

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRMIZI AHUDUDU (*Rubus idaeus* L.)' NUN İNSAN KROMOZOMLARINDA
KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Sevda MANKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Süleyman GÜL**

HAZİRAN-2020

KARS



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**KIRMIZI AHUDUDU (*Rubus idaeus* L.)' NUN İNSAN KROMOZOMLARINDA
KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Sevda MANKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Süleyman GÜL**

Bu tez çalışması 2017-FM-64 nolu proje ile KAÜBAP tarafından desteklenmiştir.

**HAZİRAN-2020
KARS**

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Sevda MANKAN

Tarih

ÖZET

(Yüksek Lisans Tezi)

KIRMIZI AHUDUDU (*Rubus idaeus* L.)' NUN İNSAN KROMOZOMLARINDA
KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevda MANKAN

Kafkas Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Süleyman GÜL

Kırmızı ahududu (*Rubus idaeus*) antikarsinojenik ve antimutajenik etkileri olduğu bildirilen, Avrupa ve kuzey Asya'da doğal olarak yetişen kırmızı meyveli bir *Rubus* türüdür. Bu çalışmada, kültüre edilmiş insan lenfosit kromozomlarında MMC ile artırılmış KKD düzeyine *R. idaeus* özütünün etkileri incelendi. Özütler, 0.2, 0.4, 0.8 ve 1.6 µl/ml son konsantrasyon olarak KKD çalışmalarında kullanıldı. Kültür işleminin başlamasında 48 saat sonra *R.idaeus* özütünün test dozları kültür ortamına eklendi. İkinci mitotik bölünme evresindeki metafazların KKD incelenmesi ile MMC ile artan KKD oranlarının *R. idaeus* özütünün tüm dozları ile azaldığı belirlendi. *R. idaeus* özütleri, 24 saatlik uygulama sonucu replikasyon indeksini (RI) doza bağlı olarak arttırdı. Sonuçlar diyetle *R. idaeus* tüketiminin, mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin etkilerine karşı koruyucu olabileceğini de gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *Rubus idaeus*, kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi.

2020, 46 Sayfa

ABSTRACT

(M. Sc. Thesis)

AN INVESTIGATION OF *Rubus idaeus* EXTRACTS ON CULTURED HUMAN LYPHOCYTE CHROMOSOMES SCE FREQUENCY

Sevda MANKAN

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Süleyman GÜL

Rubus idaeus is a red-fruited species of *Rubus* native to Europe and northern Asia which are reported to have anticarcinogenic and antimutagenic effects. In the present study, the effect of addition of extract of *R. idaeus* on mitomycin-C (MMC) induced sister chromatid exchange (SCE) in cultured human peripheral blood lymphocytes was investigated. The extract was tested at final concentrations of 0,2, 0.4, 0.8 and 1.6 µl/ml culture and set for SCE assay. The test concentrations of *R. idaeus* extract were added to the culture following 48 h from the initiation of culture. Enumeration of SCE in second division mitotic cells indicated that *R.idaeus* extract significantly reduced MMC induced SCE at all the concentrations tested. *R. idaeus* extracts increased the RI for the 24 h treatment time in a dose-dependent manner. The results could also showed that *R. idaeus* could be protective against mutagenic and carcinogenic compounds when consumed through the diet.

Key Words: *Rubus idaeus*, sister chromatid exchange, replication index.

2020, 46 pages

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğum her konuda bana yol gösteren ve tecrübelerinden faydalanma imkânı sağlayan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Süleyman GÜL' e,

Deney sürecinde karşılaştığım bütün olumsuzluklara rağmen destek olmayı sürdüren ve tecrübeleri ile yol gösteren sayın hocam Doktora Öğretim Görevlisi Müge MAVİOĞLU' na,

Yılmadan, yorulmadan, pes etmeden ve özellikle tüm inancıyla çalışmalara katılan yüksek lisans öğrencisi arkadaşım Sübhan ÖZÇAĞDAVUL'a,

Hayatımın her alanında yanımda olan, mutluluğumu önemseyen ve beni var eden kocaman aileme sonsuz teşekkürler.

İmza
Sevda MANKAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1 Giriş.....	1
1.1.1 Üzümsü Meyve	2
1.1.1.1 Ahududu (<i>R. idaeus</i>)	3
1.1.1.2 <i>R. idaeus</i> Bitkisinin Sağlık Açısından Tarihsel Süreci	6
1.1.2 Kromozom Yapısı	7
1.1.2.1 Kromozomu Oluşturan Özel Bölgeler	9
1.1.3 Hücresel Döngü.....	10
1.1.4 Crossing-over.....	11
1.1.5 Genetik Toksikite Testleri	12
1.1.5.1 Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)	14
2. MATERYAL ve METOT	18
2.1 Materyal	18
2.1.1 Kullanılan Maddeler ve Çözeltiler	18
2.1.1.1 Mitomisin-C	18
2.1.1.2 Kolşisin	18
2.1.1.3 <i>R. idaeus</i> Ekstraktı	19
2.1.1.4 Kromozom Medyumları.....	19
2.1.1.5 Hipotonik Çözelti	19
2.1.1.6 Carnoy Fiksatif.....	19
2.1.1.7 Sorensen Tampon Solüsyonu.....	19

2.1.1.8	Entellan	20
2.1.1.9	Giemsa.....	20
2.1.1.10	Heparin.....	20
2.1.1.11	5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	20
2.1.1.12	Standart Saline Citrate (SSC) Çözeltisi.....	20
2.1.1.13	Aseton	21
2.1.1.14	Lamların Temizliği.....	21
2.1.2	Kullanılan Laboratuvar Aletleri	21
2.1.2.1	Hassas Terazi	21
2.1.2.2	Santrifüj.....	21
2.1.2.3	Mikroskop	22
2.1.2.4	Benmari.....	22
2.1.2.5	Vorteks	22
2.1.2.6	pH Metre	22
2.1.2.7	Etüv	22
2.2	Metot.....	23
2.2.1	Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	23
2.2.2	Preparatların Boyanması	24
2.2.3	Mikroskopik İnceleme	25
2.2.4	KKD Sayısının Saptanması.....	25
2.2.5	Replikasyon İndeksinin (RI) Saptanması.....	25
2.2.6	İstatistiksel Analizler.....	26
3.	BULGULAR	27
3.1	<i>R. idaeus</i> Ekstraktının Farklı 4 Dozunun MMC'ye Karşı İnsan Periferik Lenfosit Kültüründe Antimutajenik Etkileri.....	27
3.2	<i>R. idaeus</i> Ekstraktı Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi (%).....	29
4.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	34
	ÖZGEÇMİŞ.....	46

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1 <i>Rubus ideaus</i>	5
Resim 3.1 M1 evresindeki metafaz görüntüsü (X1000).....	32
Resim 3.2 M2 evresindeki metafaz görüntüsü (X1000).....	32
Resim 3.3 M3 evresindeki metafaz görüntüsü (X1000).....	33



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1 <i>R. idaeus</i> ekstraktının farklı 4 dozunun MMC'ye karşı insan periferal lenfosit kültüründe antimitajenik etkileri	27
Tablo 3.2 <i>R. idaeus</i> ekstraktı gruplarının insan lenfosit hücrelerinde replikasyon indeksi (%).....	29



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Temsili kromozom yapısının gösterimi	7
Şekil 1.2	Hücresel döngü aşamaları.....	11
Şekil 1.3	Genotoksinin DNA üzerine yaptığı etkiler ve sonuçlar.....	13
Şekil 1.4	Kardeş kromatid değişiminin şematik gösterimi	16
Şekil 1.5	Holiday modeline göre KKD oluş mekanizması.....	17
Şekil 3.1	<i>R.idaeus</i> ekstraktının farklı 4 dozu ile 1 gün boyunca muamelesi yapılan insan periferik lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı (A: Pozitif Kontrol, B: MMC+ <i>R.idaeus</i> (0.2 µl/ml), C: MMC+ <i>R.idaeus</i> (0.4 µl/ml), D: MMC+ <i>R.idaeus</i> (0.8 µl/ml), E: MMC+ <i>R.idaeus</i> (1.6 µl/ml), F: Aseton (2.5 µl/ml), G: Negatif Kontrol).....	28
Şekil 3.2	<i>R.idaeus</i> ekstraktının farklı 4 doz ile 1 gün boyunca muamelesi yapılan insan periferik lenfositlerinde ortalama replikasyon indeksi (A: Pozitif Kontrol, B: MMC+ <i>R.idaeus</i> (0.2 µl/ml), C: MMC+ <i>R.idaeus</i> (0.4 µl/ml), D: MMC+ <i>R.idaeus</i> (0.8 µl/ml), E: MMC+ <i>R.idaeus</i> (1.6 µl/ml), F: Aseton (2.5 µl/ml), G: Negatif Kontrol).	30
Şekil 3.3	<i>R.idaeus</i> için doz ve replikasyon indeksi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r= 0.14$).	31

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BrdU	: 5'-Bromo-2'-deoxyuridine
Caco-2	: İnsan kolon kanser hücreleri
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
gr	: Gram
KA	: Kromozom aberasyonu
KCl	: Potasyum klorid
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDS	: Miyelodisplastik sendrom
mL	: Mililitre
MN	: Mikronükleus
MMC	: Mitomisin-C
NaCl	: Sodyum klorür
RNA	: Ribonükleik asit
RI	: Replikasyon İndeksi
rpm	: Devir sayısı
SEM	: Ortalamanın standart sapması
SSC	: Standart Saline Citrate
UV	Ultra Viyole
μ g	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre
pH	: H ⁺ iyonu konsantrasyonunun (-) logaritması
°C	: Santigrad derece
G ₁ -S-G ₂	: Hücre siklusunda interfaz
KH ₂ PO ₄	: Monobazik potasyum fosfat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojen fosfat

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

Bilimin ve teknolojinin sürekli olarak artan gelişimi sayesinde, insanlar yaşamlarını sağlıklı sürdürmeye ve insan sağlığı açısından daha yararlı besin ve gıda tüketmeye oldukça önem göstermeye başlamışlardır. Bundan dolayı, tüketilen meyve türlerine gösterilen özen de giderek artmıştır [1]. Teknolojinin gelişmesine paralel olarak üretilen kimyaya ait maddelerin, besinlerdeki ilave maddelerin, tarım alanında tercih edilen ilaçların ve doğaya verilen atık maddelerin kalıtım materyalinde hasara neden olma ihtimali oldukça yüksektir. Bu sebeple, yapılan araştırmalar arasında mutajenik, karsinojenik, antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin canlı üzerinde gösterdiği etkilerinin araştırılması daha önemli hale gelmiştir [2]. Ayrıca kullanılan ilaçların tümü, farmakokinetik çalışmalardan geçmelerine rağmen bu ilaçların metabolitlerinin canlılar ve çevre üzerindeki uzun sürede oluşturdukları etkiler konusunda yeterli sayıda çalışmaya rastlanmamaktadır [3].

Oluşan bu etkilerin araştırılmasında kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanı, genotoksik ajanların DNA (deoksiribonükleik asit)' da sebep olduğu hasarın kromozom düzeyinde tespit edilmesine yardımcı olan KKD (kardeş kromatid değişimi) analizidir [4]. Bu bağlamda, bitkilerin toksikolojik açıdan oluşturduğu zararların, gerek yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar gerekse de bitki kullanımlarının oldukça artış göstermesi değerlendirmeler yapılmasını da zorunlu hale getirmektedir [5]. Yapılan bu değerlendirmeleri toksisite testleri adı altında birleştirmek mümkün olabilmektedir. Kalıtım materyali ile zararlı olan maddelerin etkileşime girmesi sonucunda ortaya çıkan ve daha sonra ki oluşacak döllere aktarılan bu testler genetik toksisite olarak adlandırılmaktadır [6]. Genotoksik maddeler olarak adlandırılan ifade ise genotoksisiteye sebep olan maddelerdir. Bütün ilaçlar, pestisitler, kozmetik sanayide kullanılan malzemeler ve ayrıca sanayi endüstrisinde kullanıldığında kişileri olumsuz etkileyen bu kimyasallar toksik özelliklere sahip oldukça tehlikeli maddelerdir. Bundan dolayı, kullanılan bu maddeleri kullanıma sunmadan önce toksik potansiyelleri bakımından değerlendirme altına alınmaları gerekmektedir [7].

Bitkisel maddelerin sağlık açısından faydalı özelliklerinin çoğunda muhteviyatlarındaki antioksidanların önemli olduğu belirtilmektedir. Fenolik yapıda olan sekonder metabolitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu özellikte ve yapay olmayan maddelerin kişilerin sağlıklarına olumlu ve olumsuz etkilerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu etkilerin bilinmesine oldukça fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Fenolik bileşiklerin ise sitotoksisite ve genetik toksisite açısından ne gibi etkileri olduğunun öğrenilmesi yapay ve yapay olmayan maddelere gösterilen değer önemli derecede etkileyecektir. Ahududu (*R. idaeus*) bitkisinin içeriğinde doğal olarak bulunan fenolik asitlere ve antosiyaninlere ek olarak, aynı şekilde içeriğinde bulunan vitamin ve yoğun mineral konsantrasyonlarından dolayı bu bitkinin antioksidan ve antimikrobiyal potansiyeli özellikleri açısından yapılan incelemelerin fazla sayıda olması da dikkat çekmektedir [8-11].

Yapılan literatür taramaları doğrultusunda, Türkiye’de doğal olarak yetişen ve sağlık açısından önemli etken madde içeren ahududu bitkisinin ekstraktlarının genetik materyal olan DNA’ dan oluşmuş kromozomun yapısına olası etkilerin araştırıldığı kısıtlı sayıda araştırmaya rastlanmaktadır [8, 11].

