



T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**YABAN MERSİNİ (*Vaccinium myrtillus* L.) ve AHUDUDU (*Rubus idaeus* L.)
BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN SIVI EKSTRAKTLARIN İNSAN LENFOSİT
KÜLTÜRÜNDE MITOMİSİN C'YE KARŞI KROMOZOMLAR ve HÜCRE
BÖLÜNME MEKANİZMASI ÜZERİNE ANTİMUTAJENİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Müge MAVİOĞLU KAYA

DOKTORA TEZİ






DANIŞMAN

Prof. Dr. Süleyman GÜL

KARS-2018

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Müge MAVİOĞLU KAYA'nın Prof. Dr. Süleyman GÜL danışmanlığında doktora tezi olarak hazırladığı "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" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy . *birliği* ile kabul edilmiştir.

10/05/2018

	Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr. Süleyman GÜL.	
Üye	: Doç. Dr. Mehmet AKSOY	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Yasak DÜZGÜN	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Tuba OKEN ALLAHVERDİ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Pinar ALI KILIÇ	

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 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

Müge MAVİOĞLU KAYA

Tarih

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
ÖNSÖZ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
RESİMLER DİZİNİ	XV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.1.1. Sekonder Metabolitler	3
1.1.1.1. Fenolik Bileşikler	5
1.1.1.1.1. Fenolik Asitler	6
1.1.1.1.2. Flavonoidler.....	6
1.1.2. Üzümsü Meyveler.....	8
1.1.2.1. Yaban mersini (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	9
1.1.2.1.1. <i>Vaccinium myrtillus</i> L.'nin Fitokimyasal Bileşimi	10
1.1.2.1.2. <i>Vaccinium myrtillus</i> L.'nin Sağlık ve Tarihsel Süreçteki Önemi	11
1.1.2.2. Ahududu (<i>Rubus idaeus</i> L.).....	14
1.1.2.2.1. <i>Rubus idaeus</i> L.'nin Fitokimyasal Bileşimi	16
1.1.2.2.2. <i>Rubus idaeus</i> L.'nin Sağlık ve Tarihsel Süreçteki Önemi.....	17
1.1.3. Hücre Döngüsü	18
1.1.4. Genotoksisite Testleri	20
1.1.4.1. Mikronükleus Testi.....	21

1.1.4.1.1. Mikronükleus Frekansının Hesaplanması	25
1.1.4.2. Mitotik İndeks Testi	27
1.1.4.3. Kromozom Aberasyonları Testi	28
2. MATERYAL ve METOD	31
2.1. Materyal	31
2.1.1. Kullanılan Maddeler ve Çözeltiler	31
2.1.1.1. Mitomisin-C	31
2.1.1.2. Sitokalsin B.....	31
2.1.1.3. Kolşisin.....	32
2.1.1.4. <i>Vaccinium myrtillus</i> L. ve <i>Rubus idaeus</i> L. Ekstraktları	32
2.1.1.5. Kromozom Medyumları	32
2.1.1.6. Hipotonik Çözelti	33
2.1.1.7. Carnoy Fiksatif	33
2.1.1.8. Sorensen Tampon Solüsyonu	33
2.1.1.9. Entellan.....	33
2.1.1.10. Giemsa	34
2.1.1.11. Heparin	34
2.1.2. Kullanılan Laboratuvar Aletleri	34
2.1.2.1. Hassas Terazî.....	34
2.1.2.2. Santrifüj	34
2.1.2.3. Mikroskop.....	34
2.1.2.4. Benmari	35
2.1.2.5. Vorteks	35
2.1.2.6. pH Metre.....	35
2.1.2.7. Etüv.....	35
2.2. Metot	36
2.2.1. Kromozom Aberasyonlarının (KA, Chromosomal Aberration, CA) Tespiti	36
2.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	36
2.2.1.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Olarak Hazırlanması.....	39
2.2.1.3. Mikroskopik İnceleme	39
2.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Belirlenmesi	39

2.2.3. Mikronükleus Testi	40
2.2.3.1. Preparatların Boyanması.....	41
2.2.3.2. Mikroskopik İnceleme	41
2.2.3.3. Nükleus Bölünme İndeksinin Hesaplanması.....	41
2.2.3.4. Nükleer Bölünme Sitotoksite İndeksinin Hesaplanması	42
2.2.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekme	42
2.3. İstatistiksel Analizler.....	42
3. BULGULAR.....	43
3.1. <i>Vaccinium myrtillus</i> L. ve <i>Rubus idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferel lenfosit kültüründe antimitojenik etkileri	43
3.1.1. <i>Vaccinium myrtillus</i> L. ve <i>Rubus idaeus</i> L. ekstraktlarının MMC'ye karşı kromozom aberasyon oranları üzerine antimitojenik etkileri.....	43
3.1.2. <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının MMC'ye karşı mitotik indeks üzerine etkileri.....	46
3.1.3. <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının MMC'ye karşı mikronükleus indeksi üzerine etkileri	48
3.1.4. <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının MMC'ye karşı nükleer bölünme ve nükleer sitotoksik bölünme indeksi üzerine etkileri.....	50
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
5. KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ÖZET

(Doktora Tezi)

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

Müge MAVİOĞLU KAYA

Kafkas Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Süleyman GÜL

Bu çalışmanın amacı, *Vaccinium myrtillus* L. ve *Rubus idaeus* L. sıvı ekstraktlarının *in-vitro* olarak, insan periferik lenfositlerinde antimutajenik etkiye sahip olup olmadıklarını kromozom aberasyonu (KA), mikronukleus (MN) ve mitotik indeks (Mİ) testleri ile belirlemektir. Çalışmada test maddesi olarak *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L.'nin meyve ve yaprak ekstraktları, materyal olarak da sağlıklı 6 bireyden alınan periferik kan örnekleri ile 10 grup oluşturuldu. Negatif kontrol grubu (Grup I) kan örnekleri hiçbir muamele yapılmayan hücre kültürü ortamında, pozitif kontrol grubu (Grup II) kanları ise her kromozom mediumu için 0.3 µg/ml dozunda mitomisin-C (MMC) ilave edilen hücre kültürü ortamında etkileşime bırakıldı. Diğer grupların kan örnekleri hücre kültürüne 0.3 µg MMC/ml ve 0.2 µL /mL, 0.4 µL /mL, 0.8 µL /mL ve 1.6 µL /mL'lik dozlarda *V. myrtillus* L. (Grup III, IV, V ve VI,) ve *R. idaeus* L. (VII, VIII, IX ve X) sıvı ekstraktları bulunacak şekilde 24 saat süre ile etkileşime bırakıldılar. İnkübasyon süresi bitiminde kültür hücreleri kromozom aberasyonları, mitotik, mikronukleus ve nükleer bölünme indeks testleri ile değerlendirildi. Grup II ile karşılaştırıldığında

ekstrakt gruplarında kromozom aberasyonları ve mikronükleus indeksinin azaldığı saptanırken, mitotik, nükleer bölünme ve nükleer sitotoksik bölünme indekslerinin artmış olduğu belirlendi. Sonuç olarak, çalışmada test maddesi olarak *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L.'nin meyve ve yaprak ekstraktlarının çalışılan dozlarda insan periferel lenfosit hücrelerinde antimitojenik etkilere sahip olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Vaccinium myrtillus* L., *Rubus idaeus* L., kromozom aberasyonu, mitotik indeks, mikronükleus indeksi, antimitojenite.

2018, 81 Sayfa

ABSTRACT

(Ph. D. Thesis)

The Investigation of the Antimutagenic Effects on Chromosomes and Cell Division Mechanisms Against Mitomycine C in Human Lymphocyte Culture of Liquid Extracts Obtained from Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Raspberry (*Rubus idaeus* L.)

