



T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



KARABAŞ KEKİĞİ (*Thymbra spicata*) BİTKİ UÇUCU YAĞININ FARE KEMİK İLİĞİ HÜCRELERİNDE KROMOZOMLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Davut KİŞİOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE

ŞUBAT - 2018

KARS



T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



KARABAŞ KEKİĞİ (*Thymbra spicata*) BİTKİ UÇUCU YAĞININ FARE KEMİK İLİĞİ HÜCRELERİNDE KROMOZOMLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Davut KİŞİOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE

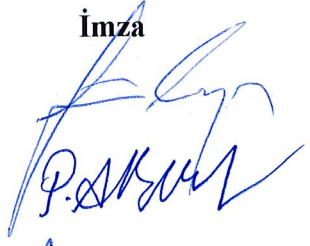


Bu tez çalışması 2014-FEF-10 nolu proje ile Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

ŞUBAT- 2018

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı öğrencisi Davut KİŞİOĞLU'nun Yrd.Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE danışmanlığında Yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “**Karabaş Kekliği (*Thymbra spicata*) Bitki Uçucu Yağının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Kromozomlar Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ...birliği..... ile kabul edilmiştir.

27 / 02 / 2018

	Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr. Süleyman GÜL	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hasan ASKER	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun . . / . . / 20. . gün ve / sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Fikret AKDENİZ

Enstitü Müdürü

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 kurallarçerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygunolarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynakgösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

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

Davut KİŞİOĞLU



27.02.2018

ÖZET

(Yüksek Lisans Tezi)

KARABAŞ KEKİĞİ (*Thymbra spicata*) BİTKİ UÇUCU YAĞININ FARE KEMİK İLİĞİ HÜCRELERİNDE KROMOZOMLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Davut KİŞİOĞLU

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE

Bu çalışma ile *T.spicata* bitki uçucu yağının fare kemik iliği hücrelerinde kromozomlar üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Oluşturulan üç deney grubundaki farelere 250 mg/kg, 500 mg/kg ve 1000 mg/kg karabaş kekiği (*T. spicata*) bitki uçucu yağı, kontrol grubundaki hayvanlara ise çeşme suyu vücut ağırlıklarına göre 24 saatte bir iki kez oral gavaj yolla verilmiştir. İstatistiksel analizler neticesinde kontrol grubuna göre karabaş kekiği bitki uçucu yağı uygulanan gruplarda mitotik indeksin doz artışıyla paralel olarak azaldığı tespit edilmiştir ($P<0.001$), ($r=-0,98$). Kontrol grubuyla farklı dozlarda karabaş kekiği bitki uçucu yağı uygulanan gruplar kıyaslandığında ise 500 mg/kg ve 1000 mg/kg karabaş kekiği uygulanan gruplardaki kromozomal aberasyon sayılarının arttığı tespit edilirken, yalnızca 1000 mg/kg uygulama yapılan gruptaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.001$), ($r=0,98$). Sonuç olarak *T.spicata* bitki uçucu yağının belirtilen dozlarda fare kemik iliği hücrelerinde in vivo klastojenik potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *T.spicata*, Kromozomal aberasyon, Mitotik indeks, Fare kemik iliği hücreleri

2018, 70 Sayfa

ABSTRACT

(Master Thesis)

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF KARABAS THYME (*Thymbra spicata*) ESSENTIAL OIL ON CHROMOSOMES OF MOUSE BONE MARROW CELLS

Davut KIŞIOĞLU

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assistant Prof. Pınar AKSU KILIÇLE

In this study, it was aimed to investigate the effects of *T. spicata* plant essential oil on chromosomes in mouse bone marrow cells. 250 mg / kg, 500 mg / kg and 1000 mg / kg of *T. spicata* plant essential oil were given to the mice of the three experimental groups and the animals in the control group were given oral gavage once or twice every 24 hours according to body weight. As a result of statistical analyzes, it was found that the mitotic index decreased in parallel with the dose increase in the group of the Karabaş thyme applied group when compared with the control group ($P < 0.001$), ($r = -0,98$). When the control group was compared with the groups to which thyme essential oil was applied at different doses, it was determined that the numbers of chromosomal aberrations in the 500 mg/kg and 1000 mg/kg thyme essential oil groups were increased, it was determined that only the increase in the 1000 mg/kg administration group was statistically significant ($P < 0.001$), ($r = 0,98$). The study results show that in vivo treatment of *T. spicata* plant essential oil is clastogenic in mouse bone marrow cells at the indicated doses.

Key words: *T. spicata*, Chromosomal aberration, Mitotic index, Mouse bone marrow cells

2018, 70 Pages

ÖNSÖZ

“Karabaş Kekik (Thymbra spicata) Bitki Uçucu Yağının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Kromozomlar Üzerine Etkilerinin İncelenmesi ” adlı bu çalışmada,

Tez konusunun seçiminde, tezin yürütülmesinde, gerekli laboratuvar olanaklarını sunan ve yardımlarını esirgemeyen Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE’ye, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Süleyman GÜL’e, Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Neslihan MUTLU’ya, Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Salih AKPINAR’a, Matematik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKAN AKPINAR’a, Biyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Yağmur YILDIZ ASKER’e, Uzman Biyolog Emin Serhat ÇAKMAKÇI’ya, çalışmama maddi destek sağlayan Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Başkanlığı’na ve eğitimimin her aşamasında maddi-manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Davut KİŞİOĞLU

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.1.1. Kekik Bitkisinin Genel Özellikleri.....	3
1.1.2. Karabaş Kekiği (<i>Thymbra spicata</i>).....	4
1.1.3. <i>T.spicata</i> Sistematığı.....	5
1.1.4. Kekik (<i>Thymus</i>) Bitkisinin Halk Arasında Kullanımı.....	6
1.1.5. Uçucu Yağların Genotoksik Etkileri.....	6
1.2. Genotoksisite.....	7
1.2.1. Kromozomlar.....	7
1.2.1.1. Kromozomlarda Oluşan Özel Bölgeler.....	9
1.2.1.2. Sentromer Bölgelerine Göre Kromozom Çeşitleri.....	10
1.2.2. Genotoksisite Testleri.....	12

1.2.2.1. Ames Testi	12
1.2.2.2. Comet Testi.....	13
1.2.2.3. Kardeş Kromotid Değişimi (KKD) Testi.....	14
1.2.2.4. Mikronükleus (MN) Testi.....	15
1.2.2.5. Kromozom Anomalileri (CA) Testi.....	16
1.2.3. Sayısal Kromozom Anomalileri	17
1.2.4.Yapısal Anomaliler	17
1.3. Bitki Ekstraktarı İle İlgili Genel Bilgiler.....	19
1.3.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenleri	20
1.3.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri.....	20
2. MATERYAL ve METOT	22
2.1. Hayvan Materyali	22
2.2. Çalışmada Kullanılan Bitki Uçucu Yağı	22
2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	22
2.4. Metot	25
2.4.1. Kromozomal İnceleme ve Mitotik İndeksin Tespiti.....	25
3. BULGULAR.....	28
3.1. Kontrol Grubu Farelerde Mitotik Aktivite Değerleri	29
3.2. Deney Grubu (250 mg/kg) Farelerde Mitotik Aktivite Değerleri	30
3.3. Deney Grubu (500 mg/kg) Farelerde Mitotik Aktivite Değerleri	31

3.4. Deney Grubu (1000 mg/kg) Farelerde Mitotik Aktivite Değerleri	32
3.5. Kontrol ve Deney Grubu <i>Mus musculus albino</i> Farelerin Kemik İliğinde Mitotik Aktivite Değerlerinin Karşılaştırılması	33
3.6. Kontrol ve Deney Grubu Farelerin Kemik İliğinde Kromozomal Aberasyon Sonuçları.....	36
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
5. KAYNAKLAR	47
6. ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kekik (<i>Thymus</i>) Bitkisinin Morfolojik Görüntüsü	4
Şekil 2. Karabaş (<i>T.spicata</i>) Kekiğinin Morfolojik Görüntüsü	5
Şekil 3. Kromozomun Işık Mikrokobu Görüntüsü	8
Şekil 4. DNA'nın Kromozomlara Dönüşmesi.	9
Şekil 5. Mitoz Esnasındaki Bir İnsan Kromozomunun Şematik Görünümü.	10
Şekil 6. Sentromerin Yerleşim Bölgesine Bağlı Farklı Kromozom Tipleri.....	11
Şekil 7. Kromozomların Sentromer Yerleşimleri ve İsimlendirmeleri.....	12
Şekil 8. Ames Testinin Uygulanması ve Mutajeniteyi Gösteren Koloniler.....	13
Şekil 9. Hasarsız DNA (a) ve Hasarlı DNA İçeren Nükleusların (b) Comet Testi ile Belirtilmesi	14
Şekil 10. a- BrdU ile KKD Belirlenmesi, b- KKD İçeren Metafaz Görünümü.....	15
Şekil 11. Mikronükleus İçeren Binükleat Hücreler	15
Şekil 12. Kromozom Anormallikleri İçeren Metafazlar. a- Fragment, b- Kardeş Kromatit Birleşmesi, c- Kromatit Kırıkları, d- Kromozom Kırığı, e- Poliploidi, f- Endoreduplikasyon	16
Şekil 13. Clavenger Aparatı.....	20
Şekil 14. Kontrol Grubu ve Karabaş Kekiği Uygulanan Farelere ait Metafaz Hücre Sayıları.....	34
Şekil 15. Karabaş Kekiği Bitki Uçucu Yağının Farklı Konsantrasyonları ile Mitotik İndeks Arasındaki Regresyon ($r = -0,98$)	35
Şekil 16. Kontrol Grubuna ait Metafaz Örneği ($n=40$)(x1000).....	36
Şekil 17. Kontrol Grubu ve Farklı Dozlarda Karabaş Kekiği Uygulanan Gruplardaki Kromozomal Aberasyon Sayıları	38
Şekil 18. Karabaş Kekiği Bitki Uçucu Yağının Farklı Konsantrasyonları ile Kromozomal Aberasyon Arasındaki Regresyon ($r = 0,98$)	39

Şekil 19. Disentrik Kromozom (DSK) (1000 mg/kg Kekik)(Gavage Uygulama ♀) (48 Saatlik Muamele) (X1000)	40
Şekil 21. Fragment (F) (250 mg/kg Kekik) (Gavage Uygulama ♀) (48 Saatlik Muamele) (X1000).....	41
Şekil 22. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) Kromatid Kırığı (Kk) (500 mg/kg Kekik) (Gavage Uygulama ♀) (48 Saatlik Muamele)(X1000)	41



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kontrol Grubu Sıçanlarda Mitotik Aktivite Oranları.....	29
Tablo 2. 250 mg/kg Karabaş Kekiği Uygulanan Deney Grubu Mitotik Aktivite Oranları	30
Tablo 3. 500 mg/kg Karabaş Kekiği Uygulanan Deney Grubu Mitotik Aktivite Oranları	31
Tablo 4. 1000 mg/kg Karabaş Kekiği Uygulanan Deney Grubu Mitotik Aktivite Oranları	32
Tablo 5. Kontrol ve Deney Grupları Arasındaki Mitotik Aktivite Oranlarının Karşılaştırılması.....	33
Tablo 6. Kontrol Grubu ve Karabaş Kekiği Uygulanan Farelere ait Metafaz Hücre Sayıları.....	34
Tablo 7. Kontrol ve Deney Gruplarının Değişik Dozları ile Etkileşime Sokulan Fare Kemik İliği Hücrelerinde Kromozomal Aberasyon Oranları	37
Tablo 8. Kontrol Grubu ve Farklı Dozlarda Karabaş Kekiği Uygulanan Gruplardaki Aberasyon Sayıları.....	37

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
KA	: Kromozomal Aberasyon
MN	: Mikronükleus
MI	: Mitotik İndeks
PCE	: Polikromatik Eritrosit
MNPCE	: Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit
NCE	: Normokromatik Eritrosit
%	: Yüzde
<	: Küçük
>	: Büyük
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Gr	: Gram
KCL	: Potasyum Klorür
Kg	: Kilogram
Mg	: Miligram
SCE	: Sister Chromatid Exchange

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yeryüzündeki bitkiler, hayvanlar ve insanlar düzenli bir koordinasyon için de yaşamlarını sürdürürler. İnsanlar geçmişten beri yaşamlarını devam ettirmek, besin ihtiyaçlarını karşılamak ve çeşitli sağlık problemlerini tedavi etmek için bitkilerden yararlanmışlardır [1, 2].

Yeryüzünde bitki türlerinin yaklaşık olarak 350 bin civarında olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan bilimsel çalışmalarda bitki türlerinin yarısına isim kazandırılmıştır. İlaç olarak kullanılan bitkiler, insanlık tarihinden başlayarak günümüze kadar gelişerek çoğaltılmıştır. Besin olarak 3.100 kadar bitki halk tarafından üretilmektedir. Yaklaşık 10.100 kadar bitki ise doğada yetişmektedir [3].

Bitki, hayatın devamlılığı için gerekli olan oksijen ve bazı besinleri üretmektedir. Yıllardır ülkemizde bitkisel ilaçlar hastalıkların tedavisinde halk hekimleri tarafından kullanılmaktadır. Nüfusun artmasıyla şehirlerin gelişmesiyle bitki türlerinin azaldığı görülmektedir [4].

1985 yılı verilerine göre insanların yaklaşık %80'i, öncelikle hastalıkların tedavisinde bitkisel ürünler kullandığı, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tespit edilmiştir. Birinci sınıf ülkelerde ise kullanılan reçeteli ilaçların %20-%30 civarında bitkisel ilaçların kullanıldığı bilinmektedir [5].

20. yüzyılın sonlarına doğru gelindiğinde WHO bitkilerin (bitki yapraklarının, bitki köklerinin, bitki gövdelerinin vb.) kısımlarını çeşitli hastalıklarda tedavi edici özelliğinin olduğu yapılan çalışmalarla belirlemiştir. Bitkilerin tedavi özelliğinin ve kullanılacak miktarın iyi bilinmesi ve belirlenmesi için yapılan çalışmalarla belirlenip desteklenmektedir [6].

Türkiye'de yaklaşık olarak dokuzyüzbin civarında bitki türü olduğu bilinmektedir. Ülkemizde bu bitki türlerinden pek fazla yarar sağlanılmamaktadır [7].

Ülkemizde yaklaşık olarak ilaç sanayisinde kullanılabilir 400-500 bitki türü olduğu düşünülmektedir. Bunların 190-210 türünün yurt dışına gönderildiği bilinmektedir [3, 8, 9].

Bitki türü zengin olan ülkemizde birçok bitki gen merkezi kurulmuştur. Kurulan gen merkezleri endemik türleri de içermektedir [9].

Kullanılan bitkilerin olumlu etkilerinin yanısıra bilinçsiz ve kontrolsüzce kullanılmasında olumsuz etkiler doğuracağı tahmin edilmektedir. Bitkilerin uçucu yağlarının kontrolsüz ve bilinçsiz kullanılmasından genetik materyal üzerine etkisinin olduğu belirlenmiştir [10, 11].

Toksik maddelerin DNA materyali üzerinde oluşturduğu hasar genotoksisite olarak bilinmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda DNA üzerindeki hasarlar mutasyonlarla alakalı olduğunu göstermiştir [12, 13].

Kanserden korunmak için maddelerin hangi doku üzerinde ne kadar kullanılacağı azlık çokluk miktarının belirlenmesi için genotoksik çalışmalar yapılmaktadır [12, 13].

Genotoksisite testleri moleküler ve kromozomal düzeyde yapılmaktadır. Moleküler düzeyde yapılan testler DNA hasarının direk tespit edilmesi için Comet testi, düzenlenebilir DNA bozukluğu belirlemek için programlanmış DNA sentezi, genellikle Ames ve Drosophila testleri kullanılabilir. Kromozom düzeyinde ise sitogenetik testler Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Aberasyonları (KA) ve Mikronükleus (MN) test teknikleri daha çok tercih edilmektedir. Kromozomal Aberasyon, DNA'da oluşan hasar, kırıklıklar veya hatalı yapımdan dolayı oluşur [14, 15].

Sayısal kromozom bozuklukları kromozom, kromozom tipi kırıklıklar ve hatalı birleşmeler Kromozomal Aberasyon testi ile belirlenmektedir. Kromozomal Aberasyon testi 1970'li yıllarda klastojenik etkiyi belirlemek için kullanılmıştır [16, 17].

Karabaş kekiği toplum arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç maddesi olarak tüketilmektedir. Karabaş kekiği uçucu yağının bileşenlerinde fenoller bulunduğundan antibiyotik etkiye sahiptir. Halk arasında yemeklerde kullanılmakla beraber birçok temizlik ve bakım ürünlerinde de çeşitli kullanım alanlarına sahiptir [3, 18, 19].