Yapılması planlanan bu çalışmada, özellikle Türkiye’ nin kuzey kesimlerinde ve Kars bölgesinde kendiliğinden yetişme imkanı bulan ayrıca tıbbi ve aromatik bitkiler içerisinde etkili bir fark meydana getirme özelliğinde olması muhakeme edilen *R. idaeus* bitki ekstraktlarının kardeş kromatid değişimleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi hedeflendi.

1.1.1 Üzümsü Meyve

Üzümsü meyveler içerisinde çok fazla tür bulunmaktadır. *Vitis* (zm), *Fragaria* (ilek), *Rubus* (ahududu-böğürtlen), *Ribes* (bektaşi zm), *Vaccinium* (bataklık yaban mersini), *Rosa* (kuşburnu), *Berberis* (kadın tuzluğu) ve daha birçok türün olduğu bilinmektedir [12]. Ülkemiz için zms meyveler konusu ilek bitkisi hariç oldukça yenidir. Ancak son 25-30 sene içerisin de giderek yükselen bir değer gören zms meyveler, farklı tarzlarda uygulaması olan ve çokca tüketimi yapılan meyve türleri

arasında yer almaktadır [13]. Üzümsü meyvelerde yoğun olarak bulunan maddeler arasında fenolik asitler ve vitaminler grubundan ise özellikle C vitamini olarak bilinen askorbik asit yer almaktadır. C vitamini, frenk üzümü ve *Fragaria* gibi meyvelerin içeriğinde yoğun miktarda bulunurken, diğer üzümsü meyvelerde ise bitki türlerinde genellikle hakim olan fenolik bileşik maddeler bulunmaktadır [14].

Fenolik bileşiklerin içeriğinde olan ve üzümsü meyvelerde de yüksek düzeyde bulunan antosiyanin maddesi virüslere ve bakterilere karşı etkili olan özellikleri de yüksek antioksidan düzeyleri ile örtüşmektedir [15, 16]. Önemli hastalıklar (kanser) arasında ölüm oranını önemli düzeyde etkisi altına alan ve insan sağlığı sorunlarına önlem almayı sağlayan bitkiler arasında üzümsü meyveler olduğu belirtilmektedir. Bu bitkilerin ise bilhassa antosiyanin muhteviyatı yönünden oldukça üst düzeyde olan ahududu, kuş üzümü ve vişne bitkilerinin faydalı etkilerinin olduğu kaydedilmektedir [14, 15, 17].

1.1.1.1 Ahududu (*R. idaeus*)

R. idaeus' un ismini İda dağından aldığı belirtilmektedir [12]. Ahududu bitkisinin bu dağ ile anılmasının temel sebebi ise, ilk defa Yunanlılar tarafından İda dağında bulunmasıdır [18].

Ahududu gibi üzümsü meyveler dünyada “bramble fruits” diye bilinmekle birlikte, iki yıldan daha çok süre yaşayan çalı formundaki bitkilerdir ve bu bitkiler her sene yeşil kalabilen bitkiler arasında bulunmazlar. Ahududu bitkisinin kökleri çok yıllık iken sürgünleri iki yıllıktır. Adventif tomurcuklar ilk olarak Otsu karakterde gelişirler daha sonra ise odunlaşma sürecine girerler. Bitkinin gelişim süreci ilkbahar döneminden sonbahara kadar devam etmektedir. Sürgünler, ikinci vejetasyon periyodunda az odunlaşabilen yan sürgünler oluşturarak dallanma gösterirler. Oluşan bu yan dalların koltuk bölgelerinde yada dal uçlarında çiçek salkımları oluşmaktadır. Sürgünler ve yapraklar üzerinde farklı kalınlıkta ve boyutlarda dikensi tüyler bulunmaktadır [12].

Üzüm sü meyveler arasında yer alan ahududu bitkisi, *Rosaceae* ailesinin *Rubus* cinsi içerisinde bulunmaktadır. *Rubus* cinsinin iki tane alt cinsi olduğu bilinmektedir. Bunlar; *Idaeobatus* ve *Eubatus*' dur. Oldukça fazla sayıda farklı özelliğe sahip türler içerir. Ahududu bitkisi, dünya üzerinde alan olarak geniş bir yayılım göstermektedir. Karadeniz bölgesi, ahududu bitkisi için anavatan olarak kabul edilmektedir. Türkiye'nin kuzey kesimlerinde, batı-doğu yönlü olarak uzanan, çoğunlukla yüksek bölgelerde, havanın nem oranı fazla olan yerlerde doğal olarak yetişmektedir. Kırmızı ahududu bitkisinin Floricane ve Primocane olarak belirtilmiş iki tipi bulunmaktadır. Bu iki çeşit arasındaki temel fark ise, Floricane yıl içerisinde iki defa ürün verirken, Primocane yılda sadece bir defa ürün verebilmektedir [19].

Gıda endüstrisinde oldukça fazla kullanım alanlarının yanısıra Ahududu bitkisinin kendisine özgü kokusu, tat aroması, yapısı ve dikkat çekici renkleri ile taze tüketimi tercih edilmektedir. Bu sebeple, meyve türleri içerisinde farklı bir öneme sahiptir. Ayrıca ahududunun muhteiyatında bulunan fenol, flavonoid, pigment ve vitamin maddelerin miktarı yönünden diğer bitkiler ile kıyaslanınca bu oranların daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir [15]. Ahududu çeşitlerinin çiçeklenmeleri ise buldukları bölgenin ekolojilerine göre farklılıklar göstermektedir. Bu bitkinin çiçek yapısı beşlidir. Çiçek formülü ise S5 P5 AJ GJ seklindedir. Genel olarak Ahududular erselik yani her iki eşeyi de bulduran çiçek yapısındadır [12].

Ahududu bitkisinin çeşitlerini 3 ana başlık altında ele almak mümkündür. Genellikle meyvelerin renklerine göre sınıflama yapılmıştır.

Bu çeşitler;

- a) *R. idaeus*-Kırmızı ahududu
- b) *R. occidentalis*-Siyah ahududu
- c) *R. neglectus*: *R. idaeus*/*R. occidentalis*-Mor ahudududur.

Ayrıca sarı meyvesi olan ahududu bitkisi de giderek değeri kazanmaya başlamıştır. *R. idaeus*' lar içerisinde yer alan sarı meyveli ahududular ise genellikle mutasyonlar sonucu oluşmuşlardır [12].

***R. idaeus'* un taksonomisi [20]**

Alem: *Plantae*

Altalem: *Tracheobionta*

Bölüm: *Magnoliophyta*

Sınıf: *Magnoliopsida*

Altsınıf: *Rosidae*

Takım: *Rosales*

Familya: *Rosaceae*

Cins: *Rubus* L.

Tür: ***Rubus idaeus* L.**



Resim 1.1 *Rubus idaeus* [21]

1.1.1.2 *R. idaeus* Bitkisinin Sağlık Açısından Tarihsel Süreci

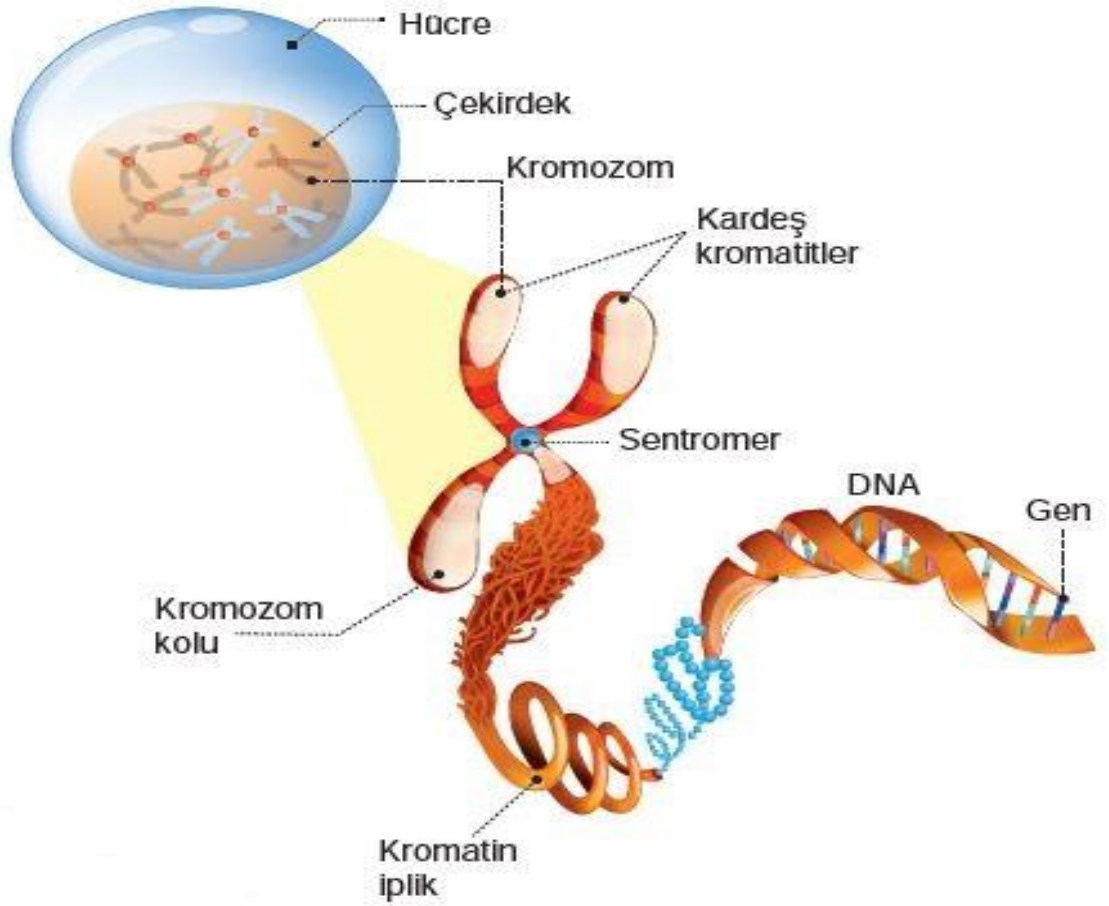
R. idaeus meyve ile yapraklarından alınmış olan kayıtlar çok eski tarihlere dayanmaktadır. 1898 yılından itibaren *R. idaeus*' un tıbbi amaçlar için kullanılmış birçok kısmının olduğu bildirilmektedir. Bitkinin yaprakları, içerdiği bazı bileşenlerini suya vermekle birlikte ayrıca bitkiden elde edilen sıvının ise siyah çaya benzer bir kokuda olduğu kayıtlara eklenmiştir [22]. *R. idaeus*' un eski çağlarda ve Yunanlılarda M.Ö. 370 yılında hasadının yapıldığı belirtilmiştir. Romalılarda ki durumsa M.Ö. 65 yılında bitkinin tüketim ihtiyacının fazlaştığı ve ahududu bitkisinin yetiştirilmesinin 16.yüzyıl dan itibaren Avrupa ülkelerinde yaygın hale geldiği kayıt altına alınmıştır [23].

Fenolik bileşik olan antioksidanlardan önemli kaynak olarak *R. idaeus* bitkisinin meyvesi tanımlanmıştır. Bu bileşiklerin, güçlü bir antioksidan nitelikte olduğu, özellikle oksijen radikallerini temizlediği ve yapılan *in-vitro* çalışmalarında oksidasyonun, bazı kanser hücrelerinin ve patojenik etkiye sahip bakterilerin çoğalmasını inhibe edici özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir [23]. *R. idaeus* meyvesinin çok miktardaki antosiyanin muhteviyatından dolayı oldukça etkili antioksidan ve antienflamatuvar özelliklere sebebiyet verdiği kaydedilmiştir. Ayrıca kolon ve akciğerdeki tümörlü hücreleri % 20-54 gibi ciddi oranda azaltma yaptığı da araştırmalar sonucunda belirtilmiştir [24].

Yapılan bir araştırmada, kolesterol yüksekliği olan rat canlısına verilen *R. idaeus* meyvesi, toplam kolesterol ve LDL kolesterolü azalttığı saptanmıştır [25]. Yapılan farklı bir çalışmada ise, *R. idaeus*' dan alınan yaprak ekstraktının kedinin uterus ve bağırsağındaki düz kasları gevşeten özellikte olduğu, fare canlısında ise merkez sinirsel sisteminde uyaran özellikte olduğu ayrıca kolinesteraz enzim aktivitesini bastırıcı yönde etkili olduğu belirtilmiştir [26].

1.1.2 Kromozom Yapısı

Çoğu canlılarda olduğu gibi insanlar da milyonlarca hücrelerden meydana gelmiştir. Hücreler bir stoplazma ve çekirdek olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Çekirdeğin iç kısmında kromozom adı verilen özel ipliksi parçalar vardır. Kromozom, yapısal olarak DNA zinciri ve histon olarak nitelendirilen protein zincirinden oluşur. DNA zincirlerinin görevi hücreye özgül proteinleri sentezlemektir ve canlıların bütün genel özelliklerini ortaya koyan gen olarak ifade edilen birimlerden meydana gelmiştir [27].



