında ilaç yapımında kullanılabileceği yönünde daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abay, G. ve Kamer, D., “Biyoeitliliğimizin az bilinen bileŖenleri bryofitler”, **III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi Kitapçığı**, AÇÜ, Artvin, 3, 1115-1125, Mayıs, 2010.

Abay, G., Altun, M., KoldaŖ, S., Tüfekçi, A. R. and Demirtas, İ., “Determination of Antiproliferative Activities of Volatile Contents and HPLC Profiles of Dicranum scoparium (Dicranaceae, Bryophyta)”, Mart, 2015.

Akinboro, A. ve Bakare, A.A., “Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa*”, **Journal of Ethnopharmacology**, 112, 470–475, 2007.

Alam, A., “Antifungal activity of Plagiochasma rupestre (Forst.) Steph. Extracts”, **Researcher**, 4(3), 2012.

Ariöz, S.S., “Kirmir Vadisi’nin (Güdül, Ankara) Biryofit Florası“, **Niğe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, 2010.

Arif, R., Küpeli, E. and Ergun, F., “THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF *CENTAUREA* L. SPECIES (Review)”, **G.Ü.Fen Bilimleri Dergisi** 17(4): 149-164(2004, ISSN 1303-9709.

Asakawa, Y., Ludwiczuk, A. and Nagashima, F., “Phytochemical and biological studies of bryophytes”, **Phytochemistry** 91, 52-80, 2013.

Asakawa, Y., Ludwiczuk, A. and Nagashima, F., “Progress in the Chemistry of Organic Natural Products”, **Springer Wien Heidelberg New York Dordrecht London Library of Congress**, Control Number: 2012945421, 2013.

Basile, A., Vuotto, M.T., Ielpo, M.T.L., Moscatiello, V., Ricciardi, L., Giordano, S., Cobianchi Castaldo, R., “Antibacterial Activity in Rhynchostegium riparioides (Hedw.) Card. Extract (Bryophyta)”, *Phytotherapy Research*, 12, 146-148, 1998.

Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Lavitola, A., Cobianchi Castaldo, R., “Antibacterial Activity in Pleurochaete squarrosa Extract (Bryophyta)”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10, 169-172, 1998.

Bodade, R.G., Borkar, P.S., Arfeen, S., Khobragade, C.N., “in vitro Screening of Bryophytes for Antimicrobial Activity”, *Journal of Medicinal Plants*, 7, (4), 23-28, 2008.

Canlı, K., “Orman Mühendisliği Odası Yayın Organı”, 1301-5372, 46, 7-8-6, 2009.

Chiang, T.A., Wu, P.F., Wang, L.F., Lee, H., Lee, C.H. and Ko, Y.C., “Mutagenicity and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content of Fumes from Heated Cooking Oils Produced in Taiwan”, *Mutation Res.*, 381: 157-161, 1997.

Çolak, E., “Bazı Pleurokarpik Karayosunlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi”, *Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, Niğde, Sayfa: 70, 2010.

Diler, S.B., “Etil Metansulfonat (ems) ve Mitomisin C (mmc)’ye İnsan Kromozomlarının Hassasiyeti”, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 2006.

Drobnik, J. and Stebel, A., “Medicinal mosses in pre-Linnaean bryophyte floras of central Europe. An example from the natural history of Poland.”, *Journal of Ethnopharmacology*, 153(2014) 682–685.

Dülger, B., Hacıoğlu, N. and Uyar, G., “Evaluation Of Antimicrobial Activity of Some Mosses From Turkey”, *Asian Journal of Chemistry*, 21, 5, 4093-4096, 2009.

Evans, H.J., “Handbook of Mutagenicity Test Procedures. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. (Eds.), Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests”, *Elsevier Science Publishers*, BV, pp. 405-427, 1984.

Ezer, T., “Güney Amanos Dağları (Musa dağı) biryofit florası ve epifitik biryofit vejetasyonunun araştırılması”, Doktora tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 2008.