Literatür incelemeleri sonucunda karabaş kekiği (*T. Spicata*) bitkisinin in vivo kromozomal aberasyon etkisinin çalışılmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile halk arasında fazla kullanılan Karabaş kekiği bitki uçucu yağının in-vivo fare kemik iliği hücrelerinde kromozomlar üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1.1. Kekik Bitkisinin Genel Özellikleri

Dünyada genel olarak kullanılan ve “kekik” olarak isimlendirilen “Labiatae” familyasına ait *Tyhmus*, *Origanum*, *Coridothymus* ve *Saturesa* türleri başlıca Akdeniz bölgesinde yayılış göstermektedir. Yapı olarak kısa boylu otsu çalılardır [20].

Özünde bulunan uçucu yağlarından dolayı ilaç sanayisi, yemeklerde tatlandırıcı ve kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır. Kekik ailesi 190-201 kadar cinsi 3100-3210 kadar türü bulunmaktadır. Ülkemizde ise 40-43 cinsi 571 tür kekik bitkisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 13-15 endemik türü bulunmaktadır [21].

Dünya üzerinde Güney Avrupa ve Batı Asya da genel olarak yayılış göstermektedir [22]. Labiatae familyasına ait bahar ve yaz aylarında çiçek açar ve kendisine ait kokusu bulunmaktadır. Yapı olarak çok dallı, odunlaşmış kısa gövdelere sahip, dalların uç kısımları köşeli, kırmızı tonlarda çiçeklere sahiptirler, yaprakları 0,1-1,1 cm civarındadır. 1700 rakımlara kadar yayılış göstermiştir. Yapraklarının uç kısımları da uçucu yağları depolayan salgı tüyleri vardır [6].

Kuvvetli bir antiseptik ve antifungal yapıya sahip *Tyhmus vulgaris* L.’nin uçucu yağ bileşiklerinde bulunan tyhmol’ün fenollere göre 29 kat daha fazla antiseptik etkisi ve 5 kat daha fazla toksik yapıya sahip olduğu belirlenmiştir [23].

Labiatae ülkemizde endemik türlerine de rastlanmasına rağmen genellikle yapılan çalışmalar besinleri koruyucu etkisidir [1].



Şekil 1. Kekik (*Thymus*) Bitkisinin Morfolojik Görüntüsü [24]

1.1.2. Karabaş Kekiği (*Thymbra spicata*)

Güney Anadolu ve Batı bölgelerinde yayılış göstermektedir. Uçucu yağı karvakrol bakımından zengindir [25, 26]. Gövde, yaprak ve dallarında %2.4 uçucu yağa sahiptir. Uçucu yağının %53.5 karvalrol, %2'sinde timol bulunmaktadır. Toplam %55.5 fenolik madde bulunmaktadır [27].



Şekil 2. Karabaş (*T.spicata*) Kekiğinin Morfolojik Görüntüsü [28].

1.1.3. *T.spicata* Sistematığı

Alem: Plantae (Bitkiler)

Bölüm: Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)

Sınıf: Magnoliopsida (İki çenekliler)

Takım: Lamiales

Familya: Lamiaceae (Labiata) (Ballıbabagiller)

Cins: *Thymbra*

Tür: *T. Spicata* [29].

1.1.4. Kekik (*Thymus*) Bitkisinin Halk Arasında Kullanımı

Kekik eski çağlardan günümüze kadar baharat ve ilaç olarak kullanılan bitkilerden biridir. Eski Yunan tarihine bakıldığında kekik antidon olarak konvülsiyonlara bağlı ve ödem oluşumuna karşı tıbbi bitki olarak kullanılmıştır. Birçok eserde kekik bitkisinin tedavi edici ve diğer etkilerinden bahsedilmiştir [30, 31].

Kekikte bulunan uçucu yağlardan veya yağlarda izole edilen timol, antibakteriyel, antiseptik, antispazmodik, fungusit ve ekspektoran etkilerinden faydanılmıştır [23, 32].

Kekik bitkisi halk arasında ilk olarak kramp olan bölgelere uygulanmıştır. Steril etkisinin olduğu ve balgam söktürücü olarak kullanıldığı da bilinmektedir. Mide, bağırsak, bronş ve akciğer gibi bölgelerin hastalıklarında tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır. Halk arasında iltahap söktürücü ve sindirim sistemini uyararak iştah acıcı olarak da tüketilmektedir. Ayrıca halk arasında kekik diğer bitkilerle karıştırılarak başka hastalıklarda tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır [33].

1.1.5. Uçucu Yağların Genotoksik Etkileri

Uçucu yağlarda bulunan bitki ekstraktlarının ve uçucu yağ etken maddelerinin genotoksik etkilerine ilişkin bulgular azdır. *Salmonella* mikrozomal test yöntemleriyle yapılan deneyler sonucu elde edilen bilgiler de bitkilerin ve etken maddelerinin mutajenik etki göstermediği belirlenmiştir. Bakteriyel yöntemlerle 4 civarında uçucu yağın genotoksik etkilerine bakılmıştır. Uçucu yağların ve etken maddelerin genotoksik etkisine rastlanarak, mutajenik etkiler göstermiştir [34].

Kısa süreli in-vitro memeli ve mikrobiyal yöntemlerle timol, karvol, karvakrol ve sinmaldehit benzeri uçucu yağ etken maddelerinin doza bağlı olarak Hep 2 hücrelerinde hücre yaşayabilirliği ve proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Toksik olmayan dozlarda timol ve karvakrolün aktivasyonuna gerek göstermeden Ames testi ile revertant sayısını 1.5-1.7 kez artış gösterdiği fakat SOS-kromotest ile incelenen dört bileşikte toksik olmayan dozlarda DNA hasarı oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan morfolojik incelemede karvakrol, karvol ve sinmaldehitin doza bağlı olarak DNA onarımını bozduğu belirlenmiştir [35].

1.2. Genotoksisite

20. yüzyılın başların da Müller yaptığı çalışmalarda X ışınlarının *Drosophila*'da mutasyon oranlarının 15-20 bin kat daha arttığı belirlenmesiyle genetik toksisite tarihini başlatmıştır. Teknolojinin de ilerlemesiyle fazlalaşan risk ve çözümleme yöntemleriyle birlikte önemli araştırma ve geliştirme dallarından biri olmuştur [27].

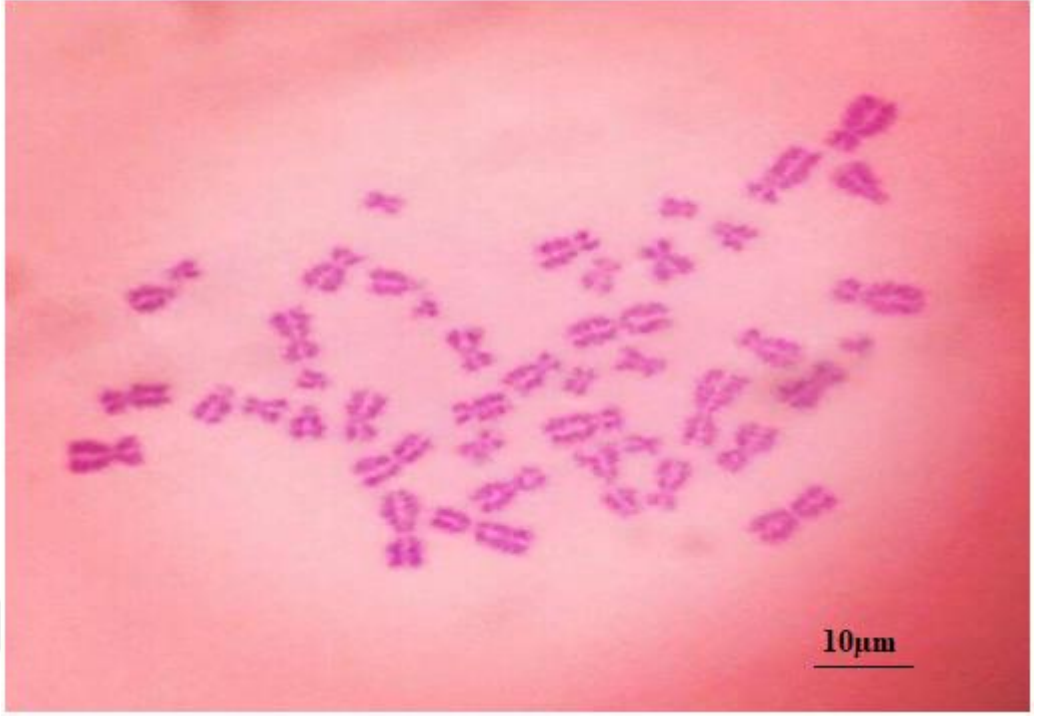
Genetik toksikoloji, toksikolojinin bir alt dalıdır. Genetik toksikolojide yapılan çalışmalar canlı sistemlerin işleyişi sırasında biyolojik, fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda canlı DNA'sındaki kromozomal yapının her hangi bir bölgesinin hasar görmesiyle oluşan etkilerin genetik toksikoloji bilimi belirler [36, 37].

Somatik mutasyonların birikimi sonucunda kanser hücreler oluşmaktadır. Gen ve kromozomlarda oluşan hataları veya yeni düzenlemelere genotoksinler sebep olmaktadır. DNA'da hasara yol açan mutasyonlar kalıtsal hastalıklara sebep olmaktadır. Mutajen olarak isimlendirilen fiziksel ve kimyasal uyarılar sonucunda mutasyonlar meydana gelir [32].

Genetik zehirlenme organizmada genetiğin belirlenmesinde, kalıtsal bir zehirlenmenin oluşmasıdır. Gen üzerinde ki genetik toksinler olarak isimlendirilir. Genetik toksinler; sitotoksik, sitostatik ve mutajenik etkenler olarak isimlendirilir. Sitotoksik maddeler; anoksin, membran permeabilitesi ve protein koagülasyonu sonucu hücre ölümüne neden olabilir. Sitostatik etki ise kromozom yapısında oluşan farklılıklardır. DNA üzerinde ki değişimlere "nokta mutasyonlar" denir. Nokta mutasyonlara "mutajen etkenler" sebep olmaktadır. Mutajen etkenler, virüsler, fiziksel ve kimyasal etkenlerdir. Bu olaya "mutajenesiz", oluşan türlere ise "mutant" denir [37].

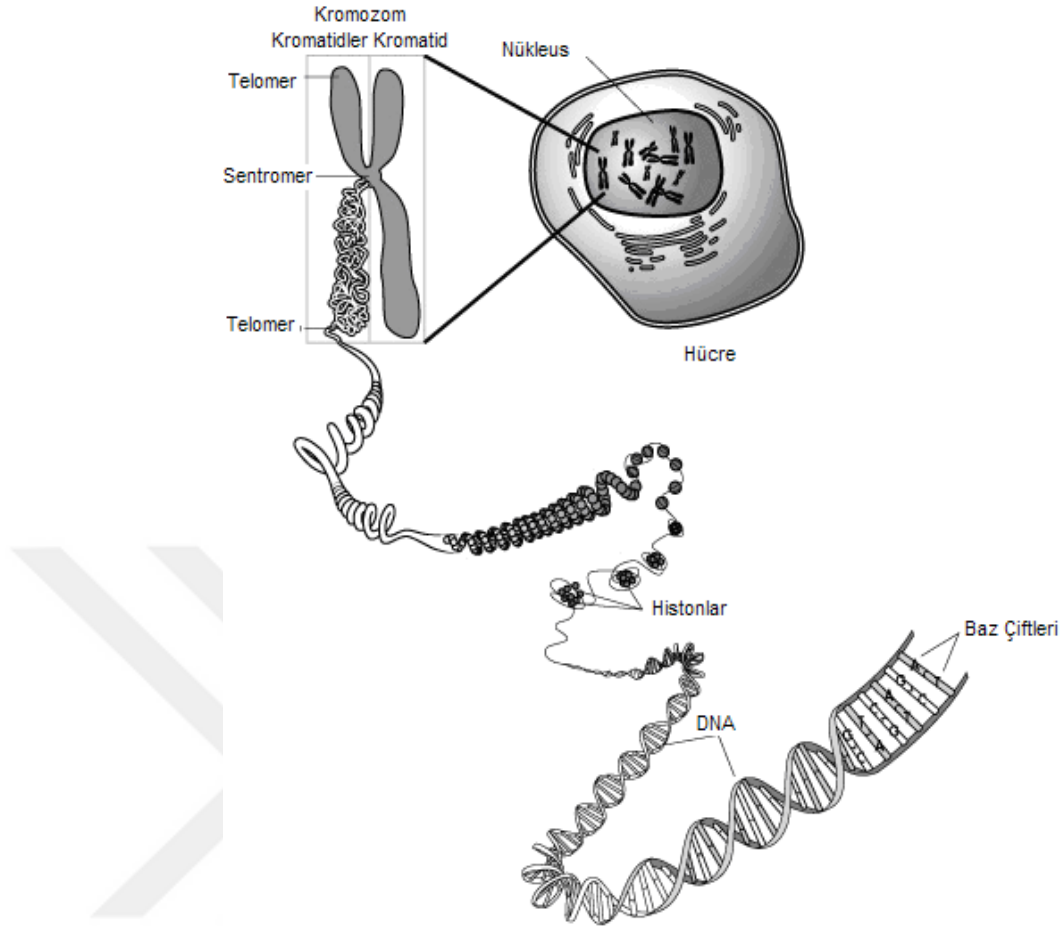
1.2.1. Kromozomlar

Hücre organellerini işlevsel ve morfolojik olarak inceleyen, 'Chromosome' olarak isimlendirilen, genetik, sitogenetik ve sitoloji bilimlerinin bir araya gelmesiyle oluşan hücre organelidir [38].



Şekil 3. Kromozomun Işık Mikrokobu Görüntüsü

Kromozomal proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşan kromotid şeklindeki paketlerdir. Hücre bölünmesi hariç kromotinler dağınık halde bulunurlar. Hücre bölünmesi sırasında bir araya gelerek yoğunlaşırlar. Bölünme sırasında kromozomlar özel yapılara sahip olurlar. Kromotinin yapısında bulunan proteinlerin bazıları gen ekspresyonunu düzenlerken bazıları yapısal rol oynar. Mikroskop altında incelenerek kromozomlar belirlenir [39].



Şekil 4. DNA'nın Kromozomlara Dönüşmesi [40].

Nesilden nesile aktarılan kromozomların kalıtsal karakterlerin açıklanması kromozom yapılarının incelenmesiyle açıklığa ulaştırılır [41, 42].

Her tür kendine özgü sayı ve morfolojiye sahip karakteristik kromozom (karyotip) sahiptir [39].

1.2.1.1. Kromozomlarda Oluşan Özel Bölgeler

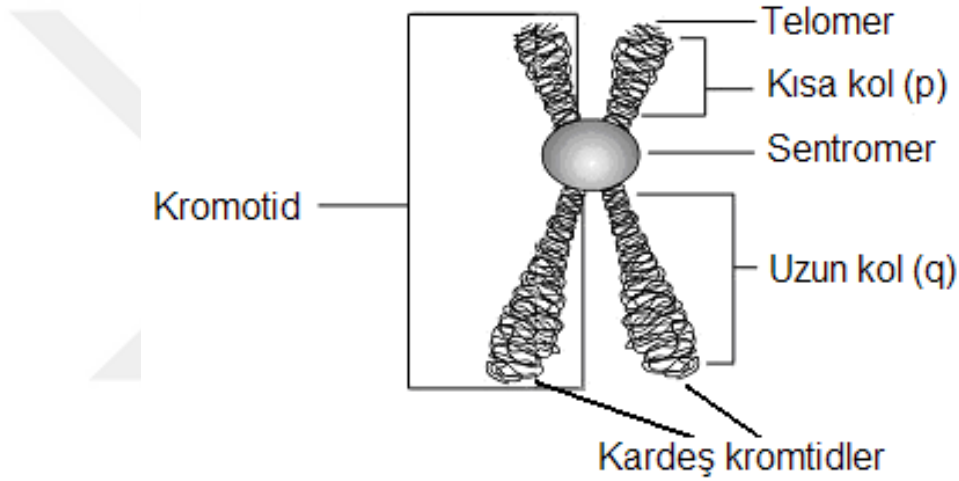
Kromozom ışık mikroskobu altında incelendiklerin de bazı morfolojik özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir [38].

Kromotid: Kromotinlerin protein iskeletine sarılmasıyla meydana gelen oluşumlardır. Kromozom kolları iki görünümlüdür. Bunlardan uzun kol (q kolu), kısa kol (p kolu) olarak isimlendirilir [43].