Şekil 1.1 Temsili kromozom yapısının gösterimi [28]

Genetik materyal denildiği zaman öncelikli olarak akla gelen ilk terimin kromozom olduğu bilinir. Kromozomlar, nesiller boyu aktarılan genetiksel özelliklerin ve bireyi oluşturan atasal karakterlerin kalıtsal özelliklerin açıklanmasında önemli bir rol sahiptir [29, 30]. Kromozomların üstünde birbirinden farklı boyanma özelliğinde olan iki kısım bulunmaktadır. Koyu olarak boyanan kısım heterokromatin ismi verilir. Ökromatin olarak ifade edilen diğer kısım ise açık olarak boyanan bölgelerdir. Genetik olarak aktif olmayan bu heterokromatin bölgeler birbiri üzerine sıkıca katlanmış kromozom ipliklerinden meydana gelmektedir [31, 32].

Genlerin genellikle organize olduğu birimler kromozomlardır. Canlı hücreler yapısal olarak ökaryot ve prokaryot olmak üzere iki farklı hücre yapısına sahiptir. Bu iki hücre yapısında kromozomlar da farklı şekilde bulunmaktadır. Ökaryotik hücre yapısına sahip bir canlıda her bir kromozom, DNA molekülü çift sarmal yapıdadır ve ilişkili proteinlerin oluşturduğu iplikçi parçalar halindedir. Prokaryot canlılarda ise DNA molekülü genel olarak halkasal yapıda ve stoplazmada dağınık halde bulunur. Bu durum ökaryot canlılar için farklılık gösterir ve kromozomlar çekirdekte belli bölgelerde yerleşmiş olarak bulunurlar. İlk defa 1879 yılında Flemming adlı bilim insanı tarafından yapılan bir çalışmada, kromozomlar mitoz esnasında ayrılmış olarak ışık mikroskobu ile gözlemlendiği kayıt altına alınmıştır. Organizmalar farklı morfolojik görüntüleri ile belli sayıda kromozoma sahiptir. [33].

Günümüzde ise kesin olarak insan kromozomlarının 46 olduğu ve bu kromozomların 44 ünün otozomal, diğer iki kromozomun ise cinsiyet kromozomu olduğu kanıtlanmıştır. Bu cinsiyet kromozomların genel olarak kadınlar için XX, erkekler için ise XY olduğu belirtilmiştir [34].

1.1.2.1 Kromozomu Oluşturan Özel Bölgeler

Sentromer

Kromozomu uzun (p) ve kısa (q) olarak isimlendirilen iki kola ayırır. Sitogenetik olarak belirleyici olan görüntüsü primer boğum şeklinde ifade edilmiştir. Spesifik bir şekilde proteinlerin bağlandığı ve bir seri DNA dizilerinden oluştuğu bilinmektedir.

Kromatid

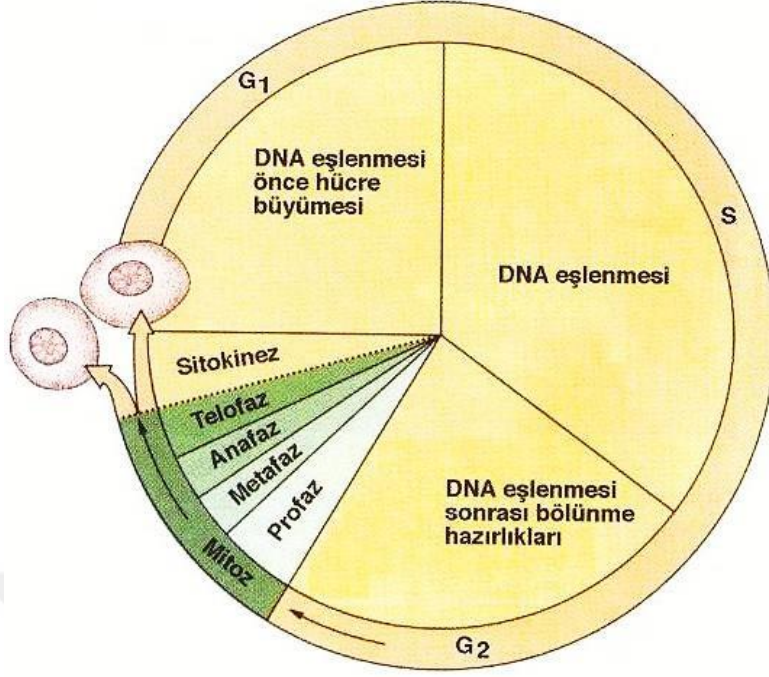
Genel olarak kromozomu oluşturan kollar şeklinde görünürler. Kromatin ipliklerin protein iskeletine sarılması ile oluşurlar. Kromozomun orta kısmında konumlanmış olan sentromer bölgesine göre kromozom kolu olarak isimlendirilirler [35].

Telomer

Hücre bütünlüğünün korunmasında etkili bir role sahip olmakla birlikte, kromozomların diğer kromozomlar ile yapışmasını ve kendi üzerine katlanmasını engelleyici özelliktedirler. Özel DNA dizilerinden oluşan telomerler kromozomların uç kısımlarında bulunur. Canlının yaşlanma sürecine girmesi ile birlikte boyları kısaltmaya başlar fakat bu durum kanser hücrelerini etkilemez [36].

1.1.3 Hücresel Döngü

Devamlı bir şekilde bölünmesi gereken hücreler, mitoz bölünmeden sonra G1/S/G2 (interfaz) ve M (mitoz) olacak şekilde tekrar edilir. Bu döngü esnasında hücrelerde uyarılma ve büyüme olayları meydana gelmektedir. Hücreler bölünme uyarısı almadıklarında dinlenme safhası olan G0 evresinde durmaya devam edeceklerdir [37, 38]. Hücre döngüsünün % 90'ını G1, S, G2 fazları (İnterfaz) kapsar ve bu fazlar 16 saat ile 1 gün içerisinde gerçekleşir. Mitoz bölünme 1 yada 2 saat kadar sürede tamamlanır. Bölünecek olan hücrelerin büyüme olayı G1 fazı içerisinde bulunan R point olarak adlandırılan kısıtlamayı yapan nokta kontrolünde düzenlenir. Hücreler, kısıtlayıcı noktada durabilir veya döngüyü tamamlayabilirler [38, 39]. G1 evresinde bulunan hücreler, gerekli sinyalleri alır ve büyüme başlar. Fazda gerçekleşen bir diğer olay ise, DNA sentezi (replikasyon) için gerekli hazırlıklar yapmaktır. S fazı içerisinde gerçekleşen DNA sentezini takiben, G2 fazında hücre büyümesi devamlı olur. Hücreler mitoz bölünmeye hazır duruma getirilir. Mitoz 4 farklı evreden oluşmaktadır. Bu evreler profaz, metafaz, anafaz ve son olarak telofazdır. Telofaz evresi ile birlikte sitoplazmik bölünme de tamamlanmış olur. Bölünmenin ardından benzer genetik materyalde olan iki yeni hücre meydana gelir [38-41]. Hücre döngüsünde bir fazda gerçekleşen olaylar tamamlanmadan diğer faza geçilirse DNA tam ve düzgün olarak kopyalanmadığından hücrede hasarlar oluşabilir. Hücre döngüsünde kontrol noktaları mevcuttur. Bu kontrol noktaları G1/S geçişlerinde, G2/M geçişlerinde ve metafaz/anafaz geçişlerinde bulunur. Bu noktalar da hücrelerin döngüye devam edeceğine veya etmeyeceğine karar verilir [38].



Şekil 1.2 Hücresel döngü aşamaları [42]

1.1.4 Crossing-over

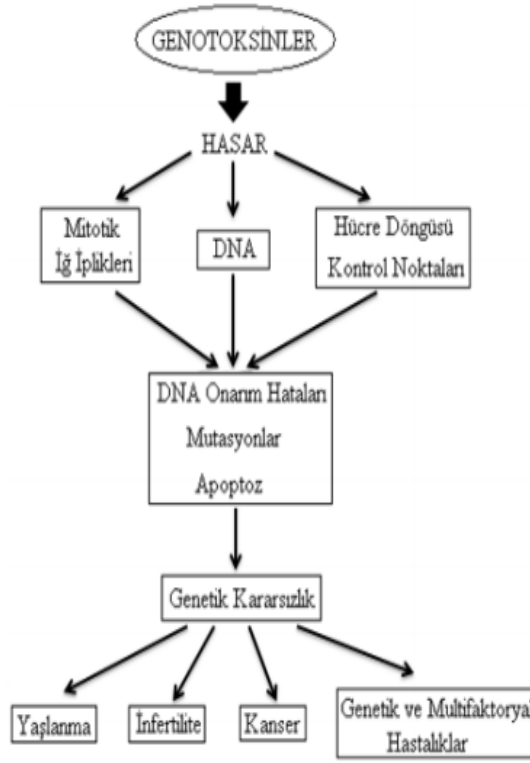
Çoğu canlı varlıkların birbirinden farklı özellikleri vardır. Bu değişik özellikler farklı canlılar arasında olduğu gibi aynı türe ait bireylerin arasında da olabilir. Aynı türe ait canlılarda olan ve genetiksel çeşitlilik diye adlandırılan bu özelliklerin gözlenmesinde mayoz bölünme önemli bir role sahiptir. Mayoz da gerçekleşen üç önemli olay vardır. Mayoz sürecinde oluşan ve çeşitliliğin artmasına sebebiyet veren, crossingover (Profaz I evresinde gözlenen), bağımsız dağılım (Metafaz I evresinde gözlenen) ayrıca ayrılma (Anafaz I evresinde gözlenen) bu önemli üç olaydır. Mayoz sonucunda ise dişi ve erkek üreme hücrelerinin tesadüf sel olarak birleşmesi çeşitliliğe sebep olur [43-45].

Krossing-over ya da parça değişimi olarak ifade edilen bu olay mayoz bölünmenin profaz I evresinde gerçekleşir. Krossing-over olayı sonrasında genetik çeşitlenme (rekombinasyon) meydana gelir. Ayrı kromozomlar üzerinde yer alan gen alelleri birbirleriyle konum değişikliği gerçekleştirir. Krossing-over, genel olarak sinapsis olarak nitelendirilen temas noktalarında gerçekleşir. Krossing-over olayında ilk önce genellikle replike olan kromozomlar eşleşmiş olduğu kısımlardan kırılır. Daha sonra

farklı olan başka bir kromozom ile birleşme olur. Bu parça değişikliğinin gerçekleştirildiği genler ise kromozomlar arasında yer değişimi gerçekleştirir. Bu olaya genetik çeşitlenme (rekombinasyon) ismi verilir. Gerçekleşen bu olay esnasında aralarında benzerlik olan iki DNA parçası aynı noktalardan kırılmalar meydana getirir. Bu parçaların kırıklarının onarması ise karşısındaki zincirin diğer parçasıyla birleşmesi ile olmaktadır [46].

1.1.5 Genetik Toksikite Testleri

Genetik toksisite testleri, genetik materyal içerisinde hasarlara sebep olan etkenleri saptamak maksadıyla geliştirilen ve çeşitli mekanizmalarla direkt yada indirekt olarak yapılan, *in-vitro/ in-vivo* testlerden oluşmaktadır. 1970 yılından itibaren mutajen etkilere sahip kimyasalların karsinojenik özelliklerini tespit etmek amacıyla çok sayıda genetik toksisite testlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu testler birçok kimyasal ve fiziksel ajanın genetik materyaldeki yaptığı değişimleri araştırmada tercih edilmektedir [47-51]. Genetik materyalde tamir edilemeyen hasarlar kromozomal aberasyona, DNA sekans değişikliklerine neden olabilen bir yada daha fazla nükleotid değişikliğine bağlı olarak gelişen mutasyon, rekombinasyon, yaşlanma, kanser ve doku hasarları oluşumuna neden olabilmektedir [52].



Şekil 1.3 Genotoksinin DNA üzerine yaptığı etkiler ve sonuçlar [53]

Genotoksisite testleri temel olarak toplam genleri etkileyebilen UV ışınları ve irradasyon gibi fiziksel etkenlerin, ilaçlar, parazitlerin sebep olduğu enfeksiyonların, pestisit diye adlandırılan böcek öldürücülerin, gıda maddelerinde kullanılan katkıların, nanomateryaller gibi birçok kimyasal ajanın kanserojenik ve genotoksik kapasitelerinin tespitinde, farmakolojik alanda ise kullanılacak ilaçların satışa sunulmadan evvel ve ilaçları kullanmış olan insanlardaki genetik etkilerini ve bu ilaçların güvenilirlik derecesini belirlemede, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarlarının ortaya konulmasında, hastalıklar ve genetik hasar arasındaki bağlantının teşhisinde, kansere önlem almada, kansere karşı hassasiyetin gözlemlenmesinde ve rahatsızlığın takibinin yapılmasında biyoizlem testleri adı altında yapılmaktadır [54-65]. Canlıların DNA'larında oluşan mutasyonlar *in-vitro* memelilerdeki hücrenin genetiksel mutasyonu yöntemi, bakteriler kullanılarak yapılan geriye yönelik mutasyonel testler yoluyla belirlendiği bilinmektedir [66].

Genetik toksisite testleri içerisinde yaygın olarak kullanılan ve genetik olarak toksik etkisi öğrenilmeyen maddelerin kanserojen yada mutajen olabilme potansiyellerinin

araştırma yapılmasında kullanımı tercih edilen *in-vitro* yada *in-vivo* mutajenik özellikleri belirleme yöntemleri; kromozom aberasyonları testi (KA), kardeş kromatid değişimleri (KKD), mikronükleus oluşumu (MN), ames ve comet analiz testleridir [51].