Glime, J., “pH Lowering ability of *Sphagnum*”, *Sci. Activ.*, 35(3), 10, 1998.

Holá, M., Kozák, J., Vágnerová, R., Angelis, K.J., “Genotoxin Induced Mutagenesis in the Model Plant *Physcomitrella patens*”, *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, Article ID 535049, 7 pages, 2013.

Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L., and Katan, M. B., “Analysis and Health Effects of Flavonoids”, *Food. Chem.*, 57: 43-46, 1996.

Kang, S.J., Kim, S.H., Liu, P., Jovel, E. and Towers, G.H.N., “Antibacterial activities of some mosses including *Hylocomium splendens* from South western British Columbia”, *Fitoterapia* 78(5), 373-376, 2007.

Kara, R., “Kuzey Amanos Dağları (Hatay-Dörtyol) bryofit florası ve epifitik bryofit vejetasyonunun araştırılması”, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 2008.

Kara R., Can S.M., Ezer T., “Türkiye Biryofitlerinin Etnobiryolojik Durumuna Bir Bakış”, *Ekoloji Sempozyumu*, Düzce, 2011.

Kayraldız, A., Yavuz, A. K., Rencüzoğulları, E., İstifli, E.S., İla, H.S., Topaktaş, M., Dağlıoğlu, Y.K., “The Genotoxic and Antigenotoxic Effects of *Aloe vera* Leaf Extract in vivo and in vitro”, *Turkish Journal of Biology*, 34: 235-246, 2010.

Kırmacı, M., “Denizli Dağları (Babadağ, Honaz Dağı) biryofit florası”, Doktora tezi, **Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, 2007.

Kıvçak, B., Mert, T., Öztürk, H.T., “Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Ceratonia siliqua* L. Extracts”, **Turkish Journal of Biology**, 26: 197-200, 2002.

Kopar, N., “*Salvia fruticosa* Bitki Ekstraktının Metabolik Aktivatör Varlığında ve Yokluğunda İnsan Lenfositlerinde Genotoksik ve Anti-Genotoksik Etkisi”, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı**, Sayfa: 84, 2010.

Meriç Z.İ., Turan S.Ö., Akbuğa J., Bitis L., “*Sambucus ebulus* L. Bitkisinin Sitotoksik ve Anti-karsinojenik Aktivitesi”, **Yeni Yüzyıl Üniversitesi ve Marmara Üniversitesi**, 2010.

Morais-Braga, M.F.B., Souza, T.M., Santos, K.K.A., Guedes, G.M.M., Andrade, J.C., Vega, C., Rolón, M., Costa, J.G.M., Saraiva, A.A.F. and Coutinho, H.D.M., “Phenol composition, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activities of *Lygodium venustum* SW. (Lygodiaceae)”, **Experimental Parasitology** 134 (2013) 178–182.

Richardson, D.H.S., “The Biology of Mosses”, **Blackwell Scientific Publications**, London, s. 215, 1981.

Olorunfemi, D.I., Okoloko, G.E, Bakare, A.A. and Akinboro, A., “Cytotoxic genotoxic effects of cassava effluents using *Allium cepa* assay”, **Research Journal of Mutagenesis**, 2010.

Onat, T. A., Çakırgöz, M. and Kara, R., “Decolorization of doracryl blue and astrozon red by *Chiloscyphus polyanthos*”, Current Opinion in Biotechnology, **European Biotechnology Congress**, Elsevier, s. 35, 2013.

Rencüzoğulları E. and Topaktaş M., “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 ve Mühendislik Bilimleri Dergisi**, 5(3): 19-24, 1991.

Samecka-Cymerman, A. and Kempers, A.J., “Background concentrations of heavy metals in aquatic bryophytes used for biomonitoring in basaltic areas (a key study from central France)”, *Environmental Jeol.*, 39 (2), 117-122, 1999.