Sentromer: DNA'nın bağlandığı spesifik protein yapısına sentromer denir. Primer olarak tanımlanan p ve q kollarına olan sitogenetik tanımlayıcı oluşumdur [43].

Telomer: Kromozomların uç kısmında bulunan DNA dizileri telomer olarak isimlendirilir. Kromozom uçlarını ve kromozomların bir birine yapışmasını önler. DNA dizisinde kısaltmalar yaşlanmaya bağlıdır. Kanser hücrelerinde kısaltmalar görülmez [43].

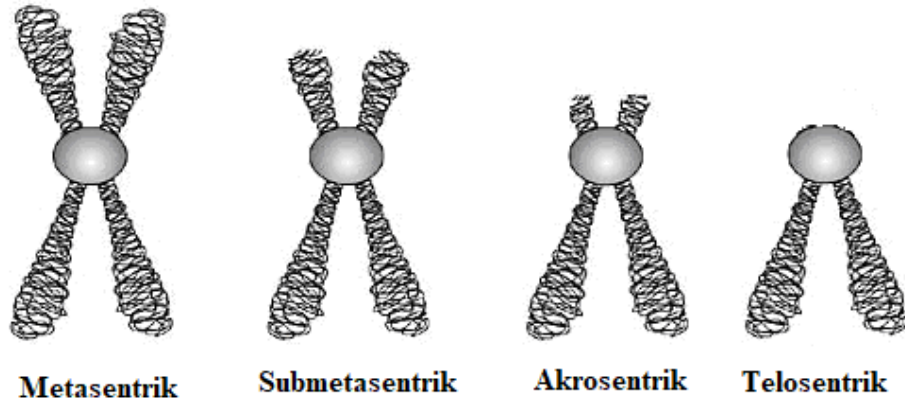
Replikasyon orjini (Origins of replication ORI): DNA sentezinin başladığı tüm bölgelerde görülür. Ökaryotik hücrelerde birçok ORI bölgesinde bulunmaktadır. Işık mikroskopunda bu yapılar görülmemektedir [43].



Şekil 5. Mitoz Esnasındaki Bir İnsan Kromozomunun Şematik Görünümü [40].

1.2.1.2. Sentromer Bölgelerine Göre Kromozom Çeşitleri

Kromozom yapıları sentromerlerin kolların boğum noktalarına göre ve kolların uzunluklarına göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır [38].



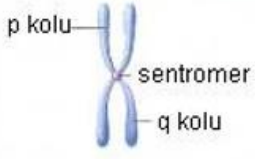
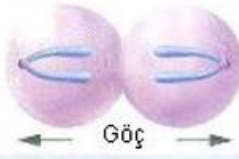






Şekil 6. Sentromerin Yerleşim Bölgesine Bağlı Farklı Kromozom Tipleri [40].

Metasentrik kromozom: Sentromerin boğum noktası kolların orta noktasındadır. Kromozom kollarının eşit bölmektedir [38].

Submetasentrik kromozom: Sentromerin boğum noktası uçla orta noktası arasında iki kolu birbirine eşit olarak böler [38].

Akrosentrik kromozom: Sentromerin boğum noktası uç kısma yakın olan kromozomlardır [38].

Telosentrik kromozom: Sentromerin boğum noktası uç kısımdadır. Bu tip kromozom yapıları insan hücrelerinde görülmemektedir [38].

Sentromer yerleşimi	İsmi	Metafazdaki şekli	Anafazdaki şekli
Orta	Metasentrik		
Uçla orta arası	Submetasentrik		
Uca yakın	Akrosentrik		
Uçta	Telosentrik		

Şekil 7. Kromozomların Sentromer Yerleşimleri ve İsimlendirmeleri [37].

1.2.2. Genotoksisite Testleri

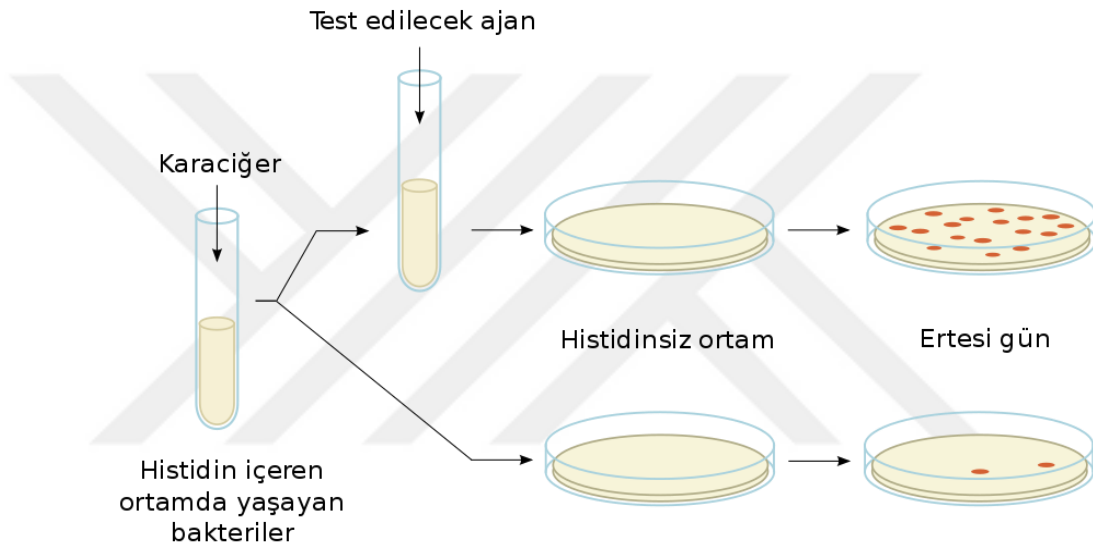
1960'dan beri kullanılan bu testler günümüze kadar ulaşmaktadır. Canlı organizmada oluşan hasarlar, kanser, UV, radyasyon, sanayi atıkları gibi canlılar da oluşturacağı karsinojenik ve mutajenik etkilerin tespiti için in-vivo ve in-vitro mutajen testler şunlardır.

- Ames testi
- Comet testi
- Kromozom anomalileri (CA) testi
- Kardeş kromotid değişimi (SCE) testi
- Mikronükleus (MN) testi [44].

1.2.2.1. Ames Testi

Ames testi olarak bilinen salmonella/mikrozom mutajenite testi, canlılar üzerindeki kimyasal maddelerin oluşturdukları mutajenik etkilerin belirlenmesinde kullanılan testir. Ames testi parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen/karsinojen etkisi

en iyi bilinen kimyasallarla gerçekliği en çok kabul edilmiş bakteriyel test sistemidir. Ames testi canlı organizmalarda kanser hücresi oluşumunda somatik hücrelerin baskılayıcı genlerden meydana gelen nokta mutasyonların belirlenmesinde ve kimyasal maddelerin DNA ile etkileşimlerini engelleyerek mutajenik/karsinojenik etkileri ortadan kalkmasını sağlayan antikarsijenik maddelerin belirlenmesinde ames testi yaygın olarak kullanılır. *Salmonella typhimurium*'un mutant suşları, histidin operonunun değişik bölgelerinde bazı mutasyonlar için kullanılmaktadır [36, 45, 46].

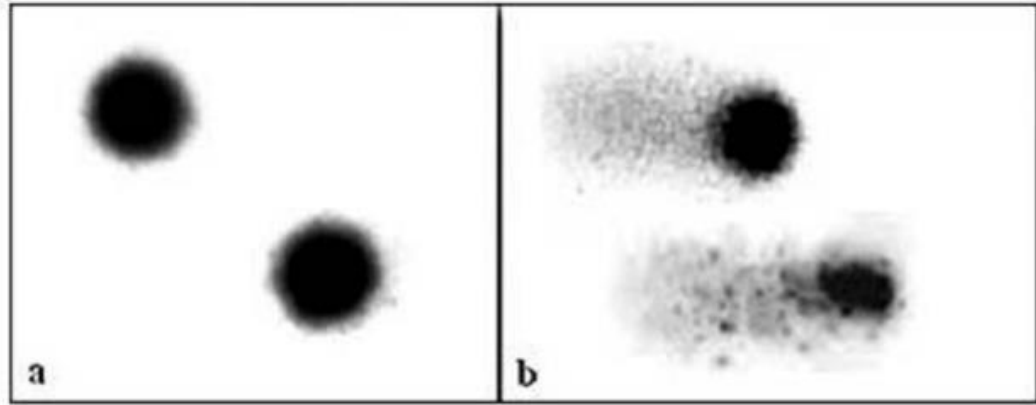


Şekil 8. Ames Testinin Uygulanması ve Mutajeniteyi Gösteren Koloniler [47].

1.2.2.2. Comet Testi

Son yıllarda daha fazla gelişen, DNA tek veya çift zincirinde oluşan hataların belirlenmesinde kullanılan, hızlı, güvenilir, basit ve ucuz bir test yöntemidir. Comet yöntemi tek hücrelerde elektroforez tekniği olarak adlandırılmaktadır. Memeli hücrelerinde DNA da oluşan kırıklıkları ve onarım bozukluklarının belirlenmesinde kullanılan bir test yöntemidir. Comet testi DNA hasarının belirlenmesinde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesinin belirlenmesi, kromozom tamirinin tespit etmek, kanser hastalarının prenatal tanısında, DNA da oluşan hasarın artışının belirlenmesi de

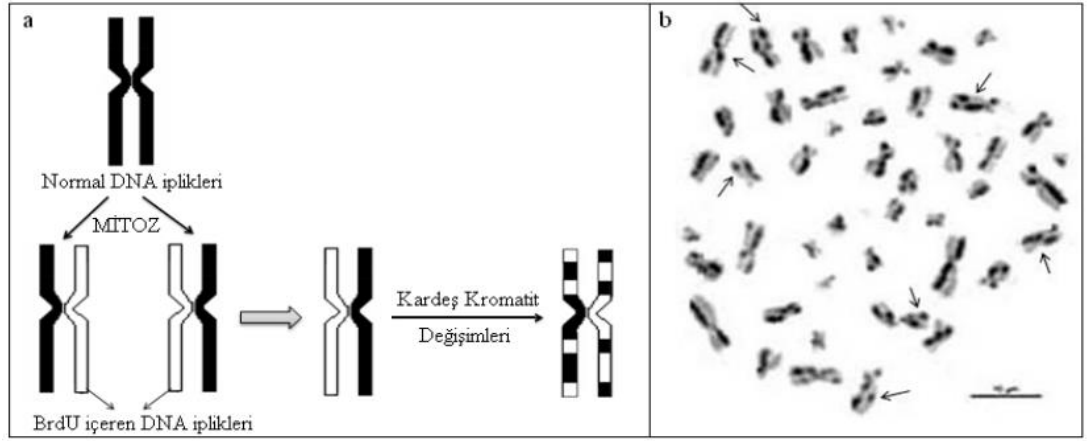
kullanılan bir bioizlem testidir. Genotoksinlerin ilk etki oluşturdıkları bölgelerin belirlenmesinde, ökaryotik hücrelerin genelinde uygulanabilmesi, daha düşük hasarların belirlenmesi comet testiyle sabitlenmektedir. Alkali ortamlarda pH'da farklı molekül aralıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanlarda farklı göç etmesine bağlı olarak hasarların belirlenmesini sağlar [36, 48, 49].



Şekil 9. Hasarsız DNA (a) ve Hasarlı DNA İçeren Nükleusların (b) Comet Testi ile Belirtilmesi [44].

1.2.2.3. Kardeş Kromotid Değişimi (KKD) Testi

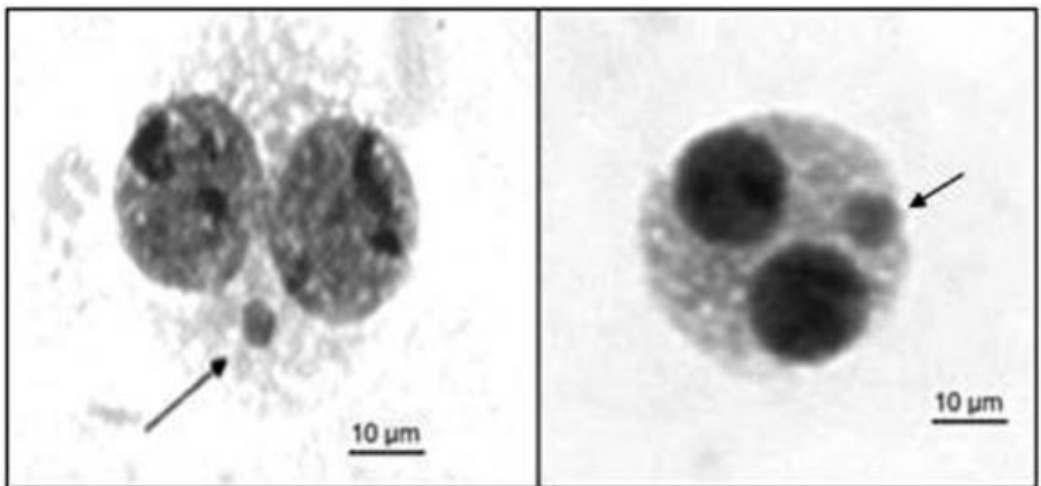
Homolog lokuslar arasında çift zincir kırıklarının rekombinasyon yöntemiyle onarılması ve DNA replikasyon ürünlerinin değişiminin gösterilmesinde kullanılan test tekniğine kardeş kromotid değişimi (KKD) testi denir. Kromozomlarda oluşan bazı ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerin belirlenmesinde, ayrıca kromozomlarda oluşan yapısal değişikliklerin belirlenmesinde kullanılan test tekniğidir. Mutajen ve karsinojen etkiye sahip olduğu bilinen kimyasal maddelere maruz kalan hücrelerde, kromozom kırıklığı ve yatkınlığı ile karakteristik edilen bazı kalıtsal hastalıklarda KKD frekansı ile tümör oluşumu arasında lineer bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir. DNA ile etkileşime giren ve DNA reaksiyonlarına katılan mutajenik maddelerin belirlenmesi KKD testi ile yapılmaktadır [50, 51, 52, 53].



Şekil 10. a- BrdU ile KKD Belirlenmesi, b- KKD İçeren Metafaz Görünümü [44].

1.2.2.4. Mikronükleus (MN) Testi

Hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, kinetokordan, mitotik iğdeki hatalardan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan, hücrelerin mitoz evresinde ortaya çıkan, esas çekirge dahil olmayan, tam ve esantirik kromozom fragmanlarından köken alan yapılardır. Kromozom düzensizlikleri ve somatik hücrelerin belirli ajanlarla hücrede oluşturduğu MN artışının indirek göstergesi olarak değerlendirilir. Bazı fiziksel ve kimyasal maddelere maruz kalan canlılarda, kanser genomik düzensizlik ile karakterize edilen çeşitli hastalıklardan MN frekansının yüksek olduğu belirlenmiştir [36, 54, 55, 56, 57].

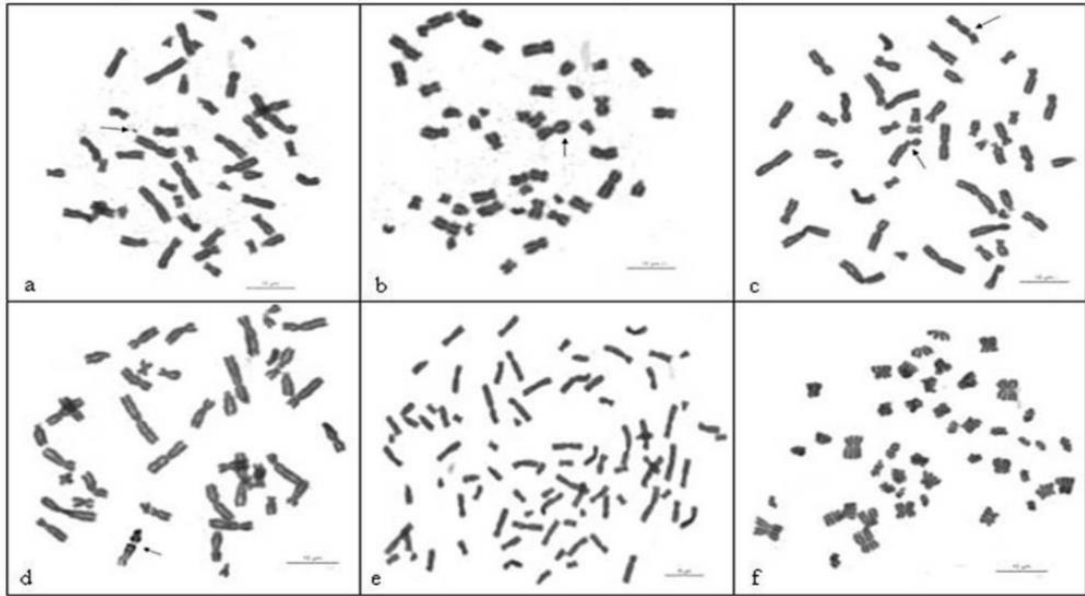


Şekil 11. Mikronükleus İçeren Binükleat Hücreler [44].