1.1.5.1 Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)

KKD, kardeş kromatidler arasında, kromozom morfolojisi değişmeksizin, özdeş olan segmentlerin simetrik olarak genetik materyal alışverişi sonucu oluşan bir değişim olduğu bilinmektedir. Kardeş kromatidler arasında gerçekleşen bu değişimler gen kuvvetlendirilmesi (amplifikasyonu) ve canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranı ile ilişkilidir [67-70]. KKD yöntemi, anne ve babadan gelen kromozomların gen bölgeleri arasındaki DNA eşlenmesi sonucu oluşan ürünlerin değişimini test etmektedir. Bu test sayesinde mikroskobik olarak tanımlanabilen kromozomal hasarlar gösterilebilmektedir [67, 71, 72].

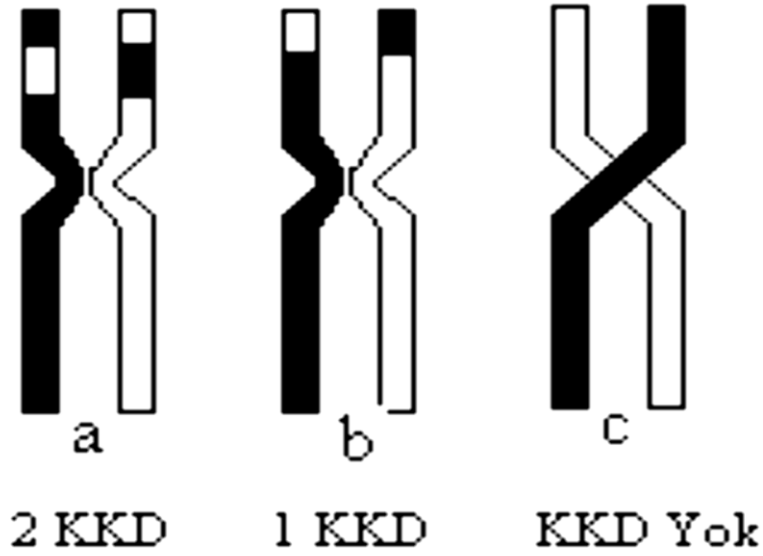
DNA eşlenmesi ile etkileşime girmiş mutajenik bileşiklerin tespitini amaçlayan bu test; çeşitli ajanların karsinojenik ve mutajenik etkilerinin, laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda belirleyici yöntem olarak özellikle de kromozomlarda oluşan değişimlerinin incelenmesi bakımından önemli bir yere sahiptir. Bu sebeple kimyasal maddelerin mutajenik veya karsinojenik etkilerini tespit etmek açısından oldukça uygun bir metot olarak kabul görmektedir [50, 51, 67-70, 73]. İlk defa timin varlığında KKD analiz yöntemi, kromozomlardaki kardeş kromatidlerin farklı boyandığı otoradyografik yöntem kullanılması ile ortaya konulmuştur [39]. Son yıllarda ise otoradyografik çalışmalarından farklı olarak, timin analogu olarak bilinen BrdU kimyasalının tercih edilmesi, KKD sıklığını kolay bir şekilde ve hızlı gösterilmesine imkan sağlamıştır. Böylelikle KKD sistemi, BrdU tercih edilmesi ve yeni boyama tekniklerinin geliştirilmesi ile oldukça fazla değer kazanmıştır [74].

KKD, DNA'ya eşdeğer olacak şekilde bağlanması ya da DNA tamir mekanizmasına müdahale edilmesiyle meydana gelmektedir. KKD sıklığında ki artışların sebebi olarak, DNA sarmalında ki değişiklikler ile DNA da kırılmaların olması ve yeniden birleşmesi sırasında kimyasal veya fiziksel ajanlara maruz kalınması olduğu bilinmektedir.

Gerçekleşen tüm bu olaylar hücre döngüsünün S fazında gerçekleştiği belirtilmektedir. KKD analizinin genotoksisitenin ölçülmesinde kullanılan diğer yöntemlere nazaran oldukça hassas olduğu bildirilmektedir [75, 76].

KKD analiz yöntemi ilk olarak 1958 yılında J.H. Taylor tarafından geliştirilmiştir. Taylor, nonradyoaktif ortamda bir döngü timin birleşmesine uğrayıp kromozomların kardeş kromatidlerini incelemiştir. Yapılan bu KKD incelemeleri ile kromozom yapısını, DNA' nın nasıl düzenlenme gösterdiğini ve kromatidlerin ne şekilde dağılım gösterdiğini anlamaya olanak sağlamıştır [76-78]. Fakat geliştirilen bu yöntemin zaman kaybına sebep olduğu düşünüldüğü için, 1972 yılında A.F. Zakharov ve NA. Egolina farklı bir teknik geliştirmişlerdir. Kimyasal olarak birbirinden farklı iki kardeş kromatid olarak görüntülenmesini sağlayan radyoaktif 5-bromodeoksiuridin (BrdU) boyama tekniğini kullanmışlardır [77]. BrdU' nun timin analogu olduğu ve kültür ortamında çoğalan hücrelerde timin yerine geçtiği bilinmektedir. Hücreler *in-vivo* koşullarda bir replikasyon döngüsü, *in-vitro* koşullarda ise bir yada iki replikasyon döngüsü BrdU kimyasalına maruz bırakılmaktadır [78].

BrdU'nun görünür hale getirilmesi çeşitli floresan boyalar ile mümkün olmaktadır. Örnek olarak; benzimidazole, akridin orange, giemsa ve hoechst kombinasyonu verilebilir [77]. Kromatidlerin DNA zincirlerinde bulunan BrdU, Hoechst kimyasalı ile soluk bir şekilde boyanacaktır. Bu durum BrdU yönteminin avantajıdır çünkü floresan sindirimi BrdU miktarına ve yerine geçmiş olduğu zincire bağlı çok veya daha az parladığı bildirilmiştir. Kolaylık sağlaması açısından boyamada Floresan + Giemsa (FPG) boyama tekniği kullanılır. Giemsa boyası ile Hoechst aydınlık bölgesi koyu, Hoechst soluk boyanan bölgesi ise açık boyanır. KKD sıklığının; BrdU konsantrasyonundan, kültür medyumundan, serumdan, ısı derecesinden, ışık yoğunluğundan ve harvest zamanından etkilendiği belirtilmektedir [76, 78].

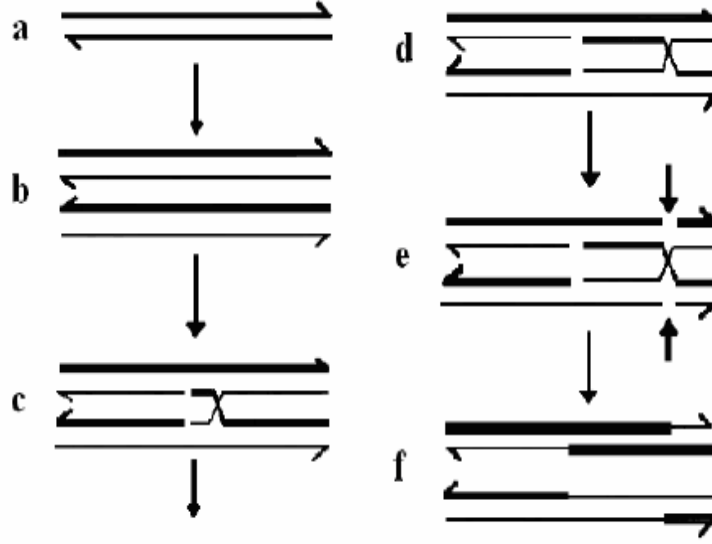


Şekil 1.4 Kardeş kromatid değişiminin şematik gösterimi [79]

KKD'nin oluş mekanizması konusunda farklı birçok model ortaya konulmuştur [74]. KKD oluş mekanizmasını ve hücrede DNA parçaları arasındaki farklılıkları açıklayan yaklaşımlardan bir tanesi "Holiday Modeli" dir ve bu model KKD' yi genel olarak ifade etmektedir. Hücrelerin BrdU varlığında bir mitoz geçirmeleri bu modele göre yeterli olmaktadır. Holiday modeli şekil 1.5.'te açıklanmıştır [67].

- 1) Kalın çizgi (ağır) şeklinde ifade edilen, birbirini tamamlayan atasal DNA zincirleridir.
- 2) Yapılacak olan yeni DNA sentezi BrdU varlığında gerçekleşmektedir ve ince çizgiyle gösterilen BrdU içeren iplikdir.
- 3) Kırılma olayı çift zincirli olan DNA'da görülmektedir. Bu zincirler arasında crossing-over olayı meydana gelmektedir.
- 4) Dış taraftaki ağır ve hafif DNA zincirlerinde kırılmaların oluşması, rekombinant DNA'ları oluşturur ve bu sayede iki DNA molekülü birbirinden ayrılmaktadır.
- 5) Oluşan rekombinant DNA molekülleri; ağır\ağır\hafif, hafif\hafif\ağır, hafif\ağır\ağır ve ağır\hafif\hafif olacak şekilde heterodubleks yapı oluşturmaktadır.

DNA molekülü içerisinde ağır_ağır olan bölgeler koyu renkli, hafif_hafif olan bölgeler ise açık renkli boyanmakta ve bu sayede KKD oluşumu belirtilmektedir [67].



Şekil 1.5 Holiday modeline göre KKD oluş mekanizması [4].

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

Bu çalışmaya, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 01.03.2017/21 sayılı izin ile başlandı. Çalışmada test maddesi olarak *R. idaeus* bitkisinin toprak üstünde bulunan kısımların sıvı ekstraktı kullanıldı. Materyal olarak ise sağlık sorunu bulunmayan ve sigara içmeyen 6 erkek - 6 kadından (19-25 yaş) alınan periferik kan örnekleri kullanıldı.

2.1.1 Kullanılan Maddeler ve Çözeltiler

2.1.1.1 Mitomisin-C

Mitomisin-C (MMC), renk olarak mavi-menekşe görünümüne sahip, kristalimsi olarak bulunan ve su içerisinde eriyen kimyaya ait bir maddedir. Antineoplastik ve hücrenin bölünmesini engelleyen ajan olarak kullanılmaktadır. MMC çözeltisinden kültür ortamına 0.3 µg MMC/ml besiyeri olacak biçimde ilave edildi. Hazırlanan solüsyon (pH=6-9), 2-8°C arası sıcaklıkta ve ışıktan korunarak kullanıldı.

2.1.1.2 Kolşisin

Kolşisin, kromozom preparatlarının elde edilmesi amacıyla hücrenin bölünmesini engellenerek metafaz safhalarının stabil kalması için kullanıldı. Kolşisin çözeltisi saf su kullanılarak hazırlandı. Kromozom medyumlarının her ml'sinde 0.06 µL olacak biçimde 5 ml olan kromozom medyumlarına ilave edildi.

2.1.1.3 R. idaeus Ekstraktı

R. idaeus ekstraktlarından 100 µL alındı ve 400 µL aseton eklenerek karıştırılıp homojenik bir çözelti oluşturuldu.

2.1.1.4 Kromozom Medyumları

Bu çalışmada Biochrom firması tarafından üretimi yapılan Chromosome Medium B, hücre kültürü olarak kullanıldı. Bu medyumdan her tüp için 5 ml olacak şekilde paylaştırıldı.

2.1.1.5 Hipotonik Çözelti

Toz halde saf olan KCl' den % 0, 4' lük KCl stok çözeltisi hipotonik amacıyla tercih edildi. Çözelti distile olan su ile hazırlanan tüm kromozom medyumlarına yetebilecek oranda hazırlanıp 37°C' lik etüvde muhafaza edildi.

2.1.1.6 Carnoy Fiksatif

Glasiyel asetik asit ve absolüt metanol 1/3 oranında karıştırılarak hazırlandı. Kullanılmadan 2 saat önce buzdolabında bekletildi.

2.1.1.7 Sorensen Tampon Solüsyonu

Bu tampon solüsyonu stok olan tampon A, diğeri ise tampon B şeklinde hazırlandı. 4°C' de muhafaza edildi. Tampon A ve B solüsyonları genetik toksisite yöntemleri sırasında değişik yerlerde ve amaçlar doğrultusunda gerekli olan karışımlar şeklinde tercih edildi.

Tampon A: 11.34 g KH_2PO_4 250 ml distile suda çözüldü (pH=4.80)

Tampon B: 14.83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml distile su içinde çözüldü (pH=9.30)

2.1.1.8 Entellan

Preparatları hazır hale getirirken lam ve lameli birbiri üzerine yapışmasını sağlamak amacıyla gerekli olan solüsyondur.

2.1.1.9 Giemsa

Sorensen Tampon Solusyonu içerisinde Giemsa boyasının % 5' lik çözeltileri çalışmada preparatların boyanmasını sağlamak amacıyla tercih edildi.

2.1.1.10 Heparin

Kan örneklerinin alınımı yapılırken antikoagülan olarak 5000 U/ml'lik heparinden hacime paralel olarak tercih edildi.

2.1.1.11 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

BrdU'dan 5 mg alınarak 10 ml Chromosome Medium B' de çözdürüldü (50 µg/100 µl medium). Bu solüsyondan KKD çalışmasında besi yerine 10 µg/ml eklendi (100 µl).