Santos, K.K.A., Matias, E.F.F., Sobral-Souza, C.E., Tintino, S.R., Morais-Braga, M.F.B., Guedes, G.M.M., Rolón, M., Coronel, C., Alfonso, J., Vega, C., Costa, J.G.M., Menezes, I.R.A. and Coutinho, H.D.M., “Trypanocide, cytotoxic, and anti-*Candida* activities of natural products:*Hyptis martiusii* Benth.”, *European Journal of Integrative Medicine*, 5 (2013) 427–431.

Saxena, D.K. and Harinder, “Uses of Bryophytes”, *Resonance*, 56-65, 2004.

Sawant, U.J. and Karadge, B.A., “Antimicrobial activity of some bryophytes (Liverworts and a Hornwort) from Kolhapur District”, *Pharmacognosy Journal* 2(16), 29-32, 2010.

Sousa S.M., Silva, P.S., Campos, J.M.S. and Viccini, L.F., “Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenacea”, *Caryologia*, Vol. 62, no. 4: 326-333, 2009.

Spjut, R.W., Cassady, J.M., McCloud, T., Suffness, M., Norris, D.H., Cragg, G.M. and Edson, C.F., “Variation in Cytotoxicity and Antitumor Activity Among Samples of the Moss *Claopodium crispifolium* (Thuidiaceae)”, *Economic Botany*, Vol. 42, No. 1, pp. 62-72, 1988.

Tekerlek, P., “Bazı Bryofit Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi”, *Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, Niğde, Sayfa 75, 2012.

Veljic, M., Duric, A., Sokovic, M., Giric, A., Glamoclija, J. and Marin, P.D., “Antimikrobiyal activity of methanol extracts of *Fontinalis antipyretica*, *Hypnum cupressiforme*, and *Ctenidium molluscum*”, *Arch. Biol. Sci.* Belgrade 61(2), 225-229, 2009.

Yıldız, A.M., “Endemik Bir Tür Olan *Stachys petrokosmos* Bitki Ekstraktının Metabolik Aktivatör Varlığında ve Yokluğunda İnsan Lenfositlerinde Genotoksik ve Anti-Genotoksik Etkisi”, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, Sayfa: 70, 2010.

Xiao, J.B., Chen, X.Q., Zhang, Y.W., Jiang, X.Y. and Xu, M., “Cytotoxicity of *Marchantia convoluta* Leaf Extracts to Human Liver and Lung Cancer Cells”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39: 731-738, 2006.

Qu, Y.H., Xu, G.X., Zhou, J.Z., Chen, T.D., Zhu, L.F., Shields, P.G., Wang, H.W. and Gao, Y.T., “Genotoxicity of Heated Cooking Oil Vapors.”, *Mutation Res.*, 298: 105-111, 1992.

(http://www.wnmu.edu/academic/nspages/gilafiora/chiloscyphus_polyanthos.html).

ÖZGEÇMİŞ

Cansu AYDIN 19.08.1990 tarihinde BURSA/Yıldırım'da doğdu. İlk ve orta öğretimini Bursa/Osmangazi'de, lise öğretimini Bursa/Yıldırım'da tamamladı. 2008 yılında girdiği Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Haziran 2012'de mezun oldu. 2013 öğretim yılında Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2014 öğretim yılında Niğde Üniversitesi Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon öğrenimini tamamladı. Bilim dalındaki ilgi alanı Genetik'tir.

TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER (MAKALE, BİLDİRİ, POSTER VB.)

Bu tez çalışmasından, 1 (bir) adet uluslararası poster bildirisi üretilmiştir. Üretilen bu çalışma aşağıda sunulmuştur.

Diler, S. B., Aydın C., Kara, R., ‘‘ The Investigation of cytotoxic and genotoxic effects of *Chiloscyphus polyanthos* liverworts extracts on human peripheral blood lymphocytes’’, **3rd Anticancer Agent Development Congress**, İzmir, TÜRKİYE, s. 196, 173-174 Mayıs 2015.