1.2.2.5. Kromozom Anomalileri (CA) Testi

Kromozom üzerinde oluşan yapısal ve sayısal değişimlere kromozomal aberasyon denir. Kromozol aberasyon kendiliğinden veya radyasyonlar sonucunda oluşmaktadır. DNA düzeyinde oluşan hasar sonucu kromozomal anormallikler ortaya çıkmaktadır. DNA'da onarılmış çift zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır. DNA'dan oluşan bu hasarların tamir edilirken oluşan CA frekansı yüksek kanser riski göstermektedir [47, 58, 59, 60, 61]. Mutajenler tarafından indüklenen bazı yapısal ve sayısal anormalliklerin belirlenmesinde kullanılan test yöntemleridir. Memeli hücre kültürlerinde In-vitro, kemik iliği hücrelerinde ise In-vivo yöntemler kullanılmaktadır [36, 62, 63].

Ökaryotik kromozomlarda oluşan kromozomal aberasyon mayoz ve mitoz bölünme esnasında özel boyama teknikleriyle belirlenir [64, 65].



şekil 12. Kromozom Anormallikleri İçeren Metafazlar. a- Fragment, b- Kardeş Kromatit Birleşmesi, c- Kromatit Kırıkları, d- Kromozom Kırığı, e- Poliploidi, f- Endoreduplikasyon [44].

1.2.3. Sayısal Kromozom Anomalileri

Kromozomda oluşan sayısal anomaliler iki şekilde belirlenir.

1. Kromozomların ayrılması (nondisjunction)
2. Kromozomların anafazda geri kalması

Mayoz sırasında kromozomlara fazla veya eksik kromozom gitmesi nedeniyle kromozomal anomaliler oluşur. Kromozomlarda oluşan ve belirlenen anomaliler: öploidi (Euploidi) ve anöploidi (Aneuploidi) olarak isimlendirilir. Kromozom sayısının belirli sayılarda artması olayına Euploidi olarak adlandırılır. Örnek olarak haploidi sayısı 23'dür. Diploid sayısı ise 46 olarak bilinmektedir. 23 olan haploidin 69 olması yani 3 katına çıkması triloidi denir. Bu şekildeki artışlar poliploidi olarak adlandırılır. Hücre çekirdeğinin bölünmesi, sitoplazmanın bölünmesi sonucu poliploidi oluşur. Kromozom sayısının 46'dan fazla olması veya eksik olmaması durumuna aneuploidi denir. Az olmasına durumuna hipoploidi, fazla olmasına hiperploidi denir. Monozomidi hipoploidi'ye en iyi örnektir. Monozomidi homolog kromozomların biri ayrılmaması sonucu 45 olmasıdır. Turner sendromu (45,X0) örnek olarak gösterilebilir. Trizomidi ise hiperploidiye örnek verilebilir. Normalde iki adet olan homolog kromozomlar üç adet olmasına trizomidi denir. Örnek olarak "trizomi 21" (3x21 kromozom) olarak bilinen Down Sendromu örnek gösterilebilir [66].

İnsan kromozomunda oluşacak bir değişiklik fenotipik olarak gösterilir. Normal 46 kromozomun dışındaki kromozomlara heteroploid adı verilir. Haploid kromozom sayısının (n) tam katları şeklindeki anomalilere öploidi (euploid) ve diğer kromozom sayı farkı anomalilerinde anöploidi (aneuploid) adı verilir [66].

1.2.4.Yapısal Anomaliler

Kromozom yapısındaki kırıklar kromozom yapısında ki değişiklikler meydana gelir [67]. Mitoz ve mayoz esnasında G1, S ve G2 safhasında kromozom kırıkları meydana gelir. Gen mutasyonlarıyla, kromozom kırıkları için yapılan çalışmalar bir biriyle bağlantılıdır. Gen mutasyonlarının ve kromozom kırıklarının mutajenlerin indüklenmesiyle oluşur. DNA sarmalında ki tek zincirin kırılmasının nedenleri; primidin dimerlerinin meydana gelmesi, baz alkilasyonu, iplikcikler arasında çapraz bağlantı DNA çift sarmalının arasına

mutajen girmesi gibi faktörler gösterilir. Kromozom ve kromotid olmak üzere iki tip kırık bilinmektedir. Hücre bölünmesi safhalarında oluşan ajanlar kromozom ve kromotid tipi kırıklıklar meydana getirir. Kromozom tipi kırıklıklar G0 ve G1 safhalarında meydana gelir. S ve G2 safhalarında kromotid kırıklıklar meydana gelir. Kromozom kırıkları G1 safhasında bir kromotid de kırık meydana getirir. Bu olay S safhasında devam ederse, metafazdan sonra her iki kromotid de kırık oluşması sonucunda kromotid tipi kırıklıklar meydana gelir. Oluşan kırıklıklar tekrar birleşme asentrik fragment ve delesyonlu bir kromozom oluşturur. Meydana gelen asentrik parçalar metafazda kaybolur ve anafazda mikronükleusun oluşmasına sebep olur [43, 68, 69].

Kromozomda oluşan kırıklık tekrar birleşmesi meydana gelse bile tekrar birleşme de olmaya bilir. Kromozom segmentlerindeki kırıklar orijinal şekilde tekrar yapılırsa bu kırıklık fark edilmez. Orijinal yapışmalar sonucunda da şu kromozomal değişimler ortaya çıkar [70].

Delesyon: Kopan kromozom parçasının kaybolmasına denir. Kaybolan kromozom parçası başka kromozomlara bağlanmaz. Stoplazma bu kromozom parçasını birleşenlerine ayırır. Üzerinde bulunan genetik yapı kaybolacaktır. Kromozom kırıklığı büyükse yani genetik yapı fazla ise gen dengesinde bozulma olarak hücre ölümü gerçekleşir [70].

Duplikasyon: Homolog iki kromozomdan kopan parçasının başka bir kromozomda oluşan boşluğa yerleşmesi sonucu oluşur [71].

Translokasyon: Kromozomda oluşan kırık parçanın başka kromozoma yerleşmesine translokasyon denir. Homolog kromozomlarda görüldüğü gibi homolog olmayan kromozomlarda da görülebilir [71].

İnversiyon: Kromozomda iki kırık oluşması ve bu oluşan kırıkların yer değiştirilerek yapışmasına denir [70].

Ring kromozom: Sağlam olan kromozom uçlarında polaritenin olması nedeniyle yapışma olmaz geri kalan kısmında yapışma olmasına ring kromozom denir [66].

İzokromozom: İğ ipliklerinden çekilmesi esnasında kromozomlarda oluşan hata sonucu boylamasına bölünmesi gerekirken enine bölünmesine izokromozom denir [38].

Sentrik fragment: Karyotip esnasında rastlanan küçük, ek metasentrik figmentlerdir [66].

Sister-union (Kardeş kromotid birleşmesi): Aktarımı olmayan mutasyonlardır. Kromozom üzerindeki kırılmalar rastgele olmadığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Kromozom üzerinde duyarlılık bazı bölgelerde fazladır. Tek kromatid halinde olduklarından metabolik evrede kırıklıklar daha basit olur. Tekrardan yapışmaması halinde sentromerli ve sentromersiz parçalar miyoz devam ederken uzunlamasına yarılr ve her birinden iki kromotid oluşur. Oluşan kromotid uçları birbirine yapışır. Bu olayların olmasına kardeş kromotid birleşmesi denir [72].

Disentrik kromozom: Sentromer olan parçaların sentromerlerinin kaybederek yapışması olayına disentrik kromozom denir. Crossin-over'den dolayı 2 gen anafaza göç edeceğinden rekombinat kromotid disentrik köprü formasyonunu oluşturur. İki sentromerli kromozoma disentrik kromozom denir [65].

1.3. Bitki Ekstraktarı İle İlgili Genel Bilgiler

Bitkiler aleminde kendilerine özgü renk, koku ve tat bulundurmaları yanı sıra kendilerine özgü uçucu yağlarda bulundurmaktadırlar. Uçucu yağlar oda sıcaklığında donmuş veya sıvı halde bulunurlar ve belirli sıcaklıklarda buharlaşmaktadırlar. Kimyasal bileşenlerinde hidrokarbonlar yanı sıra, asit, alkol, keton ve fenon gibi bileşiklerden oluşmaktadırlar [26, 73].

Uçucu yağlarda su buharında uçucu olan azot ve kükürt gibi bileşiklerin yanı sıra 2000'den fazla kimyasal bağ bulundurmaktadır. Uçucu yağlar bitkilerin kök, gövde, yaprak ve meyve kısımlarında bulunmaktadır. Bitkilerin bu özellikleri birçok kişi tarafından ve bazı toplumlarda terapi amaçlı kullanılmaktadır [74].

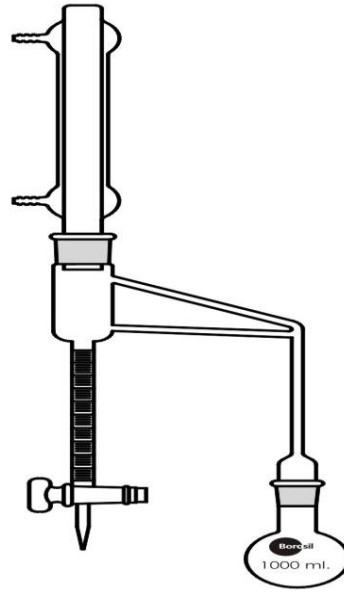
1.3.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenleri

Uçucu yağların büyük bir kısmı yaklaşık olarak %90 terpenik maddeleri barındırmaktadır. Uçucu yağın elde edilecek bitkinin türüne göre aromatik madde, düz zincir hidrokarbonlar, azot ve kükürt gibi kimyasal maddeler sınıflandırılabilir [75, 76].

1.3.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri

Bitkilerde bulunan uçucu yağların elde etmek için, bitkinin ısıya karşı duyarlılığı, elde edilecek uçucu yağın suda çözünüp çözünmediği ve uçucu yağın miktarı tespit edilmelidir [75, 76].

Destilasyon: Su, buhar ve vakum destilasyonu olarak 3 kısma ayrılarak, sıvıların kaynama noktalarının farklılıklarından dolayı ayrılma işlemi yapılır [75]. Destilasyon yöntemi Clavenger aparatı kullanılarak, cam balon içine konulan bitki kaynatılarak serbest hale geçen uçucu yağların başka bir haznede toplanma işlemine dayanmaktadır [76].



Şekil 13. Clavenger Aparatı [77].

Sıkma: Destilasyon yönteminde bozulma gösteren bitkiler sıkma (presleme) yöntemi kullanılarak uçucu yağlar elde edilirler. Su ile yıkanarak yağ-su emülsiyonu bir kapta toplandıktan sonra santrifüj ile ayrılır [78].

Ekstraksiyon: Bu yöntem Soxhlet cihazı kullanılarak aseton, solventler vb. maddeler kullanılarak bitki uçucu yağı elde edilirler. Kullanılan çözücü madde buharlaştırarak ve tekrar soğutulma sisteminden geçerek bitki parçalarının bulunduğu kısma geri dönerek ve bitki içindeki maddeleri çözerek çözülmüş maddelerle birlikte çözücünün içinde toplanırlar. Çözücü madde döner başlıklı evaporatörde uçurulmakta ve çözünen madde cam balon içinde kalmaktadır.

Ekstraksiyon yöntemi 3 şekilde yapılmaktadır;

- Organik çözücü ile ekstraksiyon
- Sabit yağ ile ekstraksiyon
- Sıkıştırılmış gazlarla ekstraksiyon [79].

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Hayvan Materyali

*Hayvanlar Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HAYDEK) 22.03.2011-009 sayılı izni ile çalışma onayı alındı.

Çalışmada ağırlıkları 20 ± 1 gr. arasında değişen, 8 haftalık dişi *mus musculus* cinsi albino fareler kullanıldı. Mitotik aktivite ve kromozomal aberasyon analizinin belirlenmesi amacı ile 40 adet dişi fare kullanıldı. Deney hayvanları zarar görmeyecek şekilde kafeslerde barındırıldı. Hayvanlar kafeslere 10'lu gruplar halinde ayrılarak konuldu. Oda sıcaklığı 20 ± 2 °C olacak şekilde 12 saat ışık 12 saat karanlık bir ortamda su ve besin ihtiyaçları giderilerek barındırıldı. Uygulanacak maddenin dozu farelerin günlük ağırlıklarına göre tespit edilip, oral gavaj yolu ile verildi.

2.2. Çalışmada Kullanılan Bitki Uçucu Yağı

Yapılan çalışmada araştırma materyali olarak karabaş kekiği (*T. spicata*) bitki uçucu yağı kullanıldı. 1000 ml'lik balon joje içerisine 80 gr karabaş kekiği ve 800 ml distile su konularak yaklaşık 4-5 saat Non-Asbestos marka Clevenger cihazı ile su buharı distilasyonuna bırakılarak uçucu yağ elde edildi. 4-5 saat sonunda toplama kabında biriken karabaş kekiği bitki uçucu yağı koyu renk steril şişelere alınarak deney hayvanlarına verilecek güne kadar +4 °C' de saklandı.

2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Kolşisin (Colchicine)

Hazırlanan kromozom preparatlarının mitotik zehir olarak Colchicine (kolşisin) (Sigma cat. No. C9754) maddeleri kullanıldı. Kolşisin çözeltisi steril distile su içerisinde hazırlandı. Kolşisin çözeltisinden 4 mg/kg dozda 2 saat önce hayvanların karın zarına (peritonuna) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kolşisin'in bazı özellikleri aşağıdadır: Kapalı formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$, moleköl ağırlığı: 399.4 g/mol'dür.

Eter (Dietil, Eter, Etoksietan)

Dietil eter, kısaca eter ya da etoksietan olarak da bilinir (CAS No: [60-29-7]. Kaynama noktası düşük olup, kendine özgü bir kokusu sahiptir. Çalışmada anestezi madde olarak farelerin servikal dislokasyonundan önce kullanıldı. Dietil eterin bazı özellikleri aşağıda verilmiştir. Etil Eter ve Etil Oksit, Etoksietan, 3- Oksapentan olarak adlandırılmaktadır. Kapalı Formülü, $C_4H_{10}O$ ($C_2H_5OC_2H_5$), Molekül ağırlığı, 74.12 g/mol olarak bilinmektedir.

Glasiyal Asetik Asit

Kromozomal aberasyon testi preparatlarının hazırlanması kullanılan fiksatif solüsyonunda ve ayrıca teratojenik çalışmalarda fetusların boyanması için kullanılan boyanın hazırlanmasında da kullanılmıştır (Merck). Diğer isimleri: Acetyl hydroxide (AcOH), Hydrogen acetate (HAc), Ethylic acid, Methanecarboxylic acid (CAS No: 64-19-7), Kimyasal Formülü, $C_2H_4O_2$, CH_3COOH , Molekül Ağırlığı 60.05 g/mol'dür.

Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak % 0,4'lük KCl (Merck) maddesi kullanıldı. Eriyik bidistile su içinde hazırlanarak ağzı kapalı bir cam kaptaki buzdolabında (+4 °C) stoklandı. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeterli miktarda alınıp, 37 °C'deki inkübatörde ısıtıldıktan sonra kullanıldı.

Fiksatif

Kromozomal aberasyon testi için kullanılan fiksatif, 1 kısım glasiyal asetik asit'in 3 kısım metanol ile karıştırılarak kullanıma hazır hale getirildi. Fiksatifintazeliğini korumak için her çalışmadan 20 dk önce hazırlanarak ± 4 °C saklandı.

Sorensen Tampon (Sorensen Buffer) Çözeltisi

Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup, çalışmanın amacına uygun olarak birbiriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanıldı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında kapalı kaplarda saklandı. Tampon A: 11.34 g KH_2PO_4 250 ml distile su içinde çözdürüldü (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 g Na₂HPO₄.12 H₂O 250 ml distile su içinde çözdürüldü. (pH=9.3).

Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan preparatların boyanması için % 10'luk boya eriyiği halinde hazırlandı. % 10'luk Giemsa boyasının hazırlanışı: 10 ml Tampon A + 10 ml Tampon B + 10 ml Giemsa + 70 ml distile su.