Müge MAVIOĞLU KAYA

Kafkas University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Süleyman GÜL

The present study was designed to determine in vitro whether *Vaccinium myrtillus* L. and *Rubus idaeus* L. fluid extracts have antimutagenic effects in human peripheral lymphocytes by means of chromosome aberration (KA), micronucleus (MN) and mitotic index (MI) tests. In the study, 10 groups were formed with peripheral blood samples taken from 6 healthy individuals as a material. Fruit and leaf mixture extracts of *V. myrtillus* L. and *Rubus idaeus* L. were used as the test substance. Blood samples of the negative control group (Group I) were allowed to react in a cell culture medium without any treatment, while positive control group (Group II) was allowed to interact in a cell culture medium supplemented with mitomycin-C (MMC) at a dose of 0.3 µL /mL for each chromosome medium. Blood samples of the other groups were allowed to react for 24 hours with 0.3 µL /mL MMC and *Vaccinium. myrtillus* L. (Group III, IV, V and VI), and *Rubus idaeus* L. (VII, VIII, IX and X) extracts in 0.2 µL /mL, 0.4 µL /mL, 0.8 µL /mL and 1.6 µL /mL doses for each of cell cultures. At the end of the incubation period, culture cells were evaluated by chromosomal aberrations, mitotic, micronucleus and nuclear division index tests. Compared with Group II, it was determined that

mitotic, nuclear division and nuclear cytotoxic cleavage indices were increased when chromosome aberrations and micronucleus indexes were decreased in extract groups. As a result, it was concluded that the fruit and leaf extracts of *V. myrtillus* L. and *Rubus idaeus* L. as test substances in the study had antimutagenic effects on the human peripheral lymphocyte cells at the working doses.

Key Words: *Vaccinium myrtillus* L., *Rubus idaeus* L., chromosome aberration, mitotic index, micronucleus index, antimutagenicity.

2018, 81 pages



ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarım esnasında bana rehber olan, öğrencisi olmaktan her daim gurur duyduğum sayın danışman hocam Prof. Dr. Süleyman GÜL'e, sitogenetik laboratuvarında birlikte çalıştığım, en stresli ve yoğun anlarımda yanımda olan Sübhan ÖZÇAĞDAVUL'a, varoluş sebeplerim, canım annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca varlığıyla kendimi her zaman güvende hissettiğim biricik eşim Doç. Dr. İnan KAYA ve yaşamımdaki en özel projelerim olan canım yavrularım Melisa ve Doğa'ya hayatıma kattıkları anlam ve değer için sonsuz teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KA	: Kromozom aberasyonu
MN	: Mikronükleus
Mİ	: Mitotik indeks
DNA	: Deoksiribonükleik asit
UV-B	: Ultra viyole-B ışını
HCT-116	: İnsan kolon kanseri hücreleri
HL-60	: İnsan lösemi hücreleri
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MCF-7	: İnsan göğüs kanser hücreleri
CaCo-2	: İnsan kolon kanser hücreleri
HeLa	: İnsan servikal kanser hücreleri
FAK	: Fokal adezyon kinaz
ERK	: Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz
MMP-2	: Matriks metalloproteinaz-2
mRNA	: Messenger ribonükleik asit
G₁-S-G₂	: Hücre siklusunda interfaz
Cyt-B	: Sitokalazin-B
CBMN	: Sitokinezi bloklanmış mikronükleus
NBİ	: Nükleer Bölünme İndeksi
NSBİ	: Nükleer Bölünme Sitotoksite İndeksi
MMC	: Mitomisin-C

KCl	: Potasyum klorid
°C	: Santigrad derece
Ap	: Apoptotik hücre
Nec	: Nekrotik hücre
AHS	: Apoptotik hücre sayısı
NHS	: Nekrotik hücre sayısı
SEM	: Ortalamanın standart sapması,
µL /mL	: Mikrolitre/mililitre
HEp2	: İnsan laringeal karsinom hücreleri
SW480	: İnsan kolon adenokarsinom hücreleri
KH₂PO₄	: Monobazik potasyum fosfat
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
pH	: H ⁺ iyonu konsantrasyonunun (-) logaritması

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferal lenfosit kültürü kromozomlarında aberasyon oranları üzerine etkileri ...	44
Tablo 2. <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferal lenfosit kültüründe mitotik indeks üzerine etkileri	46
Tablo 3. <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferal lenfosit kültüründe mikronükleus indeksi üzerine etkileri.....	49
Tablo 4. <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferal lenfosit kültüründe nükleer bölünme ve nükleer sitotoksik bölünme indeksi üzerine etkileri	51
Tablo 5. İnsan periferal lenfosit kültüründe <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri.....	52
Tablo 5 (Devam). İnsan periferal lenfosit kültüründe <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri.....	53
Tablo 5 (Devam). İnsan periferal lenfosit kültüründe <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri.....	54
Tablo 5 (Devam). İnsan periferal lenfosit kültüründe <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri.....	55
Tablo 5 (Devam). İnsan periferal lenfosit kültüründe <i>V. myrtillus</i> L. ve <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Bitkilerde primer ve sekonder metabolizma arasındaki ilişkiler (Morris 1997)..4	
Şekil 2. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri	6
Şekil 3. Flavonoidler.....	7
Şekil 4. Türkiye’de <i>Vaccinium myrtillus</i> ’un yayılış alanı	12
Şekil 5. Hücre döngüsü (Cabadak, 2008)	19
Şekil 6. Genotoksitesitesi olan faktörlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları	21
Şekil 7. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN’ler (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a).....	23
Şekil 8. Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a)	23
Şekil 9. Sitokinezi bloklanmış MN yöntemi ile bazı sitogenetik bozuklukların analizi (Aardema ve Kirsch-Volders 2001; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a).....	25
Şekil 10. Kromozomal aberasyonlar (Huret ve ark., 2003)	29
Şekil 11. Kromatid tipi aberasyonlar (Huret ve ark., 2003).....	29
Şekil 12. <i>V. myrtillus</i> L. ekstraktlarının farklı dozları ile birlikte 0.3 µg/mL MMC uygulanmış insan periferel lenfosit kültürü kromozom aberasyon oranları arasındaki regresyon.....	45
Şekil 13. <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozları ile birlikte 0.3 µg/mL MMC uygulanmış insan periferel lenfosit kültürü kromozom aberasyon oranları arasındaki regresyon.....	45
Şekil 14. Doz belirleme aşamasında <i>V. myrtillus</i> L. ekstraktlarının farklı dozları ile birlikte 0.3 µg/mL MMC uygulanmış insan periferel lenfosit kültüründe mitotik indeks değerleri.....	47
Şekil 15. Doz belirleme aşamasında <i>R. idaeus</i> L. ekstraktlarının farklı dozları ile birlikte 0.3 µg/mL MMC uygulanmış insan periferel lenfosit kültüründe mitotik indeks değerleri.....	47

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. <i>Vaccinium myrtillus</i> L.	10
Resim 2. <i>Rubus idaeus</i> L.	16
Resim 3. MMC (0.3 µg/mL; pozitif kontrol) grubunda yoğun asentrik kromozomlar ve kromatid ayrılması (a), resiplokal translokasyon (b), kromatid kırığı (c) ve ring kromozom (d) (X1000).	57
Resim 4. <i>V. myrtillus</i> ekstraktı (0,2 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferal lenfosit hücre kültüründe resiplokal translokasyon (a), kromozom kırığı (b), kromatid kırığı (c) ve fragment (d) (X1000).	57
Resim 5. <i>V. myrtillus</i> ekstraktı (0,4 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferal lenfosit hücre kültüründe kromatid birleşmesi (a) ve kromatid kırığı (b) (X1000).	58
Resim 6. <i>V. myrtillus</i> ekstraktı (0,8 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferal lenfosit hücre kültüründe kromozom kırığı (a), resiplokal translokasyon (b) ve kromatid kırığı (c) (X1000).	58
Resim 7. <i>R. idaeus</i> ekstraktı (0,2 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferal lenfosit hücre kültüründe asentrik ve disentrik kromozomlar (a ve b), kromozom kırığı (c) ve kromatid ayrılması (d) (X1000).	59
Resim 8. <i>R. idaeus</i> ekstraktı (0,4 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferal lenfosit hücre kültüründe disentrik kromozom (a) ve fragment (b) (X1000)...	59
Resim 9. <i>R. idaeus</i> ekstraktı (0,4 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferal lenfosit hücre kültüründe resiplokal translokasyon (a) ve kromatid kırığı (b) (X1000).	60
Resim 10. İnsan periferal lenfosit hücre kültüründe nekrotik hücreler (X1000).....	60
Resim 11. İnsan periferal lenfosit hücre kültüründe apoptoza giden bir hücre (X1000)	61
Resim 12. İnsan periferal lenfosit hücre kültüründe nükleoplazmik köprü (X1000).....	61
Resim 13. İnsan periferal lenfosit hücre kültüründe mikronükleus (X1000)	62
Resim 14. İnsan periferal lenfosit hücre kültüründe iki çekirdekli hücrede üç mikronükleus (X1000).	62

Resim 15. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe nükleuslar arası nükleoplazmik köprüler (X1000).....	63
Resim 16. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe 3 nükleus içeren bir hücre (X1000).	63
Resim 17. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe 4 nükleus içeren bir hücre (X1000).	64
Resim 18. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe çift çekirdekli hücrede iki mikronükleus (X1000).	64



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde gelişmiş ülkeler, dünya çapında meydana gelebilecek iklim değişikliklerinin sosyo-ekonomik etkileri hakkında varsayımlar üretmekte, ulusal ve uluslararası tarım ve sağlık politikalarını bu olası durumlara göre düzenlemekte ve bu amaçla da daha kaliteli gıda ve ilaç geliştirme tekniklerini araştırıp kullanmaktadırlar. Genel sağlık durumlarının korunması üzerine olumlu etkileri olan doğal ürünlerin ve tıbbi bitkilerin bilinçli veya bilinçsiz kullanımı kolay erişilebilir ve ekonomik olması nedenleriyle giderek daha fazla tercih edilmektedir (Saldamlı, 2007; Nizamlıoğlu ve Sebahattin 2010).