2.1.1.12 Standart Saline Citrate (SSC) Çözeltisi

Kardeş kromatidler arasında ki kontrast farkını ışınlamadan sonra artırmak amacıyla bu çözelti hazırlandı. Çözeltide 21.9 gr NaCl ve 11.05 gr trisodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) kullanıldı. Bu iki madde bir miktar saf su ile ayrı kaplarda çözdürüldü. Sonra aynı kaba alınarak karıştırıldı. Hazırlanılan karışım 500 ml ye saf su ile tamamlandı. Sonuç olarak hazırlanılan stok çözelti 5xSSC dir. Buzdolabında muhafaza edildi. Çalışmada stok içerisinde 20 ml alınarak üstü 100 ml olacak şekilde distile su eklendi. Elde edilen 1xSSC kullanıldı.

2.1.1.13 Aseton

5 ml besiyerine eklenecek olan aseton 2.5 µl/ml olarak hesaplandı ve ayrıca bitki ekstaraktını seyreltmek amacıyla kullanıldı (4 e 1 oranında).

2.1.1.14 Lamların Temizliği

Kültür süresi bitmesinden 2 gün öncesinde lamlar etiketlenerek şale içerisine dikkatlice dizildi. Üzerilerini tamamen kaplayacak şekilde 1N nitrik asit konuldu. Şalenin ağzı kapatıldı ve 1 gün bekletildi. Süre bitince lamlar 30 dk çeşme suyunda yıkandı. Lamlar 4-5 defa ise distile olan sudan geçirildi. Şale içerisi distile su ile doldurularak buzdolabında muhafaza edildi.

2.1.2 Kullanılan Laboratuvar Aletleri

2.1.2.1 Hassas Terazı

Fiziki çevresel etkilere karşı kabinli koruma özelliğinde ve 0, 0001 g hassasiyetinde olan Precisa XB 220 A (Swiss) marka hassas terazisi kimyasal maddelerin tartılması amacıyla tercih edildi.

2.1.2.2 Santrifüj

Bu çalışmada deneydeki tüplerin içinde ayrıştırma basamaklarını gerçekleştirmek amacıyla 5000 rpm'e kadar devri olan, 8 tüp kapasiteli ayrıca zaman ayarlı Hettich EBA 20 (Almanya) marka santrifugatör kullanıldı.

2.1.2.3 Mikroskop

İmmersiyon objektifli ve koordinat cetveli Olympus CX21 ve Leica DM500 marka binoküler ışık mikroskobu preparatlarda görüntülemeyi gerçekleştirmek amacıyla tercih edildi.

2.1.2.4 Benmari

Benmari (Su banyosu, Termal) preparatların boyanması yapılırken nem miktarını istenilen düzeylerde tutmayı sağlamak için tercih edildi.

2.1.2.5 Vorteks

Yellowline marka vorteks, deneyde kullanılan tüplerin içerisindeki karışımları homojenize etmek amacıyla tercih edildi.

2.1.2.6 pH Metre

Selecta marka pH metre, sıvı karışımların pH'sını ölçmek için tercih edildi.

2.1.2.7 Etüv

Elektro.mag marka (M 420 BP İnkübatör) 0-100°C'ye ayarlanabilen etüv, bazı solüsyonların 37°C'ye ısıtılıp tutulması ve deneyde hücrelerin kültüre edilmesi amacıyla tercih edildi.

2.2 Metot

2.2.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Speit ve Haupter (1985)'in kromozomu oluşturan kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation=SCD) göstermek amacıyla geliştirdikleri metot değişikliğe uğratarak kullanılmıştır [80]. Herhangi bir sağlık sorunu bulunmayan ve sigara kullanmayan 19-25 yaş aralığında olan 6 erkek ve 6 kadından elde edilen periferik kan örnekleri heparin içeren enjektörlerin sayesinde alındı. Kan alınmadan önce kromozom medyum steril olan kültür tüplerine 5ml olacak şekilde paylaştırıldı. Her kromozom medyum için kan örneklerinden steril koşullarda 12-14 damlanın (yaklaşık 0.4 mL) sızdırılmasına dikkat edecek şekilde tüplere eklendi. Önceden steril şartlarda hazırlanmış olan BrdU çözeltisinden her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde (hazırlanan BrdU solüsyonundan 100 µl) yine steril şartlarda ve ilave edilerek iyice karıştırıldı (50 µg BrdU/100 µl besi yeri). Ekimi yapılan kromozom medyumları etüve 37±1°C'de 72 saat süreyle hücrelerin çoğalmasını sağlamak amacıyla konuldu. Kültür süresinin bitimine 24 saat kala (48.saatte) *R. idaeus* bitki ekstraktının farklı dozlarının insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür tüplerine eklendi. (Test maddesi olarak kullanılan *R. idaeus* bitkisinin dozları; 0.2 µL /mL *R. idaeus* ekstraktı, 0.4 µL /mL *R. idaeus* ekstraktı, 0.8 µL /mL *R. idaeus* ekstraktı, 1.6 µL /mL *R. idaeus* ekstraktı). Pozitif kontrol olarak kullanılan MMC (Mitomisin-C) distile suda çözdürüldü. MMC'nin kromozomlara olan etkisini gözlemlemek amacıyla kültür süresinin bitmesine 24 saat kaldığı zaman 0.3 µg/ml MMC kültür tüplerine eklendi. Aseton (C₃H₆O) test kontrolü olarak, saf su (%1) ise negatif kontrol olarak kullanıldı [81]. 70. saate ulaşan kültüre, hazırlanan kolşisin çözeltisinden tüplere ilave edildi (0.06 µg/ml) ve iyice karıştırmak amacı ile tüpler yavaş bir şekilde sallandı. 37±1°C'de 2 saat süresince hücreler kolşisin ile muamele edildi. Kültür süresinin bitiminde tüpler 10 dk 2000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen kültür tüplerinin üzerindeki süpernatantı atıldı. Tüpün dibinde kalan 0.6-0.8 ml'lik sıvı iyice karıştırıldı. Etüvde 37±1°C'de bekletilen hipotonik çözelti tüplere eklendi. Hücrelerde kümeleşme olmasını önlemek için çözelti tüplere karıştırılarak ve damla damla her tüpe 5 ml ilave edilerek ağızları kapalı şekilde etüve konuldu. Hipotonik çözelti eklenen tüpler 37±1°C'de 30 dk

etüvde bekletildi. Sürenin bitiminde 10 dk 2000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Her tüpe 5 ml olarak soğuk fiksatif yavaş bir şekilde karıştırılarak ilave edildi. 2000 rpm'de 10 dk boyunca hücreler santrifüj edildi. Üstteki süpernatant kısım atıldı. Bu işlemin 3 kez tekrarlanması ile tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Santrifüj işleminin bitiminde tüpün altında 0.6-0.8 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant kısmı atılarak kalan sıvı ile preparatlar hazırlandı. Pasteur pipeti ile tüpün alt kısmında biriken hücreler karıştırılarak daha homojenize bir hale getirildi. Pasteur pipetine 3-4 damla homojen olan bu sıvıdan çekildi. Önceden temizliği yapılmış olan lamların üzerine pasteur pipetinden 1'er damla 50 cm yükseklikten farklı alanlara damlatıldı (her lama 3-4 damla). Hücrelerin içinde bulunduğu sıvının lam üzerine damlatılması anında damlaların üst üste gelmemesine itina gösterildi. Hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lamlar üzerinde yayılmaları sağlandı. Kurumak üzere preparatlar oda ısısında 24 saat süreyle bekletildi.

2.2.2 Preparatların Boyanması

Speit ve Haupter (1985)'in kromozomu oluşturan kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation=SCD) göstermek amacıyla geliştirdikleri metot değişikliğe uğratarak kullanılmıştır [80]. Kurutulan preparatlar ışınlama kabına yerleştirilerek üstü ince bir örtü gibi kapatılacak biçimde Sorenson tamponu ile kapatıldı. 5 ml tampon A ve 5 ml tampon B'den alınarak karışım saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Işınlama çözeltisi hazır hale geldi (pH=6.80). Kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını ışınlama çözeltisinin azlığı veya fazlalığının etkili bir oranda etkilediği görüldü. Bu yüzden ince bir örtü halinde preparatların üzeri ışınlama çözeltisi ile kaplandı. Hazırlanan preparatlar, 30 W'luk 254 nm dalga boyunda olan ve ışık yayabilen karanlıkta 15 cm yükseklikten tek ultraviyole lamba ile 30 dk ışınıldı. Işınlanma sonunda preparatlar 1xSSC eriyi içerisinde 58-60°C arasında olan sıcaklıklarda 60 dk etüvde inkübasyon yapıldı. % 5'lik Giemsa boya çözeltisi inkübasyon süresi tamamlanmadan 15 dk önce, 5 ml Giemsa, 5 ml tampon A ve 5 ml tampon B'nin karıştırılarak üzeri 85 ml saf su ile tamamlandı (pH=6.80). Hazırlanan boya filtre kağıdından şale içerisine doğru olacak şekilde süzüldü. İnkübasyon süresi tamamlandığında 1xSSC solüsyonundaki preparatlar alındı. Giemsa boya çözeltisi

içerisine konuldu ve 20 dk bekletildi. Süre bitiminde boya içerisinden çıkarılan preparatlar üç ayrı kaba konulan saf sudan geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatların kalıcı hale gelmesi amacıyla entellan ile kapatıldı. Entellanın kuruması ile birlikte preparatlar mikroskop altında incelendi.

2.2.3 Mikroskobik İnceleme

Kalıcı olarak hazırlanan preparatlar immersiyon objektifi ile Olympus marka binoküler ışık mikroskobunda incelendi ve resimler çekildi (10x100=1000 büyütmede).

2.2.4 KKD Sayısının Saptanması

Kan kültürüne ait iyi dağılmış preparatlardan, bir kromozomdaki açık olarak boyanan kromatidindeki koyu olarak boyanan parçaların yada koyu şekilde boyanan kromatidindeki açık olarak boyanan parçaların sayılması ile ikinci mitozu geçiren 100 metafazda KKD sayısı belirlendi [82]. Kromozom kollarının uç kısmında değişim olmuş ise bir KKD olarak ve eğer kromozom kollarının orta kısmında değişim olmuş ise iki KKD olarak sayıldı.

2.2.5 Replikasyon İndeksinin (RI) Saptanması

R. idaeus bitkisinin ekstraktının DNA replikasyonundaki olası etkilerini göstermek amacıyla RI hesaplandı. Bu hesaplamalar için rastgele seçilen 100 tane hücre incelendi. Yapılan bu incelemelerde görülen 1. 2. ve 3. metafaz evresindeki hücreler sayılarak RI aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$RI = (1 \times M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3) / 100$$

M_1 : 1. Mitozdaki hücre sayısı

M_2 : 2. Mitozdaki hücre sayısı

M_3 : 3. Mitozdaki hücre sayısı

BrdU'lu ortamda bulunan hücrelerin kromozomlarını oluşturan kromatidlerin her ikisi, birinci mitoz sonucu oluşan yavru hücrelerde koyu renkte boyanır. İkinci mitoz sonucu oluşan yavru hücrelerde kromatidlerin biri koyu diğeri açık boyanır. Üçüncü mitoz sonucu oluşan hücrelerde ise hücrelerin bir kısmında kromatidlerin biri açık, diğeri koyu renkte boyanırken, diğeri bir kısmında ise kromatidlerin ikisi de açık boyanmaktadır. Bu boyanma şekliyle hücrelerin kaçınıcı mitozda olduğu anlaşılabilir. Metafaz esnasında bulunan 100 hücre incelenerek kaçınıcı mitoz evresinde oldukları belirlenmiştir. Bu sonuca göre replikasyon indeksi (RI) formülle hesaplandı.

2.2.6 İstatistiksel Analizler

Çalışma sonucunda ulaşılan verilerin istatistiksel olarak hesaplanmaları bilgisayar ortamı içerisinde yer alan paket program (GraphPad InStat V 3.05) vasıtasıyla yapıldı. Gruplar arasında farklılıkların tespit edilmesi amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden olan Dunnett ve Tukey testler tercih edildi. Doza bağılı oluşmuş etkilerin arasında ki ilişkilerin belirlenmesi amacıyla verilerin regresyon ve korelasyon analizleri yapıldı.

3. BULGULAR

3.1 *R. idaeus* Ekstraktının Farklı 4 Dozunun MMC'ye Karşı İnsan Periferal Lenfosit Kültüründe Antimutajenik Etkileri

R. idaeus ekstraktlarının 0.2 µl/ml, 0.4 µl/ml, 0.8 µl/ml ve 1.6 µl/ml dozları ile 1 gün (24 saat) boyunca muamelesi yapılan insan periferal lenfositlerinde belirlenen ortalama kardeş kromatid sayıları (KKD) tablo 3.1. de görülmektedir. Her iki kontrolle karşılaştırıldığı zaman, sayılan 100 hücrede, *R. idaeus* ekstraktlarının insan lenfositlerinde KKD sayısını MMC'nin yaptığı artışı belirli kademelerde azalttığı görüldü. *R. idaeus* ekstraktlarının dozu ve KKD arasında ($r=-0.02$) negatif korelasyon bulundu.