Entellan

Yapıştırıcı özelliğe sahip olan solüsyon (Merck, cat. no. 7961) preparatların uzun yıllar bozulmadan saklanmasını sağlar. Çalışmada sayım yapılacak preparatlar kalıcı bir duruma getirilirken lamel ile lamın yapıştırılmasında kullanıldı.

Metanol (Methanol, Metil Alkol, Karbinol)

Kromozomal aberasyon (KA) testinde preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif solüsyonunda kullanıldı. Burada fiksatif, 1 birim glasiyal asetik asit, 3 birim metanol karışımı şeklinde hazırlanarak kullanıldı.

Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları

Hassas terazi tartım işlemlerinde 0,0001 gr hassasiyetindeki PRECİSA XB 220 A marka terazi kimyasal maddelerin tartılmasında kullanıldı.

Santrifüj

Devir hızı 5000 rpm'e kadar yükselebilen, 15 dk.'lık zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli ELEKTRO-MAG marka santrifüj cihazı kullanıldı.

Mikroskop

Preparat incelemelerinde kullanılan mikroskop fotoğraf makinesi, immersiyon objektifi ve koordinat cetveli olan olympus marka binoküler ışık mikroskobu kullanıldı.

Etüv

Elektro-mag M 420 Bp marka 0 °C - 100 °C'leri arasında ayarlanabilir etüv, deneyde kullanılacak bazı maddelerin 37 °C'ye ısıtılmasında kullanıldı.

Vorteks

Deney tüplerinin karıştırılması için Yellowline marka vorteks kullanıldı.

2.4. Metot

Gruplar

- 1. Grup (negatif kontrol grubu) n=10:** Normal beslenmelerinin yanı sıra, diğer gruptaki farelere yapılan uygulama gibi 24 saatte bir, iki kez çeşme suyu oral gavaj yol ile verildi.
- 2. Grup (250 mg/kg):** Bu gruptaki 10 adet fareye her birinin ağırlıklarına göre toplam 250mg/kg olacak şekilde karabaş kekiği bitki yağı oral gavaj yol ile her 24 saatte bir, iki kez verildi.
- 3. Grup (500 mg/kg):** Bu gruptaki 10 adet fareye her birinin ağırlıklarına göre toplam 500mg/kg olacak şekilde karabaş kekiği uçucu bitki yağı oral gavaj yol ile her 24 saatte bir, iki kez verildi.
- 4. Grup (1000 mg/kg):** Bu gruptaki 10 adet fareye her birinin ağırlıklarına göre toplam 1000mg/kg gelebilecek şekilde karabaş kekiği uçucu bitki yağı oral gavaj yol ile her 24 saatte bir, iki kez verildi.

2.4.1. Kromozomal İnceleme ve Mitotik İndeksin Tespiti

Mitotik aktivite ve kromozomal aberasyon testi için kontrol grubu ve üç farklı doz grubu olmak üzere her grupta 10 adet fare olacak şekilde toplamda 40 adet fare kullanıldı. Farelere oral gavaj yol ile maddeler verilmeden önce tartılıp, vücut ağırlıklarına göre 250, 500 ve 1000 mg/kg karabaş kekiği bitki uçucu yağı, oral gavaj yol ile farelere uygulandı [80]. Bütün gruplardaki farelere 3. günün başlangıcında, ötanazi yapılmadan 2 saat önce 4 mg/kg dozunda kolşisin distile suda çözülerek intraperitoneal yol ile enjekte edildi. Eter ile anestezi edilen hayvanlar, servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülüp, femur kemikleri

çıkartıldı. Çıkarılan femur kemikleri üzerinde bulunan kaslarından iyice temizlendi. İçerisinde 3 ml ftal dana serumu bulunan santrifüj tüpüne enjektör yardımı ile her iki femura ait kemik iliği aktarıldı. Santrifüj tüpü içerisinde her iki femura ait olan kemik iliği numuneleri, 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı. 0.075 M 5 ml KCl solüsyonu çalışma başlamadan önce etüvde 37°C'de, 20 dakika ısıtılmaya bırakıldı. Isıtılan hipotonik çözeltide hücreler, 25-35 dakika inkübe edildi. İnkübe süresi tamamlanan hücreler 1100 rpm'de 10 dakika yeniden santrifüj edilerek çıkan süpernatantlar atıldı. Kemik iliği hücreleri yeni olarak hazırlanan 5ml dolapta bekletilmiş soğuk Carnoy's fiksatif (metanol, glasiyel asetik asit 3:1) içerisinde fikse edilerek, santrifüjlenip, tekrar süpernatant kısımları atıldı. Yapılan fiksasyon işlemi 3 defa tekrarlanarak santrifüj işlemine tabi tutulup her defasında süpernatant kısımları ayırt edildi. En son işlemde tüpün içerisinde 1 ml kalacak Şekilde ayarlandı. Pastör pipeti yardımıyla santrifüj tüpünün içerisinde kalan 1 ml hücreler süspanse edildi. Elde edilen süspansiyon temiz ve nemli lamalar üzerine 4-5 cm yukarıdan damlatılarak yayma işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanan preparatlar mitotik aktivitenin ve kromozomal aberasyonun belirlenmesi için, Preston'a (1987) göre laboratuvar ortamı ve çalışma koşulları dikkate alınarak yapılmıştır [81].

Boyama İşlemi

Santrifüj tüpünde kalan 1 ml'lik kısım lamlara yayıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutuldu. Kuruyan preparatlar önceden hazırlanan %10'luk giemsa ile 10 dakika boyandı. Boyama işlemi sonunda kuruyan preparatlar lamel kullanarak entellan yardımı ile kapatıldı. Hazırlanan daimi preparatlar Olympus CX21 marka ışık mikroskobunda, mitotik aktivite için 1000'lik büyütmede her hayvan örneğinden rastgele 1000 hücre sayıldı. Sayılan hücrelerin içerisinde metafaz safhasında olanların adetleri tespit edilerek, yüzdeleri belirlendi. Kromozomal aberasyonu tespit etmek için elde edilen preparatlardan 100 metafaz incelendi.

2.4.2. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel olarak analiz edilmesi için SPSS22 paket programı ve GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego California USA) kullanıldı. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA Tukey Testi) uygulandı. Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılarak regresyon ve korelasyon katsayısı (r) bulundu ve regresyon doğrusu çizildi [82, 83].



3. BULGULAR

Karabaş kekiği (*Thymbra spicata*)'nin *Mus Musculus* albino fare kemik iliği hücrelerindeki mitotik aktivite üzerine etkisini belirlemek için her biri 10 hayvandan oluşan biri kontrol olmak üzere topla dört grup olarak ayrılmıştır. Kontrol grubundaki hayvanlara distile su 24 saat aralıklarla toplam 2 gün boyunca verildi. Deney gruplarında bulunan hayvanların vücut ağırlıklarına göre 250 mg/kg, 500 mg/kg ve 1000 mg/kg dozlarındaki kekik bitki uçucu yağı oral gavaj yolu ile 24 saatte bir, 2 gün boyunca verildi. 48 saat sonunda disloke edilen farelerden hazırlanan kemik iliği preparatlarında, her hayvana ait preparatlardan rastgele 1000 hücre 48 saatlik etki süresi için sayıldı.

3.1. Kontrol Grubu Farelerde Mitotik Aktivite Değerleri

Kontrol grubundaki hayvanlara distile su 24 saat aralıklarla toplam 2 gün boyunca verildi. Hazırlanan kekik iliği preparatlarında sayım yapılarak mitotik aktivitenin hem grup ortalaması hemde yüzde ortalaması belirlenmiştir. Kontrol grubundan elde edilen mitotik aktivite değerleri Tablo 1 'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kontrol Grubu Sıçanlarda Mitotik Aktivite Oranları

Kontrol grubu				
Örnek no	Toplam hücre sayısı	İnterfaz hücre sayısı	Metafaz hücre sayısı	Metafaz hücre oranı(%)
1	1000	970	30	3
2	1000	971	29	2,9
3	1000	969	31	3,1
4	1000	967	33	3,3
5	1000	970	30	3
6	1000	972	28	2,8
7	1000	971	29	2,9
8	1000	970	30	3
9	1000	968	32	3,2
10	1000	971	29	2,9
Grup Ortalaması			30,1	3,01

3.2. Deney Grubu (250 mg/kg) Farelerde Mitotik Aktivite Değerleri

1.deney grubu olan 250 mg/kg dozundaki kekik bitki uçucu yağı oral gavaj yolu ile 24 saatte bir, 2 gün boyunca verildi. 48 saat sonunda disloke edilen farelerden hazırlanan kemik iliği preparatlarında, her hayvana ait preparatlardan rastgele 1000 hücre 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Metafaz evresindeki hücreler belirlenerek mitotik aktivite tespit edilip Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. 250 mg/kg Karabaş Kekiği Uygulanan Deney Grubu Mitotik Aktivite Oranları

250 mg/kg karabaş kekiği uygulanan deney grubu				
Örnek no	Toplam hücre sayısı	İnterfaz hücre sayısı	Metafaz hücre sayısı	Metafaz hücre oranı (%)
1	1000	973	27	2,7
2	1000	974	26	2,6
3	1000	972	28	2,8
4	1000	970	30	3
5	1000	972	28	2,8
6	1000	974	26	2,6
7	1000	975	25	2,5
8	1000	972	28	2,8
9	1000	974	26	2,6
10	1000	973	27	2,7
Grup Ortalaması			27,1	2,71

3.3. Deney Grubu (500 mg/kg) Farelerde Mitotik Aktivite Değerleri

2.deney grubu olan 500 mg/kg dozundaki kekik bitki uçucu yağı oral gavaj yolu ile 24 saatte bir, 2 gün boyunca verildi. 48 saat sonunda disloke edilen farelerden hazırlanan kemik iliği preparatlarında, her hayvana ait preparatlardan rastgele 1000 hücre 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Metafaz evresindeki hücreler belirlenerek mitotik aktivite tespit edilip Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. 500 mg/kg Karabaş Kekiği Uygulanan Deney Grubu Mitotik Aktivite Oranları

500 mg/kg karabaş kekiği uygulanan deney grubu				
Örnek no	Toplam hücre sayısı	İnterfaz hücre sayısı	Metafaz hücre sayısı	Metafaz hücre oranı(%)
1	1000	977	23	2,3
2	1000	974	26	2,6
3	1000	977	23	2,3
4	1000	975	25	2,5
5	1000	979	21	2,1
6	1000	976	24	2,4
7	1000	979	21	2,1
8	1000	979	21	2,1
9	1000	975	25	2,5
10	1000	978	22	2,2
Grup Ortalaması			23,1	2,31

3.4. Deney Grubu (1000 mg/kg) Farelerde Mitotik Aktivite Değerleri

3.deney grubu olan 250 mg/kg dozundaki kekik bitki uçucu yağı oral gavaj yolu ile 24 saatte bir, 2 gün boyunca verildi. 48 saat sonunda disloke edilen farelerden hazırlanan kemik iliği preparatlarında, her hayvana ait preparatlardan rastgele 1000 hücre 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Metafaz evresindeki hücreler belirlenerek mitotik aktivite tespit edilip Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 1000 mg/kg Karabaş Kekiği Uygulanan Deney Grubu Mitotik Aktivite Oranları

1000 mg/kg karabaş kekiği uygulanan deney grubu				
Örnek no	Toplam hücre sayısı	İnterfaz hücre sayısı	Metafaz hücre sayısı	Metafaz hücre oranı(%)
1	1000	982	18	1,8
2	1000	981	19	1,9
3	1000	985	15	1,5
4	1000	982	18	1,8
5	1000	980	20	2
6	1000	979	21	2,1
7	1000	977	23	2,3
8	1000	980	20	2
9	1000	981	19	1,9
10	1000	982	18	1,8
Grup Ortalaması			19,1	1,91

3.5. Kontrol ve Deney Grubu *Mus musculus albino* Farelerin Kemik İliğinde Mitotik Aktivite Değerlerinin Karşılaştırılması

Karabaş kekiği uçucu yağının fare (*Mus musculus albino*) kemik iliği hücrelerinde mitotik aktivite üzerindeki etkilerinin farklı dozlarda uygulanan deney grupları ve kontrol grubundaki değerleri, grup ortalamaları ve metafaz hücre oranı ortalaması Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Kontrol ve Deney Grupları Arasındaki Mitotik Aktivite Oranlarının Karşılaştırılması

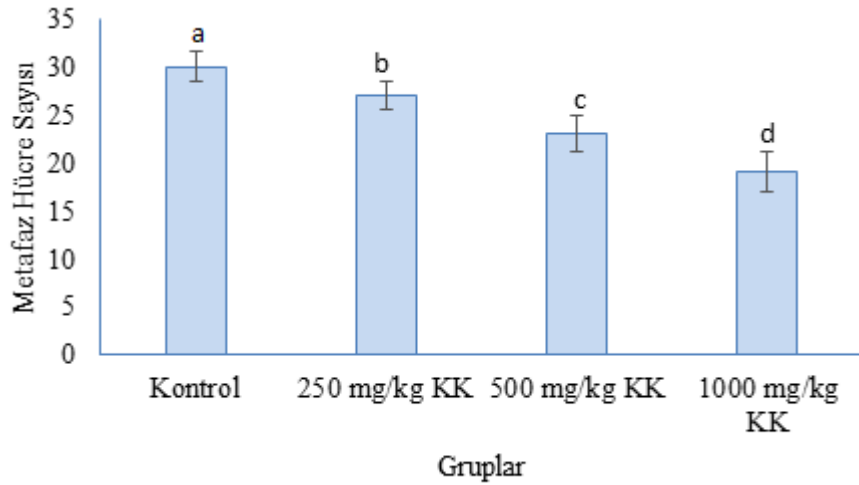
Gruplar	Denek sayısı	Toplam hücre sayısı	İnterfaz hücre sayısı	Metafaz hücre sayısı	Grup ortalaması	Metafaz hücre oranı ortalaması (%)
Kontrol	10	10000	9699	301	30,1	3,01
250 mg/kg Karabaş Kekiği	10	10000	9729	271	27,1	2,71
500 mg/kg Karabaş Kekiği	10	10000	9769	231	23,1	2,31
1000 mg/kg Karabaş Kekiği	10	10000	9809	191	19,1	1,91

Karabaş kekiği bitki uçucu yağının fare kemik iliği hücrelerinde mitotik aktivitesinin belirlenmesinde, kontrol ve deney gruplarında metafaz evresinde olan hücrelerinin grup ortalamaları arasında gözlemlenen farklılığın ortaya konması için gruplar arası farklılığı belirlemek için one-way ANOVA Tukey Testi kullanılmıştır. Kontrol ve deney grupları arasındaki istatistikî sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 14'de gösterilmiştir.