Doğal olmaları nedeniyle tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen droglar veya bitki ekstraktları mutajenik veya kanserojenik olayları yönlendirme çalışmalarında her geçen gün daha fazla değerlendirilmektedir. Halk tarafından yaygın olarak kullanılan bitkilerin veya bitkisel ürünlerin hücrelerdeki kalıtsal materyaller üzerine bir etkiye sahip olup olmadığının ve bu etkilerin derecesinin belirlenmesi beslenme, sağlık ve sürdürülebilir bitki yetiştiriciliği gibi pek çok alanda büyük öneme sahiptir. Tıbbi ve aromatik bitkilerdeki ilaç hammaddelerinin kalıtsal materyal üzerine etkilerinin açığa çıkarılması için bitki ekstraktları hazırlanarak genotoksisite testlerine tabi tutulmaktadır. Genotoksisite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin kalıtsal materyale zararlı etkilerinin olup olmadığının belirlenmesinde kardeş kromatid değişimi (KKD, Sister Chromatid Exchange), kromozom aberasyonu (Chromosome Aberration=CA), mikronükleus (MN) ve mitotik indeks (MI) testi gibi hücre bölünmesi ve kalıtsal materyalle ilgili metodlar kullanılmaktadır (Tucker ve ark., 1993; Fenech ve ark., 1999; Fenech, 2000; Hagmar ve ark., 2004). *İn-vitro* kromozom hatası testleri için hücre hatları, hücre soyları veya primer hücre kültürleri kullanılabilir. Kullanılacak hücreler; kültürde büyütülebilirliği, karyotip kararlılığı, kromozom sayısı, kromozom farklılığı ve kromozom hatalarının kendiliğinden ortaya çıkan frekansı gibi özellikler dikkate

alınarak seçilmektedir. İnsan periferik lenfosit hücreleri bu testler için sıklıkla kullanılmaktadır (Tucker ve ark., 1993; Hagmar ve ark., 2004; Bonassi ve ark., 2006).

Meyve ve sebzelerde bulunan flavonoidlerden antosiyaninler parlak kırmızı ve mor rengin oluşmasına sebep olurlar. Olgunlaşan yaban mersini ve ahududu meyvelerinde de bu renkler çok yoğun görülmektedir. Bugüne kadar doğal olarak 635'ten fazla, altı ortak aglikon ve glikozilasyon ve açılasyonun çeşitli tiplerini içeren antosiyanin ailesi tanımlanmıştır. Birçok hücre tipi çalışmasına, hayvan modellerine ve insan klinik deneylerine dayalı olarak antosiyaninlerin potansiyel antioksidan özellikleriyle ilişkili olarak antienflamatuar, antikarsinogenik, kardiyovasküler hastalık koruyucusu, obezite kontrolü ve diyabetle mücadele edebilme özelliklerine sahip olduğu belirtilmiştir (Burdulis ve ark., 2008; Krauze-Baranowska ve ark., 2014a; He ve Giusti, 2010).

Bitkisel ürünlerin sağlığa yararlı etkilerinin çoğunun içeriklerindeki antioksidan etkili ve sekonder metabolitler olan fenolik yapıdaki bileşiklerden ileri geldiği belirtilmektedir. Fenolik yapıdaki doğal maddelerin insan sağlığına olası yararlı ve zararlı etkileri hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmakla birlikte bu bileşiklerin sitotoksikite ve genotoksikite üzerine olan etkilerinin bilinmesi sentetik ve doğal maddelere karşı olan tutumu değiştirecektir. Yaban mersini (*Vaccinium myrtillus*) ve ahududu (*Rubus idaeus L.*) bitkilerinin içeriğinde bulunan yoğun mineral ve vitamin konsantrasyonlarına ilaveten doğal fenolik asit veya antosiyaninler gibi önemli etken maddelerinden dolayı bu bitkilerin antimikrobiyal, antienflamatuar ve antioksidan potansiyeli gibi özellikleri ile ilgili oldukça fazla sayıda çalışma olduğu da dikkat çekmektedir (Wang ve ark., 2008; Burdulis 2008; He ve Giusti, 2010; Krauze-Baranowska, 2014a). Yapılan literatür taramalarında Türkiye'de doğal olarak yetişen ve önemli etken maddeleri bünyelerinde bulunduran yaban mersini ve ahududu bitki ekstraktlarının kalıtsal materyalden oluşan kromozomlar üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanamamaktadır.

Bu çalışmada, özellikle Türkiye'nin kuzey kesimlerinde ve Kars civarında doğal olarak yetişen ve tıbbi aromatik bitkiler sınıfında bir fark oluşturma potansiyeline sahip olduğu

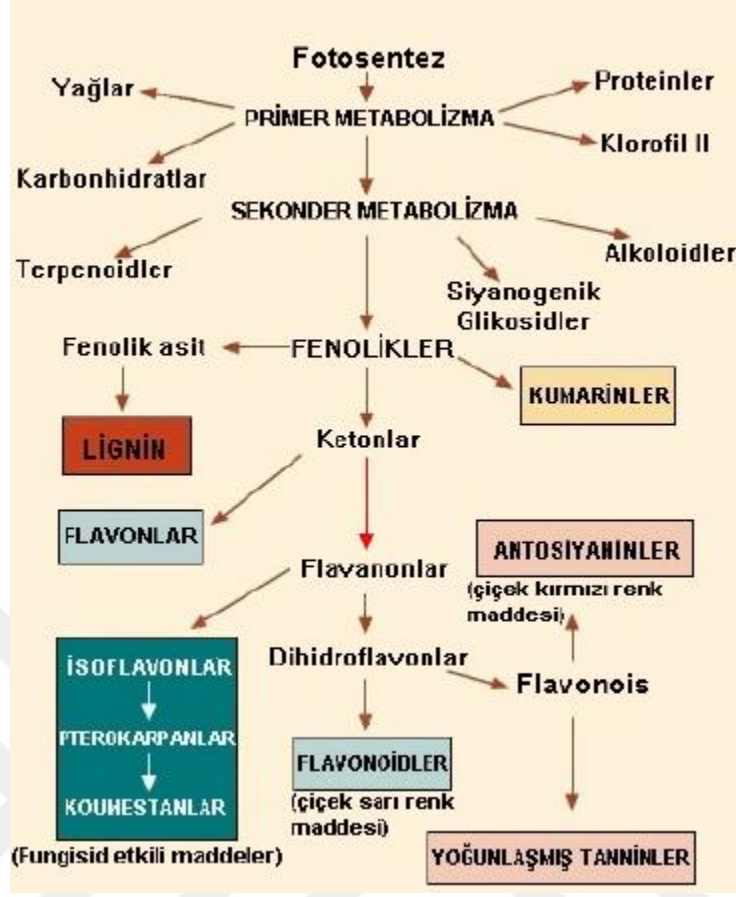
düşünülen *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. bitki ekstraktlarının kromozom, kromatid ve mitotik bölünme üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

1.1.1. Sekonder Metabolitler

Bitkilerde bulunan kimyasal bileşenler genel olarak primer ve sekonder metabolitler (nükleik asit ve proteinler bu sınıflamaya dahil değildir) olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Karbonhidrat, lipit ve protein gibi primer metabolitler doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve yüksek bitkilerin tohum ile vejetatif dokularında yoğunlardır. Primer metabolitler, hücrelerde metabolik reaksiyonlardaki işlevleri nedeniyle bitkilerin fizyolojik durumlarının devamlılığını sağlamaktadırlar.