Tablo 3.1 *R. idaeus* ekstraktının farklı 4 dozunun MMC'ye karşı insan periferal lenfosit kültüründe antimutajenik etkileri

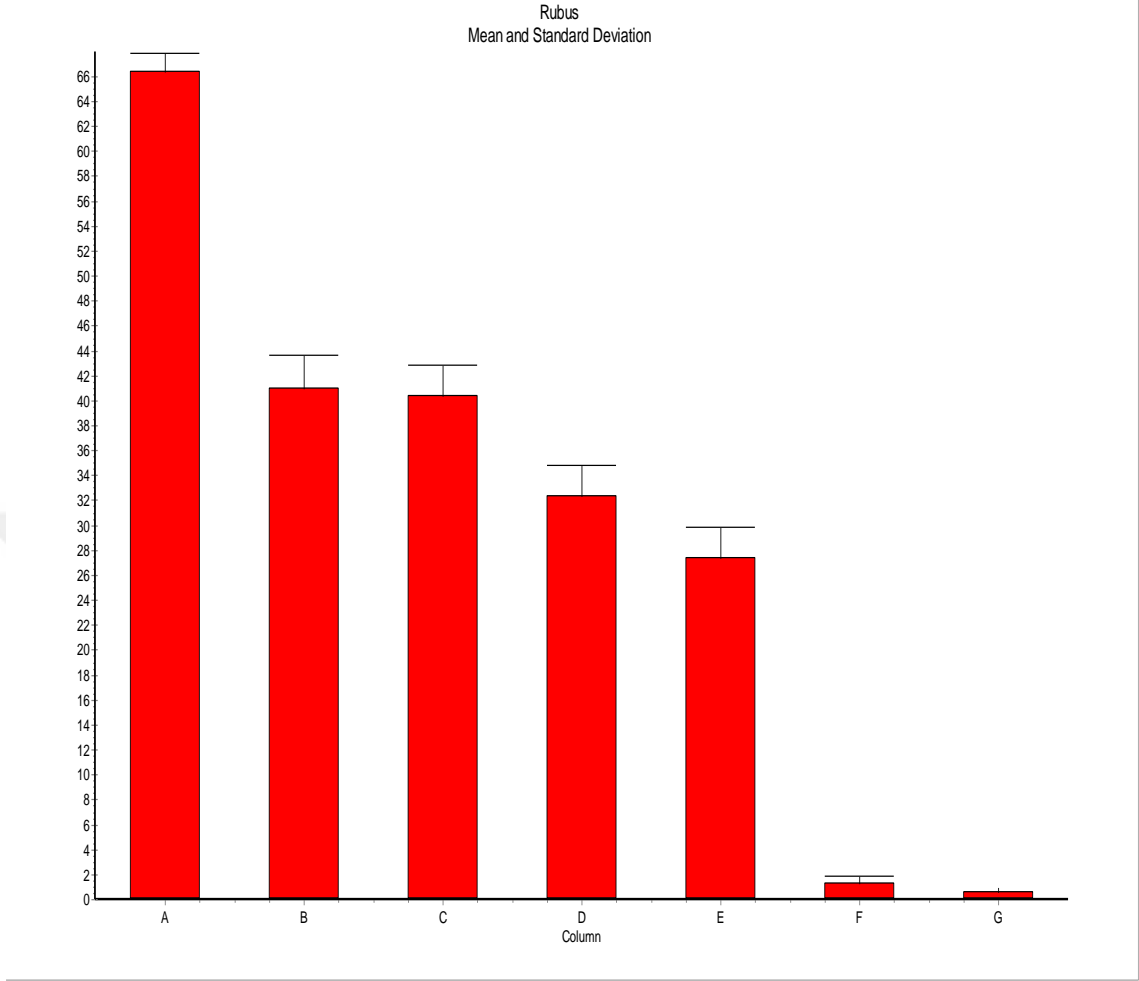
Gruplar	Konsantrasyon (µl/ml)	Muamele süresi (saat)	Toplam Hücre	KKD sayısı	±SEM (%)
Pozitif Kontrol (MMC)	0.3 µg/ml	24	100	66	±0.88
<i>R.idaeus</i> Ekstraktı+ MMC	0.2 µl/ml	24	100	40*	±1.52
	0.4 µl/ml	24	100	38*	±1.45
	0.8 µl/ml	24	100	30*	±1.47
	1.6 µl/ml	24	100	25*	±1.44
Negatif Kontrol	-	24	100	0.3	±0.33
Aseton	2.5 µl/ml	24	100	1	±0.21

KKD: Kardeş Kromatid Değişimi. MMC: Mitomisin-C, ±SEM: Ortalamanın standart hatası

Dunnett T testi ile karşılaştırıldı.

Negatif kontrolle çözücü kontrol arasında fark yok ($p>0.05$).

*Kontrol ve solvent kontrole göre önemli ($p<0.01$).



Şekil 3.1 *R.idaeus* ekstraktının farklı 4 dozu ile 1 gün boyunca muamelesi yapılan insan periferik lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı (A: Pozitif Kontrol, B: MMC+*R.idaeus* (0.2 µl/ml), C: MMC+*R.idaeus* (0.4 µl/ml), D: MMC+*R.idaeus* (0.8 µl/ml), E: MMC+*R.idaeus* (1.6 µl/ml), F: Aseton (2.5 µl/ml), G: Negatif Kontrol).

3.2 *R. idaeus* Ekstraktı Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi (%)

Tablo 3.2 *R.idaeus* ekstraktı gruplarının insan lenfosit hücrelerinde replikasyon indeksi (%)

Gruplar	Konsantrasyon (µl/ml)	Muamele Süresi (saat)	Toplam Hücre	M1	M2	M3	RI	±SEM (%)
Pozitif Kontrol	0.3 µg/ml	24	100	45	28	27	1.82	±0.06
Negatif Kontrol	-	24	100	20	32	48	2.28	±0.02
Aseton	2.5 µl/ml	24	100	18	30	52	2.34	±0.07
<i>R.idaeus</i> Ekstraktı+ MMC	0.2 µl/ml	24	100	36	34	30	1.94*	±0.03
	0.4 µl/ml	24	100	37	30	33	1.96*	±0.02
	0.8 µl/ml	24	100	28	35	37	2.09*	±1.12
	1.6 µl/ml	24	100	27	33	40	2,13*	±0.97

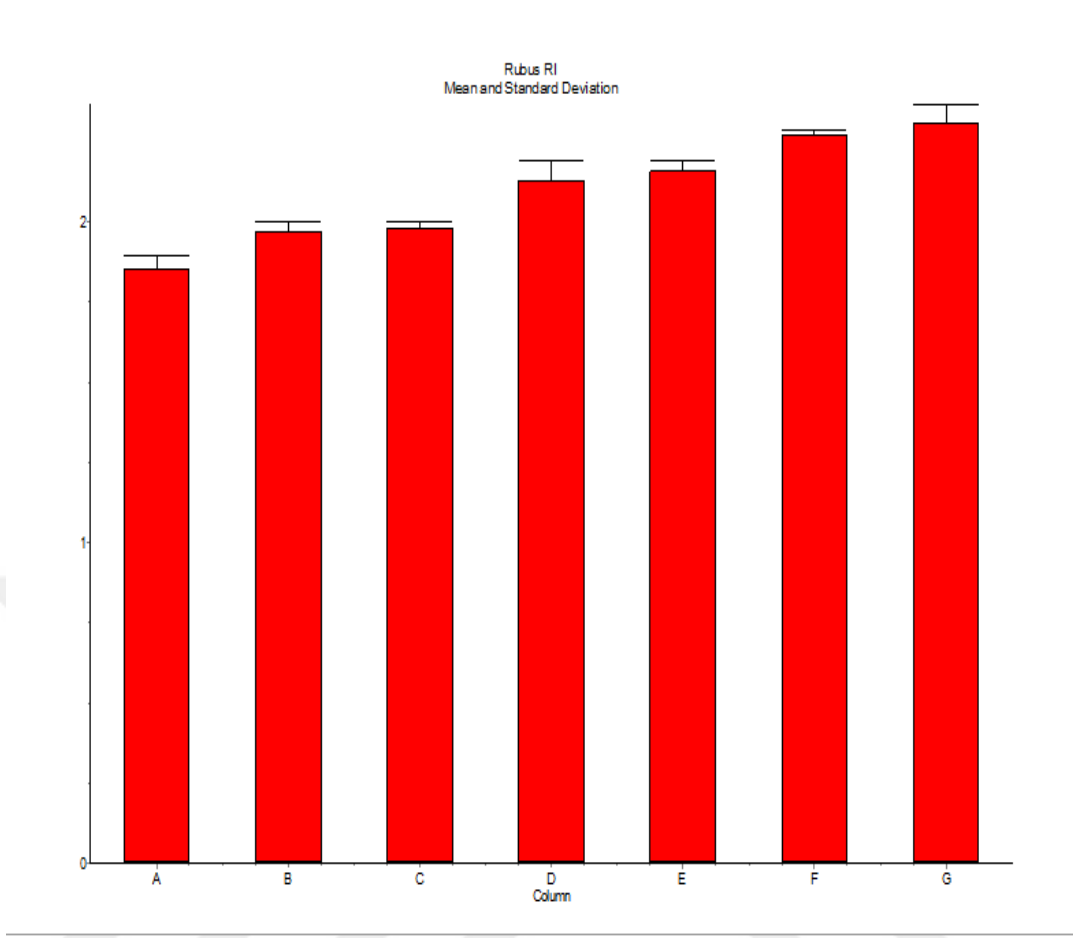
RI: Replikasyon İndeksi, M1: Mitoz 1, M2: Mitoz 2, M3: Mitoz 3, MMC: Mitomisin-C,

±SEM: Ortalamanın standart hatası

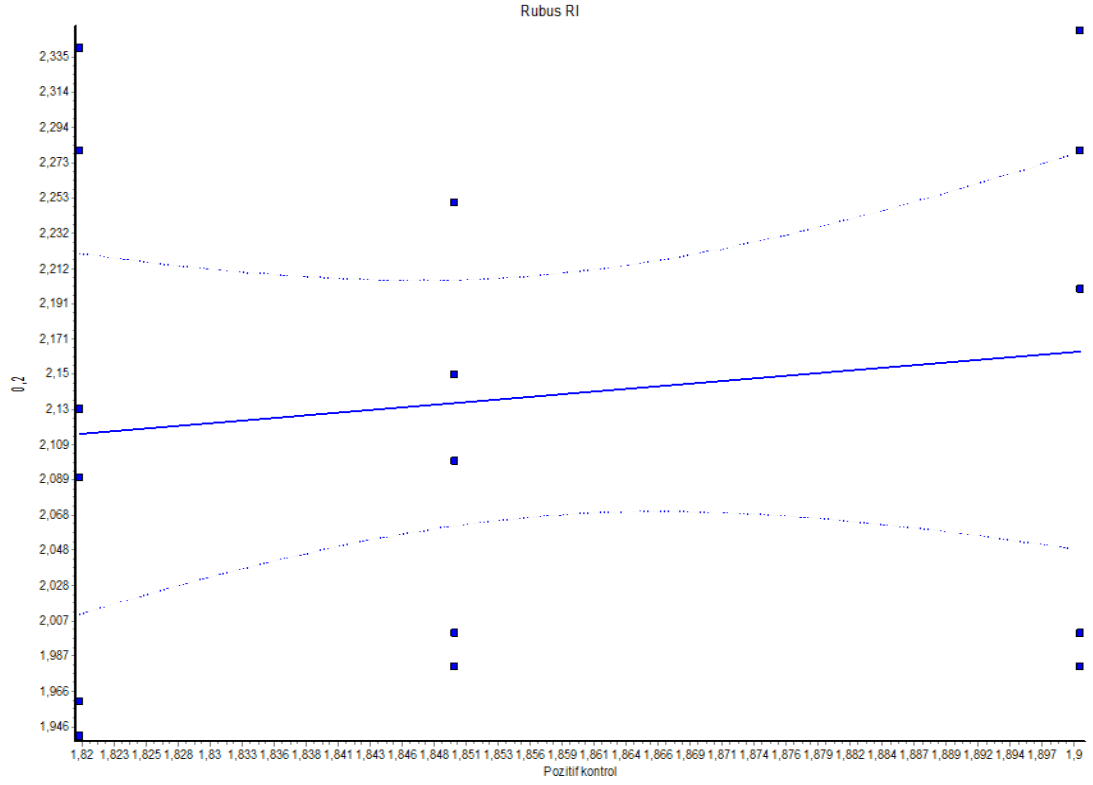
Dunnett T testi ile karşılaştırıldı.

Negatif kontrolle çözücü kontrol arasında fark yok ($p > 0.05$).

*Kontrol ve solvent kontrole göre önemli ($p < 0.01$).

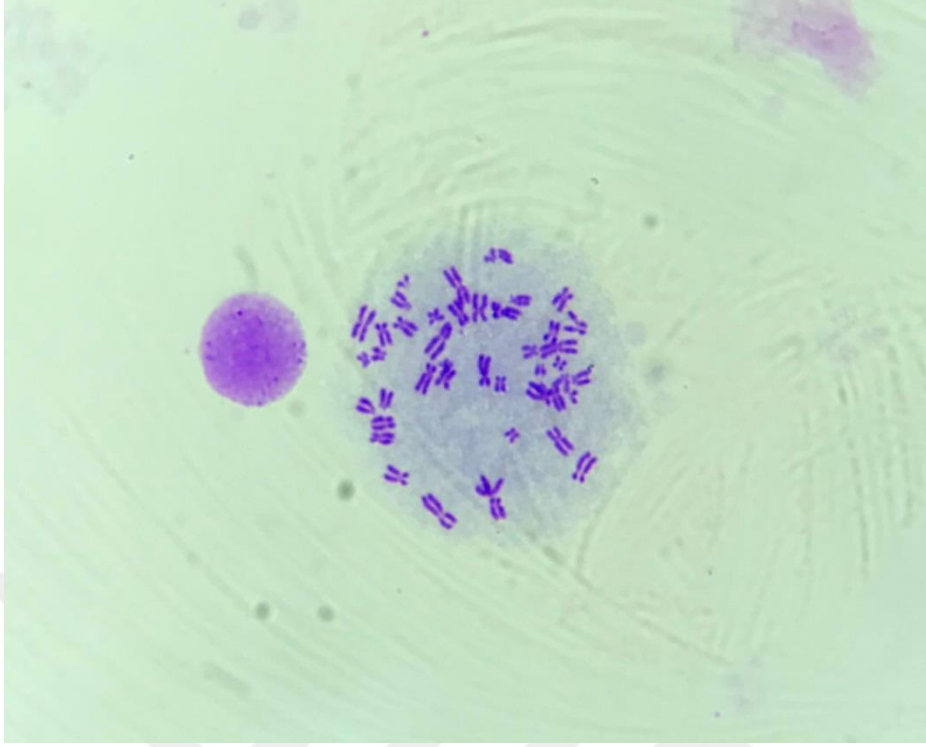


Şekil 3.2 *R. idaeus* ekstraktının farklı 4 doz ile 1 gün boyunca muamelesi yapılan insan periferel lenfositlerinde ortalama replikasyon indeksi (A: Pozitif Kontrol, B: MMC+*R. idaeus* (0.2 µl/ml), C: MMC+*R. idaeus* (0.4 µl/ml), D: MMC+*R. idaeus* (0.8 µl/ml), E: MMC+*R. idaeus* (1.6 µl/ml), F: Aseton (2.5 µl/ml), G: Negatif Kontrol).