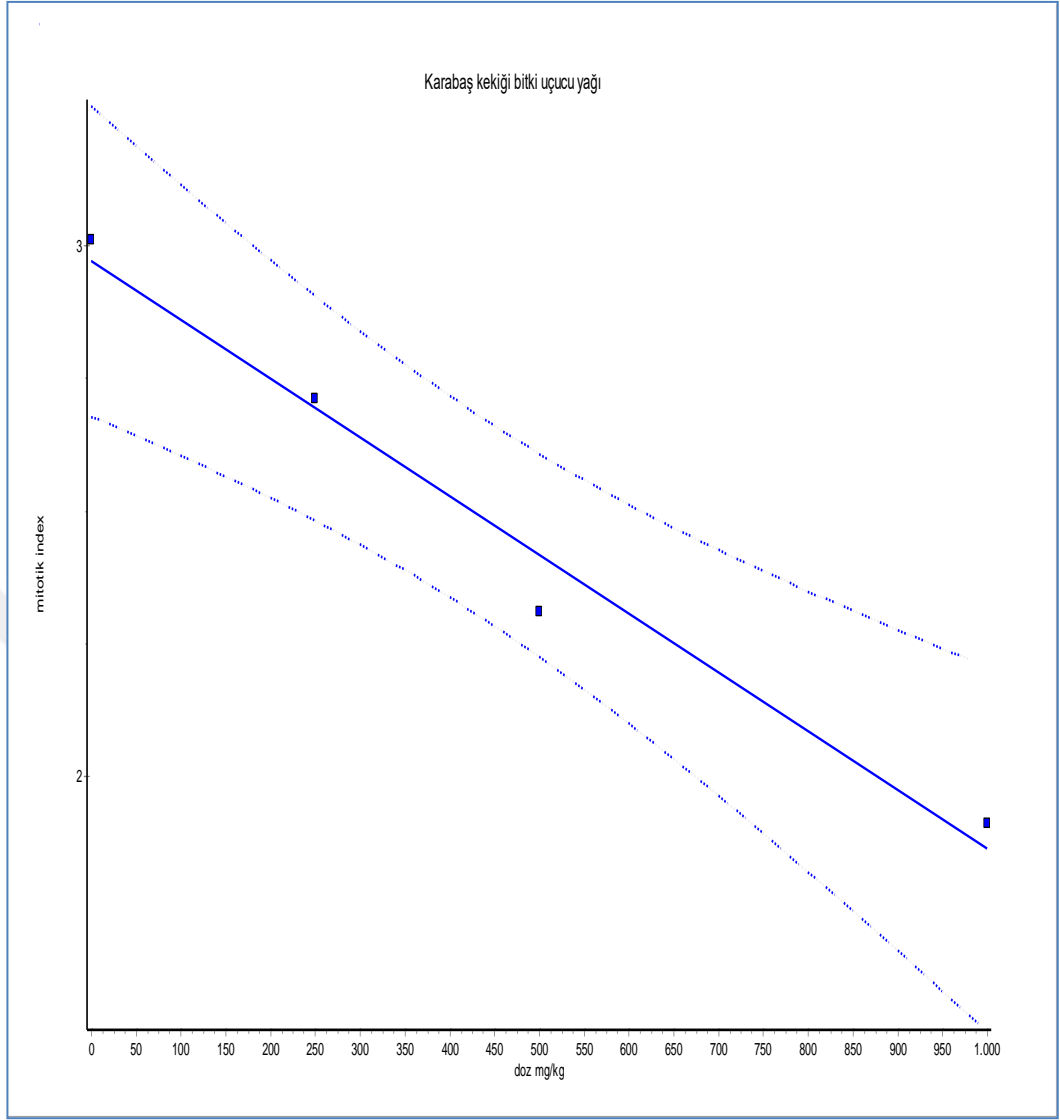
İstatistiksel analizler neticesinde kontrol grubuna göre karabaş kekiği bitki uçucu yağı uygulanan gruplarda mitotik indeksin (metafaz hücre sayılarının) doz artışıyla paralel olarak azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.001$).

Tablo 6. Kontrol Grubu ve Karabaş Kekiği Uygulanan Farelere ait Metafaz Hücre Sayıları

Gruplar	Kontrol n=10	250 mg/kg KK n=10	500 mg/kg KK n=10	1000 mg/kg KK n=10	P Değeri
Metafaz Hücre Sayısı	30.1 ± 1.52 ^a	27.1 ± 1.45 ^b	23.1 ± 1.85 ^c	19.1 ± 2.13 ^d	0,000

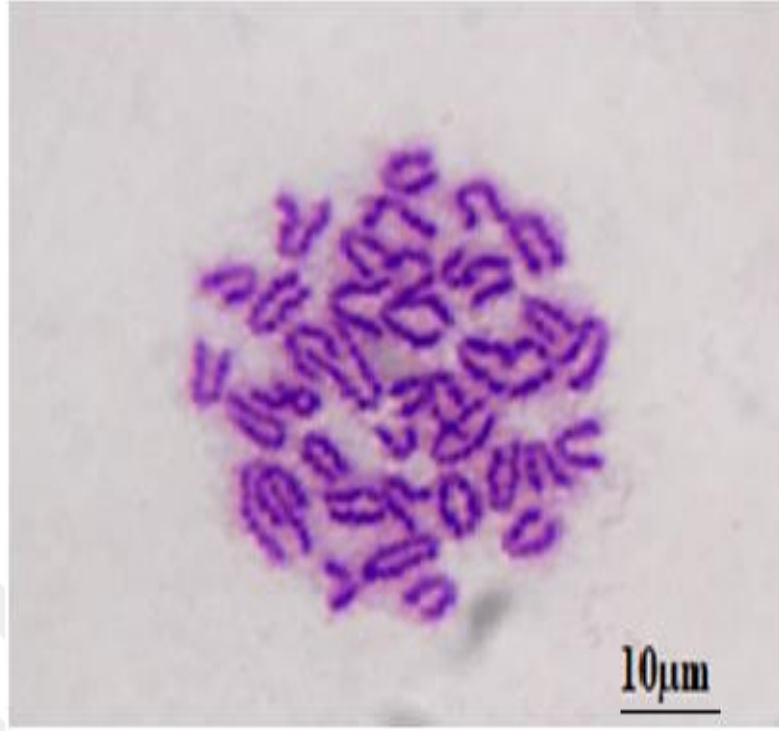


Şekil 14. Kontrol Grubu ve Karabaş Kekiği Uygulanan Farelere ait Metafaz Hücre Sayıları



Şekil 15. Karabaş Kekigi Bitki Uçucu Yağının Farklı Konsantrasyonları ile Mitotik İndeks Arasındaki Regresyon ($r = -0,98$)

Kontrol grubuna ait fare kemik iliği hücrelerinden elde edilen metafaz örneği Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. Kontrol Grubuna ait Metafaz Örneği (n=40)(x1000)

3.6. Kontrol ve Deney Grubu Farelerin Kemik İliğinde Kromozomal Aberasyon Sonuçları

Kontrol grubuyla farklı dozlarda karabaş kekiği bitki uçucu yağı uygulanan gruplar kıyaslandığında 500 mg/kg ve 1000 mg/kg karabaş kekiği uygulanan gruplardaki kromozomal aberasyon sayılarının arttığı tespit edilirken, yalnızca 1000 mg/kg uygulama yapılan gruptaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($P < 0.001$) (Tablo 7, Tablo 8 ve Şekil 17).

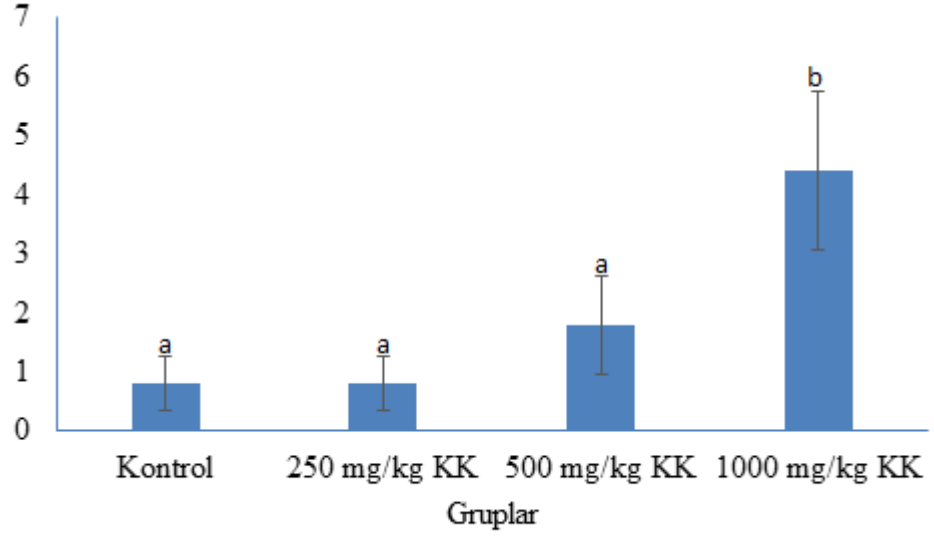
Tablo 7. Kontrol ve Deney Gruplarının Değişik Dozları ile Etkileşime Sokulan Fare Kemik İliği Hücrelerinde Kromozomal Aberasyon Oranları

Gruplar	Muamele süresi	KK	Kk	F	DSK	KKB	Toplam (%)
Kontrol	48	-	1	1	-	-	2
250 mg/kg karabaş kekiği	48	-	1	2	-	1	4
500 mg/kg karabaş kekiği	48	1	2	3	-	3	9
1000 mg/kg karabaş kekiği	48	2	5	8	1	6	22

KK: Kromozom kırıklığı, Kk: Kromatid kırığı, F: Fragment, DSK: Disentrik Kromozom, KKB: Kardeş Kromatid Birleşmesi. Deney gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark önemlidir ($P < 0.001$).

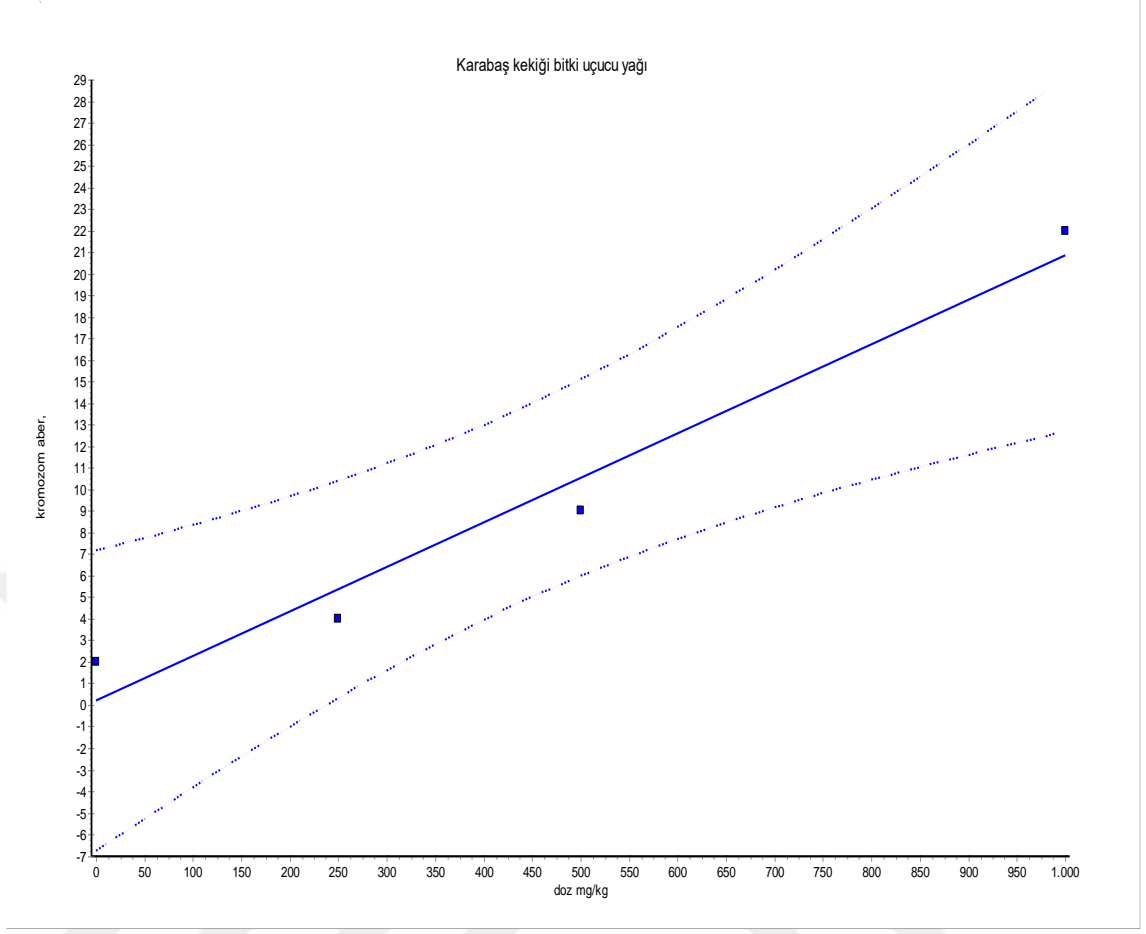
Tablo 8. Kontrol Grubu ve Farklı Dozlarda Karabaş Kekiği Uygulanan Gruplardaki Aberasyon Sayıları

Gruplar	Kontrol n=10	250 mg/kg KK n=10	500 mg/kg KK n=10	1000 mg/kg KK n=10	P Değeri
Aberasyon sayıları	0,8 ± 0,45 ^a	0,8 ± 0,45 ^a	1,8 ± 0,84 ^a	4,4 ± 1,34 ^b	0,000



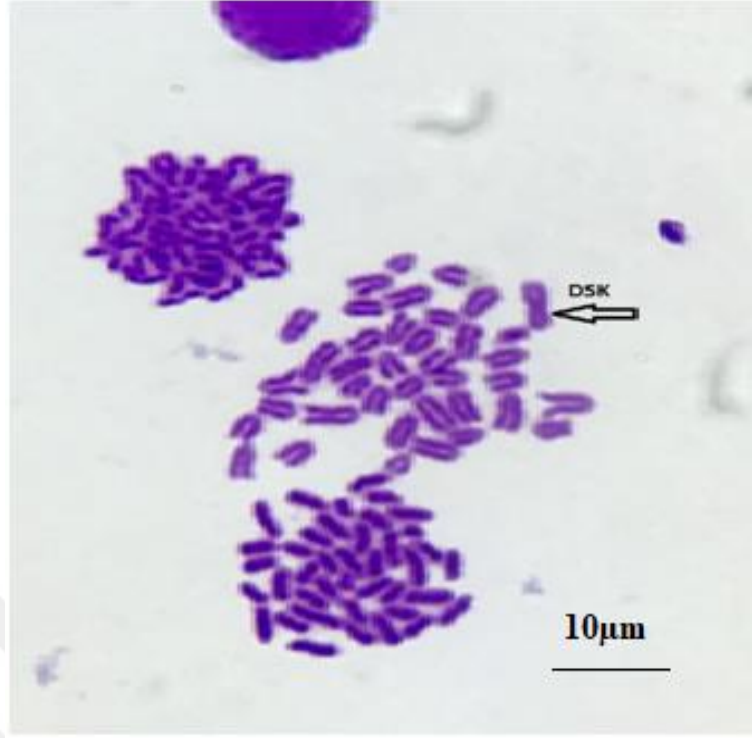
* Farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.

Şekil 17. Kontrol Grubu ve Farklı Dozlarda Karabaş Kekiği Uygulanan Gruplardaki Kromozomal Aberasyon Sayıları

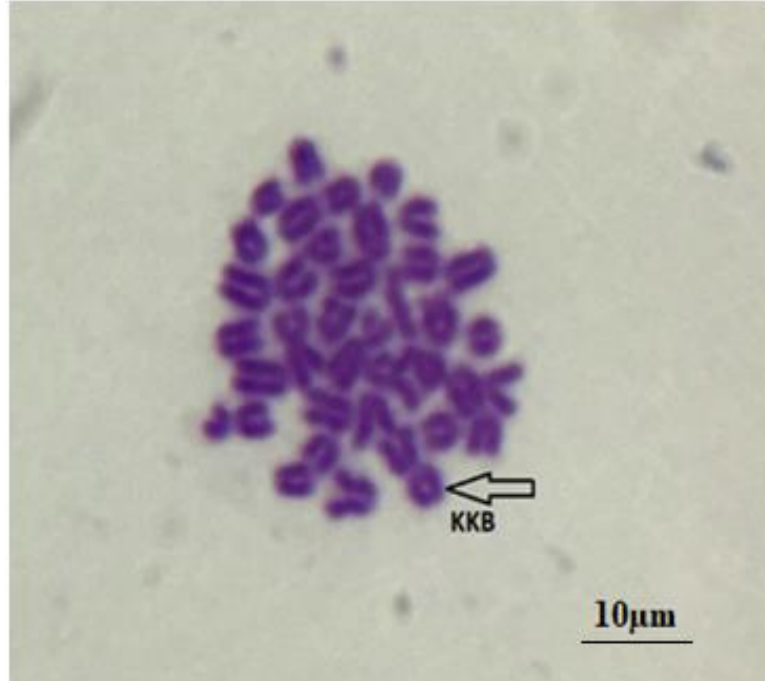


Şekil 18. Karabaş Kekiği Bitki Uçucu Yağının Farklı Konsantrasyonları ile Kromozomal Aberasyon Arasındaki Regresyon ($r= 0,98$)

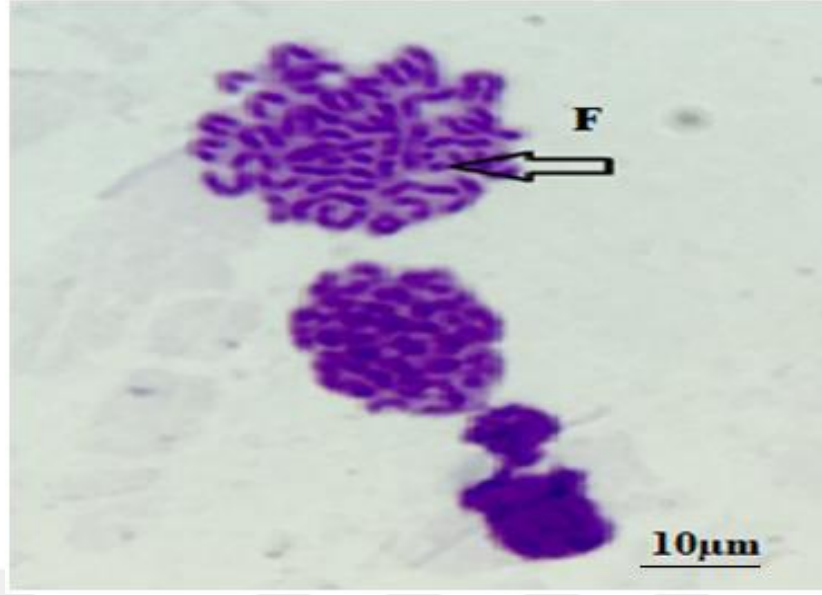
Karabaş kekiği bitki uçucu yağı uygulaması sonucunda fare kemik iliği hücrelerinde kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, disentrik kromozom ve kardeş kromatid birleşmesi gibi kromozomal anomalilere rastlandı. Bu kromozomal anomaliler Tablo 7 ve Tablo 8’de gösterilmiştir.