Sekonder metabolitler biyosentezle primer metabolitlerden oluşturulmaktadır (Şekil 1) (Morris ve Robbins, 1997). Sekonder metabolitlerin primer metabolit reaksiyonları üzerine etkileri tam belirgin değildir. Genelde çevresel koşullara uyum, üreme için tozlaşmada, zararlılara karşı kimyasal savunma, yaşam ortamında baskınlık kurma gibi fonksiyonları taşıdıkları ileri sürülmektedir. Sekonder metabolitler bitkilerde oldukça düşük miktarlarda ve değişik büyüme fazlarında özelleşmiş hücreler tarafından sentezlenirler ve bu nedenle izolasyonları güç olmaktadır. Bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin fonksiyonları net olmasa da genel olarak rolleri aşağıda açıklandığı şekilde sıralanmaktadır (Vanisree ve ark., 2004; Lila, 2005; Oskay, 2009);

- Bitkiye zararlılara karşı kimyasal savunma sağlaması ve yaşam alanında rekabet gücünün artırılması
- Üreme için tozlaşmayı sağlayacak böcek ve kuş gibi canlıların çekilmesi, simbiyotik davranışın desteklenmesi
- Bitkiyi ultravyole ışın, sıcaklık ve su stresi gibi abiyotik stres etmenlerine karşı korunması
- Hücresel seviyede genetik mekanizmaların ilerlemesi



Şekil 1. Bitkilerde primer ve sekonder metabolizma arasındaki ilişkiler (Morris ve Robbins, 1997)

Sekonder metabolitler bitkilerde çok farklı fonksiyonlara sahip olup, patojenlerle mücadeledeki etkileri antimikrobiyal madde, herbivorlara karşı nörotoksik, sakınleştirici, kas gevşetici olarak veya anestetik ilaçların üretiminde kullanılmakta, bazılarının ise ligand, hormon, sinyal transdüksiyon molekülleri veya nörotransmitter maddelere benzer olması nedeniyle sinir sistemi ve endokrin sistemde etkili olan ilaçların üretiminde kullanıldıkları bildirilmektedir (Osbourn, 1996; Theis ve Lerdau, 2003; Makkar ve ark., 2007).

Sapogenin, glikosid, atropin, hyosiyamin ve skopolamin, kokain, kolsişin, kodein, morfin, fisostigmin, pilokarpin, quinin, quinidin, reserpin ve d-tubokurarin gibi steroid ve alkaloidler genellikle ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Diğer bitki sekonder metabolitlerinden az oranlarda ilaç çalışmalarında ve biyokimyasal mekanizmalarda

yararlanılmaktadır (Vanisree ve ark., 2004; Makkar ve ark., 2007). Hücre kültürleri sekonder metabolitlerin daha hızlı ve çok miktarda üretilebilmesine olanak sağladığından günümüzde bu amaçla kullanılmaktadır. Bitki veya embriyonun besiyerinde geliştirilmesi, elverişli dokudan kallus oluşması, kallusların sıvı besiyerinde gelişerek hücre süspansiyon kültürlerinin sağlanması biçiminde sekonder metabolitlerin çoğaltımı yapılmaktadır (Lila, 2005; Oskayve Oskay, 2009).

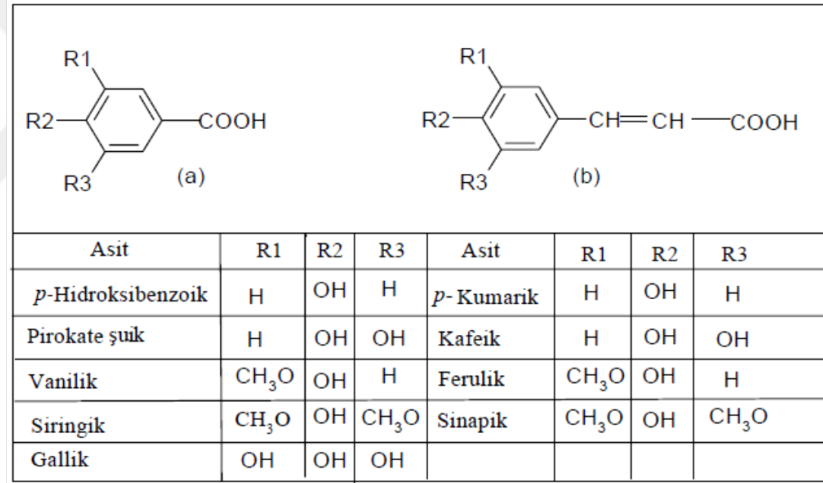
1.1.1.1. Fenolik Bileşikler

Bitkilerin bünyesinde sekonder metabolitler olarak belirtilen fenolik bileşikler tohum, gövde, çiçek, meyve veya yapraklarda en çok bulunan maddeler olup, her geçen gün yeni fenolik bileşikler tanımlanmaktadır (Nizamlıoğlu ve Sebahattin 2010; Åkerström, 2010). Yapısal olarak 8000'den fazla farklı tipte fenolik bileşik tanımlanmış olmakla birlikte bitkilerde bulunan fenolik bileşikler genel olarak iki gruba ayrılabilir. Bunlar; fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Fenolik bileşikler biyolojik olarak aktif ve genellikle toksik bileşiklerdir. Glikozit oluşturma prosesi bitkilerde fenolik bileşikleri toksik olmayan bir şekilde depolama şeklidir (Åkerström, 2010).

Fenolik bileşiklerin bazıları meyve ve sebzelerde lezzet algısının sağlanmasında özellikle acılık veya burukluk gibi tat unsurları bakımından önemlidirler. Bazıları da meyve ve sebzelerde değişik tonlarda renklerin kaynağıdır. Meyve ve sebzelerin işlenmeleri esnasında bu bileşiklerin enzimatik esmerleşme gibi değişik sorunlara neden olduğu ve bunun değişik yeni ürünler için oldukça önem gerektirdiği bildirilmektedir (Nizamlıoğlu ve Sebahattin 2010). Özellikle meyvelere bünyelerindeki yoğun ve genel sağlık durumu için yararlı fenolik bileşiklerden dolayı fonksiyonel gıda olarak önem verilmektedir. Fenolik bileşikler permeabilite faktörü ya da P vitamini adıyla da tanımlanmaktadır. Enzim inaktivasyonuna yol açma ve farklı besin kaynaklarında kalite kontrol ölçütü olarak değerlendirilmeleri de ayrıca önemlidir (Saldamlı, 2007; Nizamlıoğlu ve Sebahattin 2010).

1.1.1.1.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, hidroksibenzoik ve hidroksisünamik asit veya türevleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Hidroksibenzoik asitlerin genel kimyasal yapısını C₆-C₁ fenilmetan oluşturmaktadır olup, bitkisel besin kaynaklarında genel olarak eser miktarlardadırlar. Bu asitler gallik asit, salisilik asit, vanilik asit veya m-hidroksibenzoik asit gibi bileşiklerdir. Hidroksisünamik asitlerin genel kimyasal yapısını ise C₆-C₃ fenilpropan oluşturmaktadır. Fenilpropan halkasının OH bağlanma bölgesi bu asitlerin farklı özelliklerinden sorumlu tutulmaktadır. Kafeik asit, kumarik asit ve ferulik asitler yaygın bulunan hidroksisünamik asit grubu bileşiklerdir. Bitkide glikozillenmiş ve organik asitlerle esterleşmiş formlarda bulunmaktadır (Şekil 2) (Balasundram ve ark., 2006; Shadidi ve Nacz 1995; Nizamlioğlu ve Sebahattin 2010).