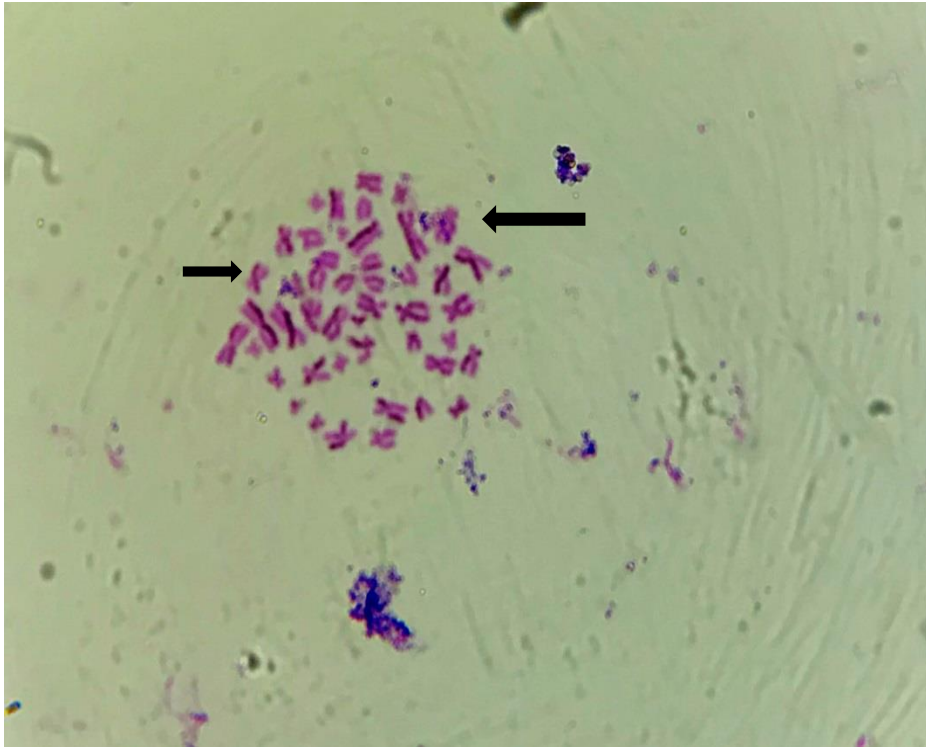


Şekil 3.3 *R.idaeus* için doz ve replikasyon indeksi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r= 0.14$).

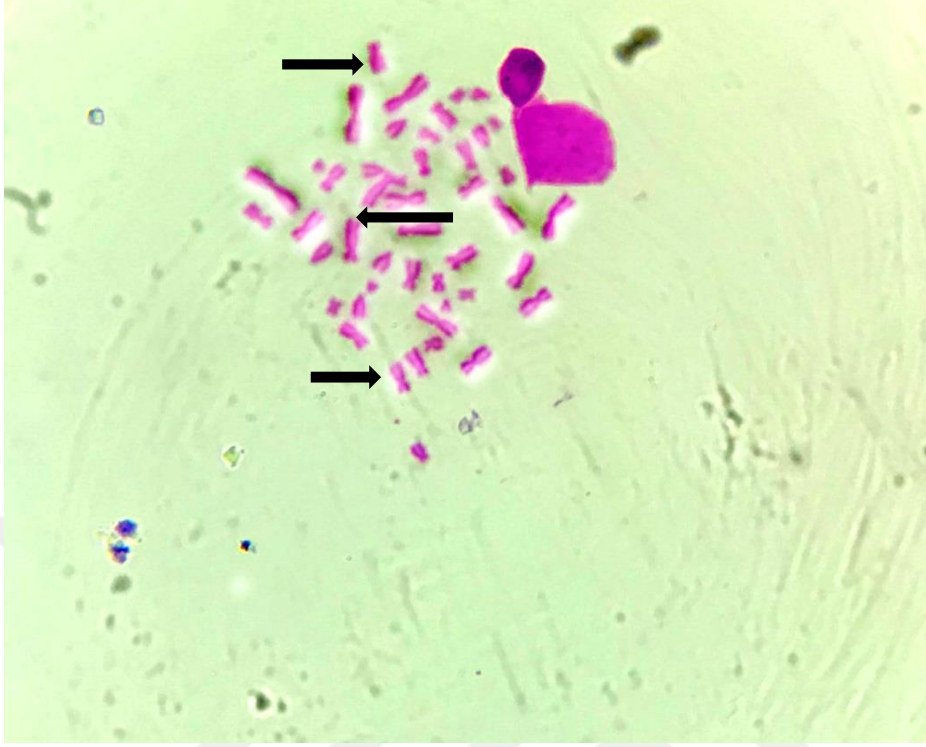
Replikasyon indeksi pozitif kontrolde 1.82 idi, negatif kontrolde ise 2.28 düzeyineydi. *R. idaeus* 'un farklı dozlarının doza bağlı şekilde MMC'nin hücre bölünmesini baskılayıcı etkisini düzelttiği belirlendi. *R.idaeus* için doz ve replikasyon indeksi arasında pozitif korelasyon bulundu ($r= 0.14$).



Resim 3.1 M1 evresindeki metafaz görüntüsü (X1000)



Resim 3.2 M2 evresindeki metafaz görüntüsü (X1000)



Resim 3.3 M3 evresindeki metafaz görüntüsü (X1000)

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Rubus cinsine ait bitkilerin genotoksik yada mutajenik potansiyelini incelemek için yapılan çalışmalar ile alakalı literatür taramalarında kısıtlı sayıda bilgiye ulaşılmaktadır. *R. idaeus* bitkisinin kişi sağlığına olan etkileri ilerleyen yıllarda oldukça önem kazanmaya başlamıştır.

Nowak ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *R. idaeus* bitkisinden elde edilmiş olan elajik asitler, doz aralığı 2.5 ve 160 µg/mL' de değişiklik gösteren Caco-2 adenokarsinom yapısındaki bağırsak kanserinin hücrelerindeki hatlarında dozlarına bağımlı olarak baskılayıcı nitelikte olmaktadır. Yine aynı çalışmasının sonucunda, pozitif olan kontrollerin gruplarına karşılık hücre bölünmelerini engelleyici ve programlı hücre ölümünü uyarıcı özellikleride belirtilmektedir. *R. idaeus* bitkisinin elajik asit içermesinden dolayı gıda maddesi olarak kullanılan besinlerin insan sağlığına olan yararlı özelliklerini artırmak amacıyla doğal bir gıda maddesi olarak kullanılması tavsiye edilmektedir [83].

Yapılan bir çalışmada, genetik toksisite yöntemleri içerisinde yer alan; KKD, kromozom aberasyonu ve mikroçekirdek yöntemleri ile Miyelodisplastik sendrom (MDS) olgularında genomik instabilitenin neden olduğu olayları belirlemek ve bu test yöntemlerinin arasında ki ilişkiyi incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada; MDS' lu olgulardaki KKD ve MN sıklığında ki anlamlı artışın olması, genomik instabilite için kullanılan yöntemlerin informatif bir biyolojik gösterge görevi gördüğü belirtilmektedir [84].

Başka bir çalışmada ise, *R. coriifolius* etanol özütü tarafından başlatılan genotoksik ve sitotoksik etkiler bir farenin kemik iliği hücrelerinde yapılan mikroçekirdek (MN) testi vasıtasıyla *in-vivo*; insan akyuvar kültüründe MN ve kardeş kromatid değişimi testleri aracılığıyla ise *in-vitro* olarak değerlendirilmiştir. *In-vivo* genotoksite analizleri bütün dozlarda mikroçekirdekli polikromatik alyuvarların ortalama sayısı ve polikromatik alyuvar hücrelerinin oranının negatif kontroldakilerden önemli bir ölçüde farklı olmadığını açığa çıkarmıştır. *In-vitro* genotoksikite analizleri, bir insan lenfosit hücre kültüründeki MN, KKD ve proliferatif indeks frekanslarının negatif kontroldakilerden önemli bir düzeyde farklı olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar, *R. coriifolius* aerial parçalarının etanol özütünün toksik veya mutajenik olmadığını (*in-vivo* ve *in-vitro*) ve

analiz edilen konsantrasyonlarda hücre profilersyonunu etkilemediğini göstermiştir [85].

Kaya' nın yapmış olduğu çalışmada, *R. idaeus* ekstraktının insan periferal lenfosit hücrelerinde, mutajen olduğu bilinen MMC kimyasalının verilen gruba göre kromozomal aberasyon oranların, mikronükleus indeksin, apoptoptik ve nekrotik hücrelerin sayılarını azalttığı sonucuna ulaşılmıştır [53].

R. idaeus bitkisinin ekstraktları programlı hücre ölümünü baskılayarak, tümörlü hücrelerin hacminin veya tümörlü hücre çoğalmasının azaltılmasında önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir. *R. idaeus* bitkisinin faydalı bu etkisini, muhteviyatındaki biyoaktif bileşenin hücrel olarak antioksidan özellikleri içermesinden kaynaklanması muhtemeldir. *R. idaeus* bitki meyve ekstraktı, insan laringeal karsinom hücreleri ve L20B kanser hücre dizilerinde toksik etkiler gösterdiğinden dolayı kansere karşı kullanılan ilaç potansiyelinde dikkatleri çeken özellikte olmaktadır [86].

İpek ve arkadaşlarının, Mitomisin-C'nin varlığında ve insan lenfosit hücrelerinde yaptığı bir çalışmada ise, karvakrolun bütün dozlarında KKD' nin oluşumunu artırmadığını ayrıca MMC' nin sebep olduğu KKD oranlarını inhibe ettiği ifade edilmektedir [87].

Yapılan *in-vitro* çalışmamız doğrultusunda *R. idaeus* (kırmızı ahududu) genotoksik ve antimutajenik etkilerini KKD testi ile gösterdik. Çalışma sonucunda, Kırmızı ahududu bitki ekstraktlarının insan lenfosit kültüründe, 4 farklı dozunun (0.2 µl/ml, 0.4 µl/ml, 0.8 µl/ml, 1.6 µl/ml) 24 saat uygulanması ile aşağıdaki verilere ulaşılmıştır;

- 1) *R. idaeus* ekstraktlarının insan lenfositlerinde KKD sayısını MMC'nin yaptığı artışı belirli kademelerde azalttığı görüldü.
- 2) *R. idaeus* ekstraktlarının dozu ve KKD arasında ($r=- 0.02$) negatif korelasyon bulundu.
- 3) *R. idaeus* için doz ve replikasyon indeksi arasında pozitif korelasyon bulundu ($r= 0.14$).

Yukarıdaki açıklanan bulguların, *R. idaeus* bitkisinin kardeş kromatid değişimi açısından antimutajenik etkilerinin saptandığı ulaşılan sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir [83]. *In-vitro* olarak yaptığımız bu çalışma *R. idaeus* ekstraktlarının tam anlamıyla etkilerini açıklayamayabilir bu sebeple *in-vivo* çalışmaların yapılmasının da faydalı olacağı önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Şimşek, M., Gülsoy, E., (2017). Güneydoğu Anadolu Bölgesinin Nar (*Punica granatum L.*) Potansiyeli Konusunda Bir Araştırma. *Iğdır Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Iğdır, 7(2): 31-41.*
- [2] Stich H. F., Dunn B. P., (1986). Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. *International Journal of Cancer, 38: 713-717.*
- [3] Stumpf, M., Temes, T. A., Wilken, R. D., Roodrigues, S. U. and Baumann, W., (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro. Brazil, *The Science of the Total Environment, 225: 135-41.*
- [4] Emre S., (1989). Antikanser ilaçların ve karsinojen maddelerinin insan kromozomları üzerine etkilerinin *in-vitro* sistemde kardeş kromatid değişimi (sister chromatid exchange, SCE) analiz yöntemi ile belirlenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- [5] IARC, (1980). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Suppl.2, long term and short term screening assays for carcinogens: A critical appraisal. IARC Monographs Supplement 2. IARC Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- [6] Başaran, A. A., (2004). Farmakognozide Tek Hücre Jel Elektroforezi Uygulamaları. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kırimer, ISBN 975-94077-2-8.
- [7] Saygı, Ş., (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi, 45(3), 291-298.*
- [8] Wang, S. Y., Bowman, L. and Ding, M., (2008). Methyl Jasmonate Enhances Antioxidant Activity and Flavonoid Content in Blackberries (*Rubus sp.*) and

Promotes Antiproliferation of Human Cancer Cells. Food Chemistry, 107(3), 1261-1269.