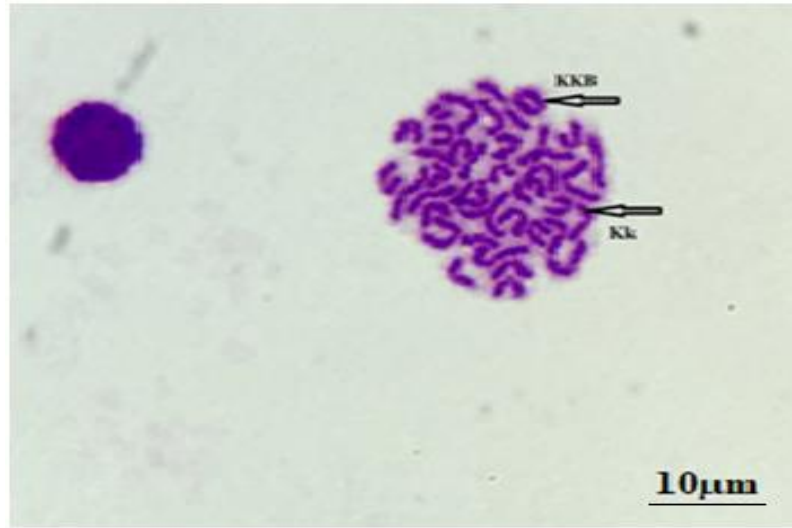
Şekil 19. Disentrik Kromozom (DSK) (1000 mg/kg Kekik)(Gavage Uygulama ♀) (48 Saatlik Muamele) (X1000)



Şekil 20. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB)(500 mg/kg Kekik) (Gavage Uygulama ♀) (48 Saatlik Muamele) (X1000)



Şekil 21. Fragment (F) (250 mg/kg Kekik) (Gavage Uygulama ♀) (48 Saatlik Muamele)
(X1000)



Şekil 22. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) Kromatid Kırığı (Kk) (500 mg/kg Kekik)
(Gavage Uygulama ♀) (48 Saatlik Muamele)(X1000)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya üzerinde canlılar bir etkileşim ve koordinasyon içinde yaşamlarını sürdürmektedirler. Yüzyıllardan beri insanlar çevrelerinde olan bitkiler ile çeşitli tedavi yöntemleri bulmaya çalışmışlardır. Elde edilen bitki örneklerinden yapılan tedavilerin bazıları başarılı bazıları ise başarısız olmuştur. Bundan dolayı bitkilerden tedavi amaçlı kullanım günümüze kadar devam etmektedir. Gerek endemik gerekse diğer bitkiler tedavi amacının yanı sıra beslenmede lezzet, tat ve iştah açıcı olarak tüketilmektedir [1, 2].

Kullanılan bitkilerin olumlu etkileri yanısıra bilinçsiz ve kontrolsüzce kullanılmasında olumsuz etkiler doğuracağı tahmin edilmektedir. Bitkilerin uçucu yağlarının kontrolsüz ve bilinçsiz kullanılmasından genetik materyal üzerine etkisinin olduğu bildirilmiştir [10, 11].

Gıda ve içecek katkı maddesi olarak kullanılan bitki uçucu yağları, temizlik ve kozmetik maddelerinde de genellikle koku verici özelliğinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır. Kullanılan bitki uçucu yağlarının toksisitesi hakkında gerekli ve yeterli bilgi bulunmamaktadır. Esansiyel yağlar olarak bilinen uçucu yağlar ile ilgili çoğunlukla antimikrobiyal etkiler çalışılmıştır. Bu özelliklerinin yanı sıra az da olsa mutajenik, teratojenik ve kanserojenik etkilerinde bulunduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [1, 2, 3, 4].

Son çalışmalar gösteriyorki, DNA üzerindeki hasarlar mutasyonlarla alakalıdır. Bilim insanlarıncı birçok genotoksisite testleri yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar in-vivo veya in-vitro yöntemlerle test edilmiştir. Kimi bitkilerin canlılara faydası olduğunu kimi bitkilerin ise zarar verdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmaya paralel olarak bazı bitki ekstraktlarının da zararlı oldukları yapılan literatür çalışması sonucu bulgulara rastlanmıştır [12, 13].

Günlük yaşamda ilaç olarak kullanılan bitkilerin toksisiteleri ve güvenli kullanımları hakkında Uluslararası Yaşam Bilim Enstitüsü (International Life Sciences Institute, ILSI), Ulusal Araştırma Konseyi ve Tıp Enstitüsü (Institute of Medicine/National Research Council-Amerika), Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (Union of

Pure and Applied Chemistry, IUPAC), Avrupa Birliği Tıp Ajansı (European Medicines Agency) ve Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority, EFSA) bu kuruluşlara benzer uluslararası kuruluşlar insanlara bitkiler hakkında daha iyi ve doğru bilgiler sunmak için birçok bildirme yayınlamaktadırlar [84].

Hollman ve ark. (1996) eşitli bitkilerden sentezlenen flavonoidlerin anti-inflamatuar etkilerinin yanı sıra anti-genotoksik özelliklerinin olduğunu bildirmişlerdir. Fakat çeşitli bitkilerin uçucu yağlarının da insanlarda bazı istenmeyen etkilere ve ölümlere neden olacak kadar zehirli ürünler içerdiklerini de rapor etmişlerdir [85, 86, 87, 88].

Yıldız ve ark (2015) yapmış oldukları çalışmada *T. spicata* ve *C. cyminum* uçucu yağlarının genotoksik ve sitotoksik etkilerinin insan periferel lenfosit kültüründe in-vitro olarak araştırmışlardır. İnsan kan lenfosit hücreleri, *T. spicata* ve *C. cyminum* uçucu yağlarının 0.05µl/ml, 0.10µl/ml, 0.15µl/ml, 0.20µl/ml 'lik dozları ile 24 saat etkileşime bırakılmışlardır. Sonuç olarak *T. spicata* ve *C. cyminum* uçucu yağlarının insan lenfosit kromozomlarında in-vitro klastojenik potansiyeli olduğunu göstermişlerdir [89].

Azırak, S., (2007) yapmış olduğu çalışmada antihelmintik, antiseptik, antifungal, antibakteriyel, antiparazitik ve antiviral olarak kullanılan carvacrol ve thymol'ün sıçan kemik iliği hücrelerinde in vivo genotoksik etkilerini belirlemek için farelerin vucüt ağırlıklarına göre; carvacrol (10, 30, 50 ve 70 mg/kg'lık vucüt ağırlığı) ve thymol (40, 60, 80 ve 100 mg/kg'lık vucüt ağırlığı), kromozom anomaliği (KA) ve toplam KA sayısını genel olarak bütün deneme zamanlarında (6, 12, 24 saat) vermiştir. Sonuç olarak da thymol ve carvacrol in vivo sıçan kemik iliği hücrelerinde ATP üretimini baskıladığından ya da genotoksik etkilerinden dolayı hücre bölünmesini azaltarak, sitotoksik etki meydana getirdiklerini bildirmişlerdir [90].

Yapılan diğer bir çalışmada, Kayraldız ve ark. (2010), *Aloe vera*'nın yapraklarından elde edilen ekstraktın genotoksik ve anti-genotoksik etkileri sıçan kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyon testi, insan lenfositlerinde ise, MN, KKD, KA ve Ames/Salmonella/mikrozom testleri kullanılarak yapılmıştır. Sonuç olarak *Aloe vera* ekstraktı sıçan kemik iliği hücrelerinde uygulanan tüm konsantrasyon ve muamele sürelerinde yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerini önemli derecede uyardığı tespit edilmiştir [91].

Shukla ve ark. (2002), gıda boyası ve baharat olarak kullanılan zerdeçaldan elde edilen sarı pigmentli natürel madde bileşenini, farelere in-vivo yöntemi uygulayarak kromozomal anomalilik testini yapmışlardır. Bu çalışmayı yaparken farelere 7 gün boyunca vücut ağırlıklarına göre 40 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg aralıklar da dozlar verilmiştir. Sonuç olarak fareler de doz aralıklarına göre kromozomal anormaliklerde artışları kromozomal aberasyon testi ile belirlemişlerdir [92].

Lazutka ve ark. (2001), nane ve çam bitkisinden edilen bazı uçucu yağların, SMART test ile genotoksik etkiye sahip olduğu açık bir şekilde gösterilmiştir [93].

Çelik ve ark. (2006), *Thymus kotschyanus var. glabrescens*'in Mitomycin C (MMC)'nin genotoksitesine karşı antijenotoksik etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri ekstraktlar kardeş kromatid değişimini (KKD) (10-2 µl/ml konsantrasyonu hariç) ve kromozom aberasyonlarını (CA) kontrol ve çözücü kontrolle karşılaştırıldığında artırmadığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra bu bitkiden elde edilen ekstrakt kromozomal aberasyonlara neden olan MMC'nin etkisini azaltmış olduğunu bildirmişlerdir. Diğer yandan bitki ekstraktı MMC ile birlikte kardeş kromatid değişimini pozitif kontrolle karşılaştırıldığında önemli derece artırdığını ileri sürmüşlerdir [94].

Phillips ve ark. (1984), maydanoz uçucu yağını yeni doğmuş farelere 4 farklı dozda (0.25, 0.5, 1.0 ve 3.0 µmol) intraperitoneal yolla vermişlerdir. Sonuç olarak yeni doğmuş farelerin karaciğerinde DNA'da adduct (kanserojen olan maddenin DNA'ya bağlanması sonucu oluşan yapı) oluşumuna neden olduğu yani verilen maddenin DNA ipliklerine kovalent olarak bağlandığını belirlenmiştir [95].

Sánchez-Lamar ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada *P. granatum* meyve ekstraktının genotoksitesini farklı in-vitro ve in-vivo deneylerle test etmişlerdir. Mikroorganizmalardaki mikronukleus, kardeş kromatid değişim testleri ve faredeki sperm şekil bozukluğu testi *P. granatum* meyve ekstraktının in-vivo ve in-vitro olarak genotoksik etkisi olduğunu göstermiştir [96].

Bellini ve ark. (2006), kromozomal aberasyon testi kullanarak halk arasında kullanılan *Agaricus blazei* mantar türünün zararlı etki oluşturup oluşturmadığını tespit etmişlerdir.

Çalışma sonucunda kullanılan mantar türünün kromozomal hasarlara sebep olduğunu, dikkatli kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir [97].

Grover ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada böcek öldürücü ilaç olarak kullanılan *anonasquuose* tohum özünü fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal anomali ve mikronükleus testini in-vivo yöntemi ile yapmışlardır. Bu çalışmalarda 75, 150, 300 mg/kg vücut ağırlıklarına göre vermişlerdir. Çalışmanın sonucunda mikronükleus sayısında artış, kromozomal aberasyon yapısında bozukluğa neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Halk arasında dikkatli kullanılması gerektiğini göstermişlerdir [98].

İshidate ve ark. (1984), *coriander* uçucu yağının (kişniş) çin hamster fibroblast hücrelerinde in vitro kromozomal aberasyon testiyle mutajenitesini araştırmışlardır. Farklı dozlar hücelere *coriander* uçucu yağı verilmiştir. Sonuç olarak klastojenik olmadığını tespit etmişlerdir [99].

Hwang ve Kim (2012), yapmış oldukları çalışmada karın rahatsızlıkları için kullanılan *zanthaxylum piperitum* maddesinin fareler üzerinde in-vitro yöntemiyle kromozomal anomali oluşturup oluşturmadığını gözlemlemişlerdir. Farelere 2 gün boyunca 250, 500, 1000 mg/kg vücut ağırlıklarına göre oral yolla vermişlerdir. Farelerin karaciğerleri alınarak incelemişlerdir. Sonuç olarak Kromozomal Anomali bozukluğuna rastlamamışlardır [80].

Şekeroğlu ve Şekeroğlu (2012), yapmış olduğu çalışmada tıbbi ilaç olarak kullanılan *viscum album* maddesinin fareler üzerinde in-vivo yöntem kullanarak Kromozomal Aberasyon bozukluklarını tedavi edip etmediğini araştırmışlardır. Bu çalışmayı yaparken vücut ağırlıklarına göre 10 gün boyunca uygulamışlardır. Mitotik endeks sayılarını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak tıbbi ilaç olarak kullanılan *viscum album* maddesinin farelerde sitotoksitede azalma gözlemlemişlerdir [100].

Muncari ve ark. (2012), yapmış oldukları çalışmada Brezilya halkının tıbbi olarak kullandığı kurt meyvesi olarak adlandırdığı *Solanum lycocapapum* adlı bitkinin insanlar üzerinde genotoksik hasar oluşturup oluşturmadığı için çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada kromozomal anomali testini uygulamışlardır. Farelere bu bitki maddesi verildikten sonra karaciğerleri alınarak incelemişlerdir. İncelene karaciğer hücrelerinde

herhangi bir kromozomal anomali oluşturmadığı hatta tedavi edici özelliği olduğunu tespit etmişlerdir [101].

Aydın ve ark. (2005), kekiğin metanollü ekstraktının genotoksik etkisini insan periferik lenfositlerinde tek hücre jel elektroforezi ile araştırmışlardır. Elde edilen ekstrakt ile DNA üzerindeki koruyucu etkisini de IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline) ve MMC varlığında araştırmışlardır. Kekik yağı ekstraktı düşük dozlarda DNA ipliklerinde herhangi bir kırılmaya neden olmazken yüksek dozlarda DNA'da önemli hasarlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Düşük dozlarda IQ ve MMC'nin neden olduğu DNA hasarlarını azalttığına saptamışlardır [102].

Sonuç olarak; dünya genelinde insanlar tarafından gerek halk tıbbında gerekse günlük baharat olarak kullanılan kekiğin doza bağlı olarak genotoksik etkisinin olduğu görülmektedir. Bu etkiler genellikle yüksek konsantrasyonla birlikte ortaya çıkmaktadır. Karabaş kekiği bitki uçucu yağının kimyasal bileşiminde birçok maddenin olduğu bilinmektedir. Kekik ve bunun gibi baharat olarak kullanılan diğer bitkilerin içeriğinin test edilmesi oldukça önemlidir. İçeriğindeki kimyasal bileşenlerin analiz edilmesi ve ayrı ayrı etki mekanizmalarına ayrıca genotoksik testlere tabi tutularak ortaya çıkan genotoksitenin hangi maddeden kaynaklandığının belirlenmesi hem insanlar hemde bilim için öneme sahiptir. Bu bilgiler ışığında günlük yaşamda çeşitli kullanım alanlarına sahip olan baharatların tüketilmesine dikkat edilmeli, bilinçsiz kullanımların önüne geçilmeli ve kontrollü bir şekilde kullanılmalıdır.

Bu çalışmada karabaş kekiği (*T.spicata*) bitki uçucu yağının üç farklı dozu (250,500 ve 1000 mg/kg) fare kemik iliği hücrelerinde 48 saat muamelesi sonucu; istatistiksel analizler neticesinde kontrol grubuna göre karabaş kekiği bitki uçucu yağı uygulanan gruplarda mitotik indeksin (metafaz hücre sayılarının) doz artışıyla paralel olarak azaldığı tespit edilmiştir ($P<0.001$).

Ayrıca farklı dozlarda karabaş kekiği bitki uçucu yağının kontrol grubuyla kıyaslandığında 500 mg/kg ve 1000 mg/kg karabaş kekiği uygulanan gruplardaki kromozomal aberasyon sayılarının arttığı tespit edilirken, yalnızca 1000 mg/kg uygulama yapılan gruptaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($P<0.001$).