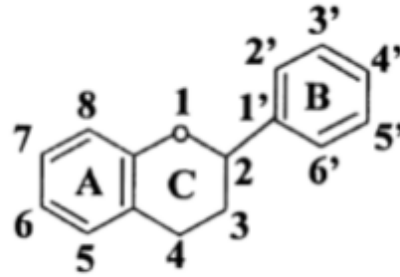


Şekil 2. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sünamik asit türevleri

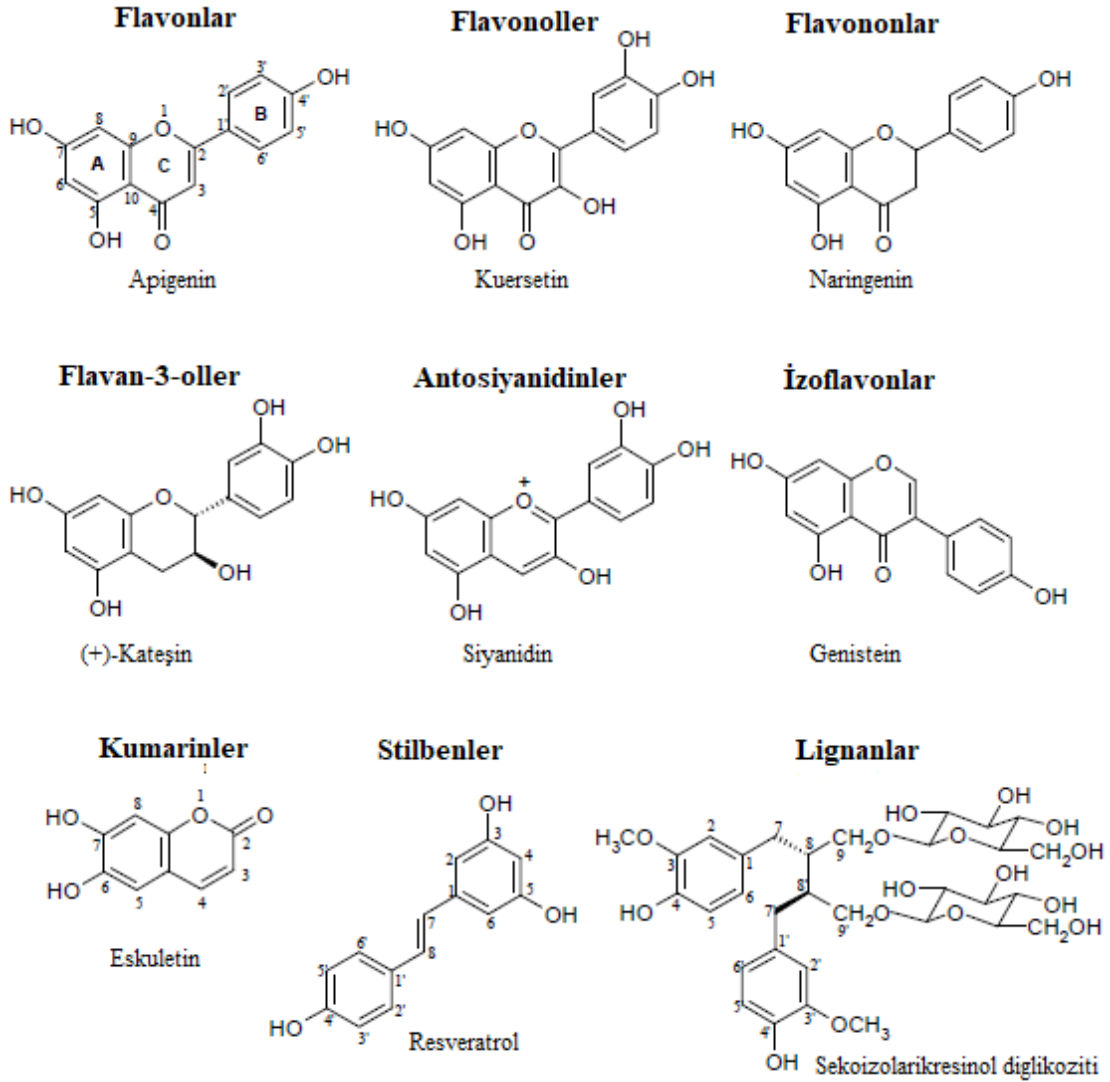
1.1.1.1.2. Flavonoidler

Flavonoidlerin genel kalıbı difenilpropan veya fenilbenzopiran adı verilen kimyasal yapı ile karakterize edilir. Genel yapı, bir kroman halkasına (benzopiran parçası) birleştirilen bir C₁₅ (C₆-C₃-C₆) karbon iskeletini içermektedir. Flavonoidler; flavonol, flavonlar, flavan-3-ol, proantosiyanidin, antosiyanin, izoflavon ve flavanonlar diye

adlandırılan yedi alt sınıfa ayrılırlar (Şekil 3). Bu alt sınıflar arasındaki yapısal farklılıklar C-ring modifikasyonu ile alakalıdır (Pereira ve ark., 2009; Åkerström, 2010; Halake ve ark., 2016).



Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı
(difenilpropan veya fenilbenzopiran)



Şekil 3. Flavonoidler

1.1.2. Üzümsü Meyveler

Yaban mersini (*Vaccinium myrtillus*), ahududu (*Rubus idaeus*), mavi yemiş (*Vaccinium corymbosum*), böğürtlen (*Rubus fruticosus*), siyah frenk üzümü (*Ribes nigrum*) ve çilek (*Fragaria ananassa*) gibi bitkilerin meyveleri üzümsü olarak adlandırılmakta olup, fenolik bileşikler bakımından zengindirler. Önemli fonksiyonel gıdalar olarak önerilmekte ve tüketilmektedirler. Genel sağlık durumunun korunması için bu meyvelerde antioksidan maddelerin yoğun bir şekilde bulunması biyoaktif maddeler olan fenolik bileşiklerle ilişkilendirilmektedir (Đorđević ve ark., 2010).

Üzümsü meyvelerin içeriğinde benzoik asit türevlerinden p-hidroksibenzoik asit, elagik asit gallik asit ve salisilik asit, sinamik asit türevlerinden p-kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asit önemli oranlardadır. Hidroksisinamik asit grubuna dahil kafeik asit türevlerinden en çok kuinik asit ve kafeik asitlerin esterleşmiş formları olan klorojenik asitin varlığı saptanmıştır. Klorojenik asit, meyve ve ürünlerine ekşi lezzet vermekte olup, polifenol oksidazlarla hızla oksitlenebilir ve kahvemsî renkli moleküllere çevrilebilir. Üzümsü meyvelerde fenolik bileşikler ve özellikle vitaminlerden askorbik asit (C vitamini) yoğun oranda bulunmaktadır. Askorbik asit kuş üzümü ve çilek gibi üzümsü meyvelerde yüksek oranda iken, diğer üzümsü meyvelerde bitkilerde en yaygın olan fenolik bileşikler baskın düzeylerde dir. (Çağlar ve Demirci 2018). Üzümsü meyvelerde yoğun bulunan fenolik bileşikler tıbbi araştırmaların önemli konusu haline gelmiştir. Bu bileşiklerin antiinflamatuar, östrojenik, enzim inhibisyonu, antimikrobiyal, antialerjik, vasküler ve sitotoksik antitümör aktivitesi gibi pek çok yararlı özelliğe sahip oldukları bildirilmiştir (Cushnie ve Lamb 2005). Fenolik bileşiklerin güçlü antioksidan aktiviteleri, aynı zamanda birçok hastalığın patogeneğinde yer alan oksidatif stresin önlenmesinden sorumlu önemli biyolojik etkinlik olarak değerlendirilmektedir. Fenolik bileşiklerin antikanser aktivitesi serbest radikalleri süpürme yetenekleriyle de ilişkili olup kanserin erken aşamalarında önerilmektedirler. Ayrıca, fenolik bileşikler; hücre büyümesi ve proliferasyon, onkogenlerin ve tümör oluşumunun baskılanması, apoptozun uyarılması, detoksifikasyon, enzim aktivitesinin modülasyonu, immün sistemin stimülasyonu, redoks reaksiyonları ve endoksin sistemin

düzenlenmesi gibi sinyal transdüksiyon yollarının regülasyonu aracılığıyla antikanser ajanlar olarak da değerlendirilmektedir (Pereira ve ark., 2009).