- [9] Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutiene, I., Stackevicene, E., Nikolajevs, L. and Janulis, V., (2008). Comparative Study of Anthocyanin Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activity in Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. Acta Poloniae Pharmaceutica, 66(4), 399-408.
- [10] He, J., Giusti, M. M., (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. Annual Review of Food Science and Technology, 1, 163-187.
- [11] Krauze-Baranowska, M., Majdan, M., Hałasa, R., Głód, D., Kula, M., Fecka, I. and Orzeł, A., (2014). The Antimicrobial Activity of Fruits from Some Cultivar Varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. Food & Function, 5(10), 2536-2541.
- [12] Agaoglu, Y. S., (1986). Üzümsü Meyveler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 984, Ders Kitabı: 290, Ankara, 377.
- [13] Agaoglu, Y. S., (2007). Türkiye’de Üzümsü Meyvelerin Bugünkü Durumu ve Geleceği II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu. 14-16 Eylül 2006, Tokat, Bildiriler: 1- 7.
- [14] Çağlar, M. Y., Demirci, M., (2018). Üzümsü Meyvelerde Bulunan Fenolik Bileşikler ve Beslenmedeki Önemi. European Journal of Science and Technology, 7(11), 18, 26.
- [15] Pehlivan, M., Gülerüz, M., (2004). Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. Bahçe Dergisi, 33(1-2), 51-57.
- [16] Nizamlioğlu, N. M., Sebahattin, N. A. S., (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. Electronic Journal of Food Technologies, 5(1), 20-35.

- [17] Åkerström, A. (2010). Factors Affecting the Anthocyanidin Concentration in Fruit of *Vaccinium myrtillus* L. Sveriges Lantbruksuniv, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, No. 52.
- [18] Eyduran, S., (2007). Ankara (ayaş) Koşullarında Bazı Ahududu Çeşitlerinin Tomurcuk Yapıları ve Floral Gelişme Devrelerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- [19] Jennings, D. L., (1988). Raspberries and blackberries; their breeding, diseases and growth. Academic Press, London, 230.
- [20] National Plant Data Center, (1996). NRCS, USDA. Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. Erişim Tarihi: 20.04.2020. <https://plants.sc.egov.usda.gov>.
- [21] <https://www.palmaverde.nl/en/rubus-idaeus-heritage-raspberry.html>, (28.11.2018).
- [22] <https://www.henriettes-herb.com/eclectic/kings/rubus-idaea.html>, (20.04.2020).
- [23] Hummer, K. E., (2010). *Rubus* Pharmacology: Antiquity to the Present. Horticultural Science, 45(11), 1587-1591.
- [24] Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y. and Nair, M. G., (2010). Anthocyanin Content, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anticancer Properties of Blackberry and Raspberry Fruits. Journal of Food Composition and Analysis, 23, 554-560.
- [25] Araujo, P. R. F., Santos, V. S., Machado, A. R., Fernandes, C. G., Silva, J. A. and Rodrigues, R. S., (2011). Benefits of Blackberry Nectar (*Rubus* spp.) Relative to Hypercholesterolemia and Lipid Peroxidation. Nutricion Hospitalaria, 26(5), 984-990.

- [26] Beckett, A. H., Belthle, F. W., Fell, K. R. and Lockett, M. F., (1954). The Active Constituents of Raspberry Leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6,785-796.
- [27] Caspersson, T., Zech, L. and Johansson, C., (1970). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental Cell Research* 60: 315–319.
- [28] <https://www.canlibilimi.com/mitoz-ve-mitozun-asamalari-nelerdir>, (09.03.2020).
- [29] Ford, C.E., Hamerton, J.L., (1956). The chromosomes of man. *Nature* 178: 1020-1023.
- [30] Miller, O.J., Therman, E., (2001). *Human chromosomes*. 4th ed. Springer, New York.
- [31] Brown, S.W., (1966). Heterochromatin. *Science* 151: 417–425.
- [32] Grewal, S., Moazed, D., (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301:798–802.
- [33] Passarge, E., (2007). *Color Atlas of Genetics*. 3rd edition, Thieme.
- [34] Tjio, J.H., Levan A., (1956). The chromosome number of man. *Hereditas* 42:1-6.
- [35] Schueler MG et al., (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294: 109–115.
- [36] De Vries BBA et al., (2003). Telomeres: a diagnosis at the end of chromosomes. *Journal of Medical Genetics*, 40: 385–398.
- [37] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, SL., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, JE., (2000). *Molecular Cell Biology*. 4 edition, WH Freeman and Co, New York.

- [38] Vermeulen, K., Berneman, ZN. And van Bockstaele, DR., (2003). Cell cycle and apoptosis. Cell Prolif; 36: 165-75.
- [39] Öndağ Cabadak, H., (1987). İnsan periferel kan ve fibroblast hücre kültürlerinin Sinkronizasyonu ve sinkronize hücre kültürlerinden kromozom analizi ve karyotip hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji, Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ankara.
- [40] Hartwell, L., Weinert, T., (1989). Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. Science, 246: 629–634.
- [41] Bellamy CO., (1996). p53 and apoptosis. British Medical Bulletin, 53(3): 522-38.
- [42] <https://www.biyologlar.com/hucre-dongusu-ve-polimorfizm>, (09.03.2020).
- [43] Campbell, N. A., Reece J. B. (2008). Biyoloji (Çeviri Editörleri: Gündüz, E., Demirsoy A., Türkan İ.). Ankara: Palme Yayıncılık.
- [44] Raven, P. H., Johnson, G. B. (1996). Biology. Boston: McGraw Hill Companies,
- [45] Russel, P. J. (2006). Genetics: A Molecular Approach. San Francisco: Pearson Education.
- [46] <https://tr.wikipedia.org/wiki/Krossover>, (06.04.2020).
- [47] Choy, W. N., (2001). Genetic toxicology and Cancer Risk Assessment. Marcel Dekker Inc. (Choy, W.N., Ed.), 390 p., New York, USA.
- [48] Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B. ve Alvur, M., (2004). DNA Hasarı Analizinde μ -Fadu ve Comet Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2 (3), 97-103

- [49] Zeiger, E., (2004). History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, And sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 363-371.
- [50] Üstün, F., (2007). Albendazol'un olası genotoksisitesi üzerine askorbik asitin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 100.
- [51] Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., (2011). Genetik toksisite testleri. TÜBAV Bilim Dergisi 4 (3): 221-229.
- [52] Kramer, P.J., (1998). Genetic Toxicology. *J. Pharm Pharmacol* 50: 395-405.
- [53] Mavioğlu Kaya, M., (2018). Yaban Mersini (*Vaccinium myrtillus* L.) ve ahududu (*Rubus idaeus* L.) Bitkilerinden Elde Edilen Sıvı Ekstraktların İnsan lenfosit Kültüründe Mitomisin c'ye Karşı Kromozomlar ve Hücre Bölünme Mekanizması Üzerine Antimutajenik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Kafkas üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kars.
- [54] Choy, W. N., (2001). Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker, New York, 29-187.
- [55] Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I. and Kirsch-Volder, M., (2006). Chromosomal Changes : induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88: 1515-31.
- [56] Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., A McFee, A.F., Wolff, S. and Wassom, J.S., (1981). Mammalian *in-vivo* and *in-vitro* cytogenetic assays. A report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 87:143–88.
- [57] Brusick, D., (1987). Principles of genetic toxicology. Plenum Press, New York, 155-170.

- [58] Wassom, J., (1992). Origins of genetic toxicology and the environmental Mutagen Society. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 14: 1-6.
- [59] Kirkland, D.J., (1993). Genetic toxicology testing requirements: Official and unofficial Views from Europe. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 21 (1):8-14.
- [60] Hrelia, P., Vigagni, F., Maffei, F., Morotti, M., Colacci, A., Perocco, P., Grilli, S. and Cantelli-Forti, G., (1994). Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests. *Mutation Research*, 321 (4): 219-28.
- [61] Anderson, D., (1988). Human Biomonitoring. *Mutation Research*, 204: 353-541.
- [62] Carrano, A.V., Natarajan, A.T., (1988). Consideration for population monitoring, using cytogenetic techniques. *Mutation Research*, 204: 379-406.
- [63] Zeiger, E., (1998). Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: Premises, promises, and performance. *Regul Toxicol Pharmacol*, 28:85-95.
- [64] Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Suhaker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D. and Aitio, A., (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, 463: 11-172.
- [65] Jena, G.B., Kaul, C.L. and Ramarao, P., (2002). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian Journal of Pharmacology*, 34: 86-99.
- [66] Natarajan, A. T., Obe, G., (1982). Mutagenicity Testing With Cultured Mammalian Cells: Cytogenetic Assays. In: Heddle JA(ed) *Mutagenicity*. New Horizons in Genetic Toxicology. Academic Pres, New York, 1-213

- [67] Latt, S.A., Sehrek, R.R., Loveday, K.S., Dougherty, C.P. and Schuler, C.F., (1980) Sister Chromatid Exchange. The American Journal of Human Genetics, 10: 267-331.
- [68] Latt, S.A., Schreck, R.R., (1980). Sister Chromatid Exchange Analysis. The American Journal of Human Genetics, 32: 297-313.
- [69] Wolff, S., (1980). Sister Chromatid Exchange. Adv. Human Genetic, 10, 183-201.
- [70] Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M. and Takeda, S.,(1999). Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. Molecular and Cellular Biology, 19 (7), 5166-5169.
- [71] Wolff, S., (1977). Sister chromatid exchange. Annual Review of Genetics, 11: 183-201.
- [72] Bayel, İ., (2006). Terbinafin'in İnsan Lenfosit Kültürlerindeki Etkilerinin Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange) Yöntemi İle *İn-Vitro* Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 61.
- [73] Taylor, J .H., Woods, P.S., Hughes, M.L., (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 43 (1): 122-128.
- [74] Perry, P., Wolff, S., (1974). New Giemsa Method For Differential Staining of Sister Chromatids. Nature, 261: 156-158.
- [75] Latt, SA., Schreck, R., Loveday, K. and Shuler, C., (1978). *İn-vitro* and *in-vivo* analysis of sister chromatid exchange. Pharmacological Reviews. 30(4): 501-535.

- [76] Rooney, DE., Czepulkowski, (1992). BH. Human Cytogenetic Constitutional Analysis Volume 1. Tawn EJ., Holdsworth D. Mutagen induced chromosomes damage in human lymphocytes. Oxford University Press, New York.
- [77] Natarajan, AT., (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. Mutation Research. 504: 3-16
- [78] Barch, JM., (1991). The act cytogenetic laboratory manual. Gustashow KM. Chromosome stains. Second edition. Raven Press, Ltd. 1185 avenue of the America, New York.
- [79] Topaktaş, M., Speit G., (1990). Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde kullanılması. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi., 5 (1, 2, 3), 73-84.
- [80] Speit, G., Haupter, S., (1985). On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. Human Genetics. 70, 126-129.
- [81] Yıldırım, H., (2014). Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş Kekığı (*Thymbra spicata*) Bitki uçucu yağlarının SCE (Kardeş Kromatid Değişimi) Üzerine Etkilerini İnsan Lenfosit Kromozomlarında İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kars.
- [82] Titenko-Holland, N., Ahlborn, T., Lowe, X., Shang, N., Smith, M.T. and Wyrobek, A. J., (1998). Micronüklei and developmental abnormalities in 4-day Mouse embryos after paternal treatment with acrylamide. Environmental and Molecular Mutagenesis. 31:206-217.

- [83] Nowak, A., Sójka, M., Klewicka, E., Lipińska, L., Klewicki, R. and Kołodziejczyk, K. (2017). Ellagitannins from *Rubus idaeus* L. Exert Geno- and Cytotoxic Effect against Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(14), 2947-2955.
- [84] Nazlıgül, E., (2009). Miyelodisplastik Sendromlu Olgularda Genomik İnstabilitenin Farklı Sitogenetik Yöntemlerle (Kromozom Aberasyonu, Kardeş Kromatid Değişimi, Mikronukleus) Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı/ Genetik Programı İstanbul.
- [85] González-Hernández, S., González-Ramírez, D., Dávila-Rodríguez, M.I., Jimenez Arellanez, A., Meckes-Fischer, M., Said-Fernández, S. and Cortés-Gutiérrez, E.I. (2016). Absence of toxicity and genotoxicity in an extract of *Rubus coriifolius*. *Genetics and Molecular Research* 15 (4), Mexico.
- [86] Assad, N. K., Dheeba, B. I., Mohammad, F. I. and Hamad, A., (2015). Anti-Cancer Activity of the *Rubus idaeus* Extracts Against HepG2 and L20B Cell Lines Using Tissue Culture Technique. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 7(2), 19 -23.
- [87] İpek, E., Tüylü, B. A. ve Zetinoğlu, H., (2003). Effects Of Carvacrol On Sister Chromatid Exchanges In Human Lymphocyte Cultures, *Cytotechnology*. 43,1-3:145-148.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevda MANKAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Susuz/05.01.1994
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (e-posta) : mankansevda@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Cumhuriyet Lisesi/2011
Lisans : Karadeniz Teknik Üniversitesi/2016
Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi/

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Milli Eğitim Bakanlığı/2017-2019

Yayınları (SCI ve diğer) : TUBİTAK/2015