5. KAYNAKLAR

- [1] Gezgın, D. (2006). Bitki Mitosları. 4. Baskı, Sel Yayıncılık, İstanbul, ISBN: 9789755703350.
- [2] Koçyiğit, M. (2005). Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [3] Baytop, T. (1999). Therapy with Medicinal Plants in Turkey Past and Present. Second edition, ISBN: 975-420-021-1 Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- [4] Faydaoğlu, E. and Sürücüoğlu, M. S. (2011). Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. Kastamonu Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi, 11(1): 52 – 67.
- [5] Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., and Guo, Z. (1985). Medicinal plant in therapy. Bulletin of the World Health Organization 63, 965-981.
- [6] Başaran, A. (2012). Ülkemizdeki bitkisel ilaçlar ve ürünlerde yasal durum. Türk Eczacıları Birliği Yayını, Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi, 27-28, 22-26.
- [7] İlçim A., Dığrak, M. ve Bağcı, E. (1998). Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması. Turkish Journal of Biology, 22, 119-125.
- [8] Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N.(2000). Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler), Red Data Book Of Turkish Plants (Pteridophyta And Spermatophyta), ISBN: 975-936110-8, Ankara.
- [9] Aydın, S.(2004). Anadolu Diyagonali: Ekolojik Kesinti Tarihsel-Kültürel bir Farklılığa İşaret edebilir mi?. Kebikeç İnsan Bilimleri İçin Kaynak Araştırmaları Dergisi, 17, 117-137.
- [10] Millard, L. G. (1973). Contact sensitivity to toothpaste. British Medical Journal, 1, 676.

- [11] Shah, M., Lewis, F. M. and Gawkröder, D. J. (1996). Contact allergy in patients with oral symptoms: A study of 47 patients. *American Journal of Contact Dermatitis*, 7(3), 146-151.
- [12] Kramer, P. J. (1998). Genetic Toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50, 395-405.
- [13] 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.
- [14] C.D. Klaassen (2001). *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. (6th ed.), New York, McGraw-Hill Education.
- [15] Tüylü, B. A. (2001). Bazı ilaç öncül maddelerinin mutajenik etkilerinin bakteriyal ve hücre kültürü testleriyle araştırılması. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [16] Savage, J. R. K. (1999). An introduction to chromosomal aberrations. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 3(2), 110-115.
- [17] Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G. and Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1-4), 14-20.
- [18] Tüzün, H. (1986). Türkiye'de Tıbbi Bitkilerin Yetiştirme İmkanları ve Faydaları. VI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 16-19 Mayıs, Ankara.
- [19] Tansı, S. (1991). Karabaş Kekik (*Thymbra spicata* L.)'de Drog Verimi İle Ekolojik, Ontogenetik Ve Morfogenetik Varyabilitenin Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [20] Baser, K.H., Özek, T., Tümen, G. and Sezik, E. (1993). Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance. *Journal of Essential Oil Research*, 5, 619-623.

[21] www.bitek.tubitak.gov.tr/dergi/01/mayis/kekik.pdf (12.12.2017).

[22] Baser, K. H. C. (1995). Essential oils from aromatic plants, which are, used as Herbal Tea in Turkey. "Flavours Fragrances and Essential oils. Proceeding of the 13. International Congress of Flavours Frangrances and Essential oils, October 15-19, İstanbul, Turkey, 67-79.

[23] Kutlular, Ö. (2007). Bazı Adaçayı ve Kekik Türlerinin Uçucu Yağlarının Süper Isıtılmış Su ile Ekstraksiyonları ve GC-MS ile Karakterizasyonları. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.

[24] <http://www.hurriyet.com.tr/sadece-sutculerde-yetisiyor-dunyaya-ihrac-ediliyor-30061180> (12.12.2017).

[25] Başer, K. H. C., Tümen, G., Özek, T ve Kürkçüoğlu, M. (1991). Halk ilacı olarak kullanılan Thymus sibthorpii Benth. IX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 16-19 Mayıs, Eskişehir, 389-395.

[26] Baytop, A. (1983). Farmasötik Botanik, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Dilek Matbaası Yayınları, 3158, İstanbul.

[27] Çavaş, T. (2004). Endüstriyel Atıkların Genotoksik Etkilerinin Mikronukleus Testi ve Agnor Analiz Teknikleri Kullanılarak İn-situ ve Laboratuar Koşulları Altında Araştırılması. Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.

[28] https://www.hekimzade.com/index.php?_route_=hekimzade-blog/karabasi-otu.shtm (12.12.2017).

[29] Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. and Leblebici, E. (2011). Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:116, 9. Baskı, ISBN: 9789754830286, 269.

[30] Demirhan, A. (1974). Mısır Çarşısı Drogları, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Tarihi ve Deontoloji Kürsüsü, İstanbul.

- [31] Lukic, P. B. (1989). Praktikum iz farmakognoziye- hemijsko ispitivanje droga. Beograd, Farmaceutski Fakultet.
- [32] Uluçam, G., Beynek, N. and Seller, Z. (2008). Synthesis, Characterization of Some Transition Metal Complexes of a New Heptadentate N5S2 Schiff Base Ligand and the Effects of These Metal Complexes on U2OS Cells Cytotoxicity and DNA Cleavage Activity. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 183, 2237-2247.
- [33] Aydın, S. (2003), Türkiye’de Satılan Kekik Türleri ve Suları Üzerine Genotoksik Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Ankara.
- [34] Lazutka, J. R., Slapsyte, G., and Dedonyt, V. (2001). Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melenogaster*. Food and Chemical Toxicology, 39, 485-495.
- [35] Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H. L. and von Wringht, A. (1999). Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assay. Food and Chemical Toxicology, 37, 813-823.
- [36] Choy, W. N. (2001). Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker, Inc., 390, New York.
- [37] Vural, N.(2005). Toksikoloji. ISBN: 975-482-289-1, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 115-129.
- [38] Başaran, A., Başaran, N., Güneş, V. H. ve Solak, M. (1997). Tıbbi Biyoloji ve Genetik. ISBN: 975-492-609-3, Açıköğretim Fakültesi Yayınları, No:481.
- [39] Çubukcu, B., Meriçli, A.H., Mat, A., Sarıyar, G., Sütlüpinar, N. ve Meriçli, F. (2002). Fitoterapi yardımcısı ders kitabı, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları no:79, İstanbul, 113-114.
- [40] tip.kocaeli.edu.tr/docs/tibbi_biyoloji/laboratuvarI.doc (14.12.2017).

- [41] Akman, Y. (1998). Bitki Biyolojisine Giriş. Palme Yayıncılık, Ankara.
- [42] Yakar, N. (1987). Sitoloji. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul.
- [43] Connor, J. M. and Ferguson-Smith, M. A. (1993). Essential Medical Genetics, Blackwell Scientific Publication, 4th ed.
- [44] Atlı Şekeroğlu, Z. ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik Toksisite Testleri. TÜBAV Bilim, 4(3), 221-229.
- [45] McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proceedings of the National Academy of Sciences, 72, 5135-5139.
- [46] Mortelmans, K., and Zeiger, E., (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research, 455: 29-60.
- [47] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ames_testi.svg (11.02.2018).
- [48] Östling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 123(11), 291–298.
- [49] Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V. and Kolören, Z. (2011). The in vitro alkaline comet assay in genetic toxicology. Journal of Applied Biological Sciences, 5 (13): 49-54.
- [50] Perry, P. E. and Thompson, E. J. (1984). The methodology of sister chromatid exchanges In: Kilbey B. J., Legator M., Nichols W., Ramel C., eds. Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier Science, Amsterdam, 495–529.
- [51] Wilson, D. M. and Thompson, L. H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid Exchange. Mutation Research, 616, 11–23.
- [52] Topaktaş, M. and Speit, G. (1990). Induction of SCE and CA in human lymphocytes with prometryn. Turkish Journal of Biology, 14, 69-78.

- [53] Topaktaş, M. and Rencüzoğulları, E. (2010). Sitogenetik. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 87-91.
- [54] Demirel, S. ve Zamani, A. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. Genel Tıp Dergisi, 12 (3), 123-27.
- [55] Karaman, A. ve Keskinler, F. (2009). Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda genomik hasar, Türkiye Klinikleri. Journal Medicinal Science, 29 (6), 1392-97.
- [56] Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Temmerman, R. (1990). The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity”, Mutation Research, 244, 95-103.
- [57] Stoper, H. and Müller, O. S. (1997). Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. Toxicology in Vitro, 11: 661-667.
- [58] Anderson, D. (1988). Human Biomonitoring. Mutation Research, 204, 353-541.
- [59] Carrano, A. V. and Natarajan, A. T. (1988). Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. Mutation Research, 204, 379-406.
- [60] Savage, J. R. K. (1993). Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. Environmental and Molecular Mutagenesis. 22, 198- 207.
- [61] Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R. J., Kunudsen, L. E., Barale, R. and Fucic, A. (2006). Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk. Mutation Research, 600 (1-2), 37-45.
- [62] Evans, H. J. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests, In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science, Amsterdam, 405–427.

- [63] Aksu, P.(2012), Akrilamidin İn Vivo ve İn Vitro Genotoksisitesi Üzerine Fenolik Bileşiklerden Pelargonidin ve Gallik Asidin Etkileri. Doktora tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- [64] Pai, C. A. (1985). Foundation of genetics: A science for society. Kefford Pres, Singapur.
- [65] Russel, P. J. (1998). Genetics. The Benjamin- Cummings publishing company, Inc., Canada, USA.
- [66] Sezgin, İ. (1998). Klinik Genetik. Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları No: 70, ISBN.975-7631-42-6, Sivas.
- [67] Erensayın, C. (2000). Genetik. Nobel Yayın Dağıtım Yayın No: 157, ISBN.975591-135-9, Ankara.
- [68] Başaran, N. (1999). Tıbbi Genetik. 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi.
- [69] Rooney, D. E. and Czepulkowski, B. H. (1992). Human Cytogenetics. Second Edition, Oxford University Press.
- [70] Demirsoy, A.(2005). Kalıtım ve Evrim. ISBN.975-7746-01-0, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, Ankara.
- [71] Deviren, A.(2002). Genel genetik. İstanbul Üniversitesi, Rektörlük Yayın No:4344, Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayın No:243, ISBN.975-404-656-5, İstanbul.
- [72] Temizkan, G. O. (1994).Genetik. İstanbul Üniversitesi Yayınları, sayı:3805, 229.
- [73] Tanker, M. and Tanker, N. (1976). Farmakognozi. Cilt II, Reman Matbaası, İstanbul.
- [74] Ceylan, A. (1987). Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler). Ege Üniversitesi Yayınları, Sayı:481, 188.
- [75] Arslan, N. (1987). Kimyon üretimi ve ihracatı. V. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 15-17 Kasım 1984. 167-171, Ankara.

[76] Peter, K.V. (2000). Hanbook of herbs and spices. ISBN: 0 8493-1217-5, Published in North and South America by CRC Press, USA.

[77] <http://www.borosil.com/products/scientificindustrial/laboratoryglassware/distilling-apparatus/> (14.02.2018).

[78] Başer, K. H., Gülbaba, A. G., Azcan, N., Kara, M., Kırırmer, N. and ve Kürkçüoğlu, M. (1998). Türkiye’de yetiştirilen bazı okaliptüs (*eucalyptus*) türlerinin uçucu yağ verim ve bileşimlerinin ve üretim teknolojilerinin belirlenmesi. Orman Bakanlığı Yayın No: 084, DOA Yayın No: 11, ISSSN: 1300-912, Teknik Bülten No:7, Tarsus.

[79] Altundağ, Ş., Aslım, B. (2005). Kekiğin Bazı Bitki Patojeni Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3(7), 11.

[80] Hwang, E. S. and Kim, G. H. (2012). Safety Evaluation Of Zanthoxylum Piperitum-Derived Essential Oil By Assessing Micronucleus Abnormaties Mutagenicity And Chromosomal Aberation. Food Research İnternational, 47, 267-271.

[81] Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987). Mammalian in vivo cytogenetic assays Anaylsis of chromosome aberrations in bone marrow cells. Mutation Research, 189, 157-165.

[82] GraphPad.GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95. GraphPad Software Inc,San Diego, California, USA; 2000.

[83] Kayış, A. (2009). Güvenirlik Analizi. Ş. Kalaycı. (Editör). SPSS Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistik Teknikleri. 4. Baskı. Ankara: Asil Yayın Dağıtım.

[84] Jordan, S. A, Cunningham, D. G, Marles, R. J. (2010). Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. Toxicology and Applied Pharmacology, 243, 198-216.

[85] Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L. and Katan, M. B. (1996). Analysis and Health effects of flavonoids. Food Chemical Toxicology, 57, 43-46.

- [86] Chiang, T. A., Wu, P. F., Wang, L. F., Lee, H., Lee, C. H. and Ko, Y.C. (1997). Mutagenicity and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content of Fumes from Heated Cooking Oils Produced in Taiwan. *Mutation Research*, 381, 157-161.
- [87] Şarer, E., (1991). Uçucu yağların biyolojik etkileri ve tedavi de kullanımları. 9. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı, bildiriler kitapçığı, Eskişehir.
- [88] Leal-cardoso, J. H. and Fonteles, M. C. (1999). Pharmacological Effects of Essential Oils of Plants of the Northeast of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 71, 207-213.
- [89] Yıldız, Y., Gül, S. and Yakan, S. (2015). Investigation of effects of essential oils of Cumin (*cuminum cyminum*) and Wild Thyme (*thymbra spicata*) on human lymphocyte chromosomes. *Eastern Anatolian Journal of Science*, 1(11), 87-97.
- [90] Azırak, S. (2007). Thymol ve Carvacrol'un in Vivo Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [91] Kayraldız, A., Yavuz Kocaman, A., Rencüzoğulları, E., İstifli, E. S., İla, H. B., Topaktaş, M. and Dağlıoğlu, Y. K. (2010). The genotoxic and antigenotoxic effects of Aloe vera leaf extract in vivo and in vitro. *Turkish Journal of Biology*, 34, 235-246.
- [92] Shukla, Y., Arora, A. and Taneja, P. (2002). Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Wistar rats. *Mutation Research*, 515, 197–202.
- [93] Lazutka, J. R., Mierauskiene, J., Slapsyte, G. and Dedonyte, V. (2001). Genotoxicity of Dill (*Anethum graveolens* L.), Peppermint (*Mentha piperita* L.) and Pine (*Pinus sylvestris* L.) Essential Oils in Human Lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 485-492.
- [94] Çelik, M., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, S., Aksoy, H. and Karaman, Ş. (2006). Effects of *Thymus kotschyanus* var. *glabrescens* Boiss. Extract on Mitomycin-C Induced Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in Human Lymphocytes. *Cytotechnology*, 51, 99-104.

- [95] Phillips, D. H, Reddy, M. V. and Randerath, K. (1984). P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and naturally-occurring 58 alkenylbenzenes. II. Newborn male B6C3F1 mice. *Carcinogenesis*, 5(12), 1623-1628.
- [96] Sánchez-Lamar, A., Fonseca, G., Fuentes, J. L., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Perticone, P., Degrassi, F. and De Salvia, R. (2008). Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 416-422.
- [97] Bellini, M. F. (2006). Antigenotoxicity Of Agaricus Blazei Mushroom Organic And Aqueous Extigets İn Chromosomal Aberration And Cytokinesis Block Micro Nucleus Assays İn Cho-K1 And HTC Cells. *Toxicology İn-Vitro*, 20, 355-360.
- [98] Grover P., Singh, S. P., Prabhakar, P. V. and Misra, S. (2009). In-vivo Assesment of Genotoxic effects of Annona Squamosa Seed Extract İn Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1964-1971.
- [99] Ishidate, M., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M. and Matsuoka, A. (1984). Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*, 22, 623-636.
- [100] Şekeroğlu, Z. A. and Şekeroğlu, V. (2012). Effects of *viscum album* L. Extract And Quercetin On Methotrexate-İnduced Cyto-Genotoxicity İn Mouse Bone-Morrow Cell. *Mutation Research*, 746, 56-59.
- [101] Munari, C. C., de Oliveira, P. F., de Souza Lima, I. M., de Paula Lima Martins, S., de Carvalho da Costa, J., Bastos, J. K. and Tavares, D. C. (2012). Evaluation Of Cytotoxic And Antigenotoxic Protential Of Solanum Lycocarpum Fruits Glicoalkaloid Extract İn Vitro Cells. *Food And Chemical Toxiology*, 50, 3696-3701.
- [102] Aydın, S., Başaran, A. A., and Başaran, N. (2005). The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 581(1-2):43-53.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Davut KİŞİOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi: KAĞIZMAN 10.12.1990

Yabancı Dili: İngilizce

İletişim (e-posta): brtcn_dvt@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: G.A.M.P. Endüstir Meslek Lisesi ve Teknik Lisesi

Lisans: Kars Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 2014