Üzümsü meyvelerde fazla miktarlarda bulunan ve fenolik bileşiklerden olan antosiyanin, kuersetin, ellagik asit, kamferol ve mirisetinin antikanserojenik, antiviral ve antibakteriyal etkileri de yüksek antioksidan kapasiteleri ile bağdaştırılmaktadır (Pehlivan ve Güteryüz, 2004; Nizamlioğlu ve Sebahattin 2010). Özellikle antosiyanin içerikleri bakımından zengin olan yaban mersini, ahududu, çilek ve vişnenin bazı kanser türleri ve damar hastalıkları gibi mortaliteyi önemli oranda etkileyen sağlık sorunlarını önlemede yararlı etkilerinin olduğu kaydedilmektedir (Pehlivan ve Güteryüz, 2004; Åkerström, 2010; Çağlar ve Demirci 2018).

1.1.2.1. Yaban mersini (*Vaccinium myrtillus* L.)

Ericaceae familyasının bir üyesi olan *V. myrtillus* L., Türkiye’de yaban mersini, mavi yemiş, likapa, ayı üzümü, morsivit, çalı çileği, Trabzon çayı gibi isimlerle, yurt dışında ise blueberry olarak tanınmaktadır (Resim 1). Avrupa ve Amerika’da meyveleri reçel, marmelat, pasta, pekmez, meyve suyu, meyveli yoğurt, dondurma, meyveli çörek, şarap gibi pek çok gıda malzemesi yapımında kullanılmaktadır. Yapraklarından çay yapılırken, kökleri, meyveleri, çiçekleri ve yine yaprakları ilaç sanayisinde değerlendirilebilmektedir. Kurutulan meyveleri öğütülerek şeker hastaları için tatlandırıcı olarak kullanılabilir. Yaban mersini meyvelerinin antioksidan madde içeriği bakımından oldukça zengin olduğu ve sağlık açısından pek çok yararlı etkisinin bulunduğu bildirilmektedir (Çelik, 2005). Bitki meyvesinde bugüne dek alerjik bir bileşik tespit edilmemiş olup, iyi bir fonksiyonel gıda olarak da önerilmektedir. Son zamanlarda biyoaktif özelliklerinden dolayı dikkatleri üzerine çeken *V. myrtillus*’un meyve ve yaprakları fenolik bileşiklerce, özellikle flavanoidlerce oldukça zengindir. Antosiyanidinlerden siyanidinin *V. myrtillus*’ta UV radyasyonuna karşı savunmada temel bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Ayrıca *V. myrtillus*’un meyvelerinde yapraklarına oranla daha yüksek konsantrasyonda antosiyanin bulunduğu belirtilmektedir (Åkerström, 2010).

Vaccinium myrtillus L.'nin taksonomik yeri (National Plant Data Center, 1996);

Alem: *Plantae*

Altalem: *Tracheobionta*

Bölüm: *Magnoliophyta*

Sınıf: *Magnoliopsida*

Altsınıf: *Dilleniidae*

Takım: *Ericales*

Familya: *Ericaceae*

Genus: *Vaccinium*

Species: *Vaccinium myrtillus* L.



Resim 1. *Vaccinium myrtillus* L.

1.1.2.1.1. *Vaccinium myrtillus* L.'nin Fitokimyasal Bileşimi

Önemli bir antioksidan kaynağı olan yaban mersini bitkisinin meyve ve yapraklarının kimyasal bileşiminde meyve asitleri; kinik asit, malik asit, sitrik asit ve diğer asitler; tanenler den başlıca kateşin tanenleri, gallik asit, protokateşuik asit, krojenik asit,

sirinjik asit, ferulik asit, p-kumarik asit, ellajik asit, kuersetin, kaempferol, mirisetin, oligomerik prositanidinler, antosiyanozitler, delfinidin-3-O-arabinozit, delfinidin-3-O-galaktozit, delfinidin-3-O-glukozit, siyanidin, petunidin, peonidin, malvidin, peonidin-3-glukozit, malvidin-3-galaktozik, peonidin-3-arabinozit, malvidin-3-glukozit; flavonoidler: hiperozit, izkersetin, kesretin, astragalin; iridoitler: asperulozit, monotropein (sadece olgunlaşmamış meyvede bulunur) ile klorojenik asit ve bazı kafeik asit türevleri yanı sıra C vitamini başta olmak üzere çeşitli vitaminler bulunmaktadır (Nakajima ve ark., 2004; Šaponjac ve ark., 2015).

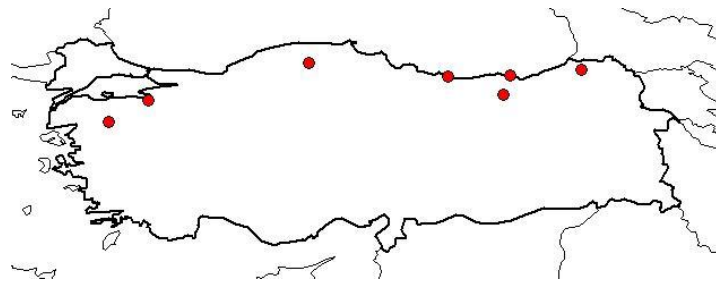
Yabanmersini meyveleri nem ve lif oranı yüksek olmakla birlikte düşük kalorilidir. Neolitik çağdan beri tüketilmekle birlikte özellikle İskandinav ve Güney Amerika ülkelerinde tüketilmektedir. C vitamini, folik asit, flavonoid, fenolik bileşikler ve özellikle antosiyanince zengin diyetel biyoaktif bileşenleri içermektedir. Suda çözünebilir pigmentlerden olan antosiyaninler meyve ve yapraklar gibi bitki kısımlarına parlak renk verirler. Genel olarak *Vaccinium* türlerindeki antosiyanin bileşimi oldukça karmaşık ve yüksek düzeydedir. *V. myrtillus*'un meyvelerinde yapraklarına oranla daha yüksek konsantrasyonda antosiyanin bulunduğundan antosiyaninler meyvede temel bileşen olmakla birlikte glikozillenmiş halde tutulmaktadır. Kalitatif ve kantitatif analizlere göre yaban mersini yapraklarında temel olarak bulunan bileşenler ise hidroksisinnamik asit ve klorojenik asittir (Åkerström, 2010). Yaban mersini meyveleri diğer meyvelerde de keşfedilmiş altı tane doğal ve yaygın olarak bulunan antosiyaninlerden (siyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin ve petunidin) beş tanesini içermektedir (Babova ve ark., 2016).

1.1.2.1.2. *Vaccinium myrtillus* L.'nin Sağlık ve Tarihsel Süreçteki Önemi

Son zamanlarda yapılan birçok *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmaya göre yaban mersininin apoptozisi arttırarak, DNA hasarını ve kanser hücresi proliferasyonunu azaltarak kalp hastalıklarını, karsinogenezisi ve anjiyogenezisi önlediği kaydedilmiştir (Wang ve ark., 2017). Önerilen tüm bitkisel gıdalar arasında *V. myrtillus*'un içerdiği yüksek miktardaki biyoaktif moleküller özellikle antosiyanin bakımından büyük ilgi

uyandırmaktadır. Yaklaşık olarak 22 antosiyanin türünün yaban mersini ekstraktlarında bulunduğu bildirilmiştir (Cesa ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017). Bu fenolik bileşenler çoğunlukla meyvelerin kabuklarında bulunmakla birlikte meyvelere mavi-mor bir renk verirler ve sağlık için oldukça faydalıdır. Antosiyaninlerin radikal süpürücü ve metal iyonlarını tutma yetenekleri, hücre sinyal yollarındaki rolleri, gen ifadesi, DNA onarımı ve hücre adhezyon süreçlerinde kilit rol oynamaları genel sağlık durumunu koruyucu bir ajan olmalarını açıklamaktadır. Klinik ve deneysel çalışmalar yaban mersininin genoprotektif, antikanser, kardiyoprotektif, antiinflamatuvar, antitrombotik, antihipertansif, kolesterol düşürücü, hipoglisemik, antiobezite, görme koruyucu, nöroprotektif ve antimikrobik etkilerinin bünyelerinde barındırdıkları antosiyaninlere atfetmektedirler (Cesa ve ark., 2017). Yaban mersinindeki antosiyanidinlerin genellikle C halkasının 3. pozisyonunda bulunan glukopiranoz, galaktopiranoz ve arabinopiranozlardan glikozillendiği kaydedilmektedir (Bunea ve ark., 2013).

Yaban mersininin asit karakterli topraklarda ve organik maddece zengin, defne, çam, kızılalağaç, ladin ve göknar türlerinin karışık olarak yetiştiği alanlarda yaygın olduğu bildirilmektedir. Kuzey Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'nın 2800 m yükseliğe kadar olan dağları ve ormanlarında yayılım gösterdiği bildirilen bu bitkinin Türkiye'de kuzeyde özellikle Karadeniz ve Kuzey Doğu Anadolu bölgesinde yüksek ve nemli kesimlerde doğal olarak yaygın olduğu belirtilmektedir (Şekil 4) (Çelik, 2006).



Şekil 4. Türkiye'de *Vaccinium myrtillus* 'un yayılış alanı

Kanadalı araştırmacılar 1922 yılında insülin keşfedilmeden önce diyabetes mellitusun tedavisi için diyet programlarına ek olarak *V. myrtillus* 'un kullanılmasını önermişlerdir. Modern çağ öncesi dönemlerde (1098-1179) *V. myrtillus* ' a ait kayıtlar bulunmakla

birlikte meyvelerin kullanımının yapraklarının kullanımına oranla daha fazla olduğu görülmektedir. 1498-1554 yılları arasında Hieronymus Bock yaban mersininden hazırlanmış preparatları öksürüğe karşı önermiştir. 1501- 1577 yıllarında Andrea Mottioli ve 1528-1586 yıllarında da Adam Lonitzer yaban mersini meyve suyunun diüretik ve terletici etkisini keşfetmişlerdir. 1735 yılında Zedler'in ansiklopedisinde gastrointestinal hastalıklara karşı kullanılan meyveler listesinde *V. myrtillus*'un da kaydı bulunmaktadır. 1951 yılında Kröger tarafından parazitlerin ve bakteri enfeksiyonlarının sebep olduğu çeşitli gastrointestinal hastalıklara karşı tedavi olarak yaban mersininin kullanımı bildirilmiştir. 1903 yılında Bernstein, tifo ateşine karşı yaban mersinin etkisini çalışmakla birlikte, ilk kez ticari olarak sıvı ekstraktını hazırlamıştır. 19. yüzyıl sonlarında Avusturya Alpler'inden orijinlendiği düşünülen geleneksel halk tedavisinde, *V. myrtillus* yaprak ekstraktlarının antidiyabetik olarak kullanımı ders kitaplarına girmiştir. 20. yüzyılın başlarından itibaren *V. myrtillus*, en çok kullanılan hipoglisemik gıdalardan biri olduğu için diyabet tedavisinde gelecek vadeden tıbbi bitkiler arasında yer almaktadır. Son zamanlarda yaban mersini ile ilgili yüksek kalitede çalışmalar çok nadir yapılmaktadır ve bu çalışmalar genotoksik olup olmadığını gösteremedikleri için antidiyabetik bir ajan olarak kullanılabileceğini desteklemezler. Yoğun fitokimyasal bileşimine bağlı olarak toksikolojik risklerden dolayı standart ders kitaplarında yaban mersini ile hazırlanan ticari preparatların kullanımı tavsiye edilmemiştir (Helmstädter ve Schuster 2010).

Yaban mersininin kanserin ilerlemesini engellediğine dair birçok kanıt vardır. Bu olası mekanizmalardan birisi de kanser hücrelerinin apoptozisini indükleyerek büyümelerini engellemektir. Bu bitki ekstraktlarının antikanser özellikleri de polifenolik biyoaktif fitokimyasallarla ilgilidir. Ticari olarak satılan, antosiyanince zengin yaban mersini özütlerinin kolon kanserine karşı potansiyel kemopreventif etkileri araştırılmıştır. Buna göre ekstraktların HT-29 hücrelerinin büyümesini önleyerek antitümorojenik etki gösterdiği bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2004). Yaban mersini fitokimyasallarının güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu, tümör hücrelerindeki büyümeyi durdurduğu ve apoptozisi indüklediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu bitkideki antosiyaninlerin farklı aglikonları ve şeker kısımları farklı biyolojik etkilere sahiptirler. Delfinidin(30-40µM), peonidin 3-glukozid (30-100µM) ve siyanidin 3-glukozid (30-100µM) gibi saf

antosiyainidinler HCT1 16 kolon ve HS578T meme hücre hatlarında apoptozisi indükleyerek ve G2/M hücre döngüsünü durdurarak insan tümör hücrelerinin büyümesini baskırlar. Yaban mersini türlerini tümör hücrelerindeki antiproliferatif ve proapoptotik etkileri üzerine çok kısıtlı sayıda çalışma vardır. Antosiyainince zengin bataklıkta yetişen bir yaban mersini türünün CaCo-2 ve Hep-G2  l mc l kanser hücre hatlarında laktat dehidrogenaz aktivitesini (LDH) ve alt-G1 hücrelerinin toplanmasını arttırmak için hücre proliferasyonunu azalttığı bulunmuştur (Nowak ve ark., 2017; Assad ve ark., 2015). Başka bir çalışmada yüksek miktarda antosiyainin içeren yaban mersini ekstraktının HT-29 kolon kanseri hücre hattında apoptozisi düzenlediği gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2004). Meyvelerden liyofilizasyon elde edilmiş antosiyainin parçalarının antiproliferatif etkiye sahip oldukları ve B16-F1 murin melanoma hücrelerindeki metastaz sinyal yolaklarını düzenledikleri gösterilmiştir (Huang ve ark., 2008). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, delfinidin  n tedavisinin tümör oluşturmayan insan  l ms z HaCaT keratinositlerini koruduğunu göstermiştir (Afaq ve ark., 2007). Ayrıca SKH-1 tüysüz fare derisinde UV-B ışınları ile indüklenmiş apoptoziste, apoptozise bağlı oksidatif stresi ve DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir (Bunea ve ark., 2013). Lösemi ve karsinoma hücrelerine karşı büyüme inhibitörü etkisiyle antosiyaininlerin flavanoller ve flavononlar gibi diğer fenolik bileşenlerden daha etkili fitokimyasallar olduğu öne sürülmektedir. Antosiyainin içeren çeşitli ekstraktlar arasında yaban mersini ekstraktının *in-vitro* olarak HCT-116 insan kolon kanseri hücrelerinde ve HL-60 insan lösemi hücrelerinin gelişiminin önlenmesinde daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak da büyüyen kanser hücrelerine karşı antosiyaininler doğal ve güçlü inhibitörler olarak önerilmektedir (Nagase ve ark., 1998; Katsube ve ark., 2003).

1.1.2.2. Ahududu (*Rubus idaeus* L.)

Rosaceae familyasına dahil olan *Rubus idaeus* L.,  zellikle İda Dağ'ında (Kaz Dağları, Türkiye)  ok yaygın olduğu anlaşıldığından bu isimle Linnaeus tarafından tanımlanmıştır (Hummer, 2010). Makroskobik olarak dik sürgün ve petaller, altta pennat ve üstte ternat yapraklar ve k  k olan drupalarının kırmızı renkli olmasıyla

karakterize edilmektedir. 2 m boya kadar büyüeyebilen ve yaprakları kış mevsiminde dökülen çalimsı bitkidir. Çiçekleri uçta ve yanda beyaz renkli ve ebat olarak küçüktür (Resim 2) (Davis, 1972). Avrupa, Uzak Doğu ve Kuzey Amerika ülkelerinde *R. idaeus*'un kök, yaprak ve meyvelerinden hazırlanan preparatlar spazm çözücü, tonik, ateş düşürücü ve terletici, diyare, dizanteri ve soğuk algınlığının tedavisinde yardımcı ve meyveleri içeceklerde aromatizan olarak kullanılmaktadır (Akıllıgöz ve Ezer 2000). Türkiye'nin kuzey kesimlerinde yaygın olan *R. idaeus*'un meyveleri ahududu veya kırmızı franbuaz adı ile geleneksel olarak tüketilmektedir (Çelik ve Ercişli 2009). Üzümsü *R. idaeus* meyvesindeki aromanın cazip olması nedeniyle ilaç ve gıda sektöründe değerlendirilmektedir. Gıda alanında marmelat, içki, reçel, meyveli yoğurt ve tatlıların üretiminde kullanılmaktadır. İşlenmemiş haldeki tüketimi ürettiği alana yakın yerlerde yaygın olup bu bitkiye Türkiye'de duyulan ilgi her geçen gün hızla artmaktadır (Makaracı ve Çelik 2005).

Rubus idaeus L'nin taksonomik yeri (National Plant Data Center, 1996);

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Rosidae

Takım: Rosales

Familiya: Rosaceae

Cins: *Rubus* L.

Tür: *Rubus idaeus* L.



Resim 2. *Rubus idaeus* L.

1.1.2.2.1. *Rubus idaeus* L.'nin Fitokimyasal Bileşimi

Rubus idaeus meyveleri yüksek miktarda fenolik bileşikler içermekle birlikte baskın olarak antosiyanin ve elajitanninleri bulundurmaktadır (Krauze-Baranowska ve ark., 2014b). *R. idaeus* meyvesinin yüksek antioksidan kapasitesinin fenolik bileşenlerle organik asit ve şekerlere bağlı olduğu kaydedilmiştir (Çekiç ve Özgen 2010) Bu bitkinin bünyesinde bulunan fitokimyasallar HPLC ve LC-MS-MS tekniklerle belirlenmektedir (Mullen ve ark., 2002; Gülçin ve ark., 2011). Mullen ve ark. (2002) bu bitkide antosiyaninlerden siyanidin-3-(2G-glukozilrutinozit), siyanidin-3-soforozit, siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glukozit, pelargonidin-3-soforozit, pelargonidin-3-(2G-glukozilrutinozit) ve elajitanenlerin varlığını bildirmiştir. Ayrıca bu bileşenlerden en çok sanguin H-6 ve lambertianin C'nin damarlarda vazodilatör etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Mullen ve ark., 2002). Gülçin ve ark. (2011)'nin antioksidan kapasite ile ilgili yapılan bir çalışmada, bu bitkide sirinjik asit, ellajik asit, kafeik asit, ferulik asit, pirogallol, kersetin, α -tokoferol, p-hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit, gallik asit, askorbik asit ve vanilin oranları saptanmış ve p-kumarik asitin antioksidan kapasitede çok etkili olduğu bildirilmiştir (Gülçin ve ark., 2011). Krauze-Baranowska ve ark. (2014b)'nin *R. idaeus* 'ta kimyasal bileşen ve biyolojik aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada ise gallik asit, protokateşik asit, kafeik asit, myricetin, tilirosit, kamferol, kuersetin-3-O-glukronid, kamferol-3-O-galaktozit, kuersetin-3-O-ramnozid, klorojenik asit, kateşin, epikateşin, izokuarsetin, elajik asit

hiperoksit, prosiyanidin B1, prosiyanidin B2 ve sanguin H-6 fitokimyasallarının varlığı bildirilmektedir (Krauze-Baranowska ve ark., 2014b).

1.1.2.2. *Rubus idaeus* L.'nin Sağlık ve Tarihsel Süreçteki Önemi

R. idaeus yaprak ve meyvelerinin elde edilen kayıtlara göre 1898'lerden beri bitkinin tıbbi amaçlarla kullanılan kısımları olduğu belirtilmektedir. Yapraklar, bazı bileşenlerini suya vermekte olup, infüzyonunun bir çeşit siyah çay benzeri bir koku ve tat verdiği de kayıtlarda bulunmaktadır (Kress, 2011). *R. idaeus*'a ait kayıtlarda, eski Yunanlılar tarafından M.Ö. yaklaşık 370 gibi erken bir tarihte hasat edildiği, Roma'da ise M.Ö. yaklaşık 65 yılında tüketiminin arttığı ve *R. idaeus* meyve yetiştiriciliğinin Avrupa ülkelerinde 16. Yüzyıl'dan itibaren yaygınlaştığı kaydedilmiştir (Hummer, 2010).

R. idaeus meyvesi biyoaktif fenolik antioksidanların önemli kaynağı olarak tanımlanmıştır. Bu bileşiklerin, oksijen radikallerini süpürmek için güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve *in-vitro* çalışmalarda oksidasyonun, patojenik bakterilerin ve bazı kanser hücre hatlarının büyümesini inhibe edici niteliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Hummer, 2010). *R. idaeus* meyvelerinin yüksek orandaki antosiyanin içeriğinden kaynaklı güçlü antiinflamatuar ve antioksidan etkilere neden olduğu ve akciğer, kolon, insan mide ve meme tümör hücrelerini % 20 ile 54 arasında azalttığı da bildirilmiştir (Bowen-Forbes ve ark., 2010).

Bir çalışmada, hiperkolesterolemik ratlara verilen *R. idaeus* nektarının, serum trigliserit, total kolesterol ve LDL kolesterolünü azalttığı ve buna bağlı olarak kan, beyin ve ince bağırsakta lipid peroksidasyonunun inhibe olduğu belirtilmiştir (Araujo ve ark., 2011). Beckett ve ark. (1954) tarafından *R. idaeus*'un taze yaprak ekstraktının kedi uterusu ve bağırsağında düz kas gevşetici niteliğe sahip olduğu, farelerde ise merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı özelliğinin saptandığı ve kolinesteraz aktivitesinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Beckett ve ark., 1954).

Mycobacterium tuberculosis süspansiyonu ile indüklenmiş deneysel artrit modeli oluşturulmuş ratlarda 30 gün *R. idaeus* meyve ekstresi ile beslenen ratların kıkırdak ve

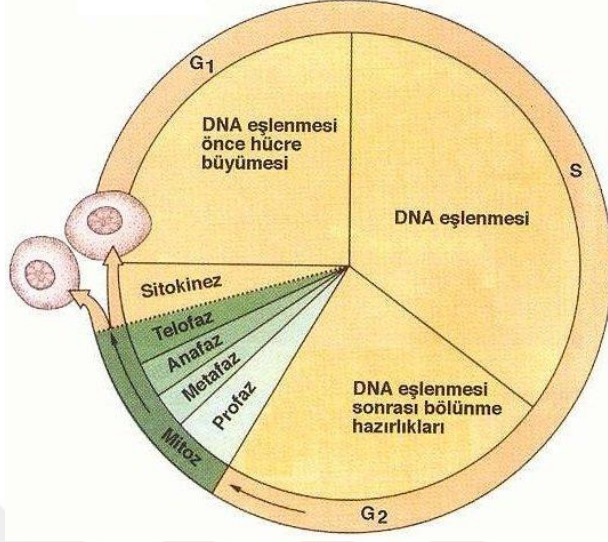
kemik hasarınının önemli oranda azalarak antienflamatuvar özelliğın saptandığı ve *R. idaeus* ekstresinin artrit tedavisinde yararlı olduğı kaydedilmiştir (Jean-Gilles ve ark., 2012).

R. idaeus ile üretilen şarapların fenolik bileşen, antioksidan ve biyolojik potansiyellerini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada bu içeceklerin doza bağılı olarak *in-vitro* insan göğüs (MCF-7), kolon (CaCo-2) ve servikal (HeLa) kanser hücre hatlarında kuvvetli antiproliferatif etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Ljevar ve ark., 2016). *R. idaeus*'un oral kanser hücrelerinde antimetastatik yeteneğini değerlendirildiğı bir çalışmada bu bitkinin meyve ekstraktının oral kanser hücrelerinin göçünü ve invazyon yeteneğini önlediğı bildirilmektedir. Bu etkinin, fokal adezyon kinaz (FAK) ve hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz (ERK) enziminin inhibisyonu yoluyla matriks metalloproteinaz-2'nin (MMP-2) mRNA ekspresyonunun da baskılanarak ortaya çıktığı kaydedilmiştir (Huang ve ark., 2017).

1.1.3. Hücre Döngüsü

Devamlı olarak bölünen hücrelerde hücre döngüsü G_1 -S- G_2 (interfaz) ve M (mitoz) biçiminde tekrarlanmaktadır. Bu periyotta hücrelerde hücre indüksiyonu ve büyüme gerçekleşmekte ya da bölünme indüklenmediğı durumda hücreler dinlenme safhası olan G_0 'da beklemektedirler. G_1 -S- G_2 safhaları hücre döngüsünün % 90'nını kapsamaktadır ve yaklaşık olarak 16-24 saat arasında devam etmektedir. Mitoz bölünme ise yaklaşık olarak 1-2 saat arasında gerçekleşmektedir. Hücre büyümesi G_1 safhasında restriksiyon noktası tarafından (R point) düzenlenmektedir. Bu noktada hücre bölünme prosesi ya sürecek ya da duracaktır. G_1 safhasında hücreler çevrelerinden indüklenme sinyalleri alırsa büyüme ve gelişme işlemleri devam eder. Bu safhada DNA eşlenmesi (replikasyonu) için ön hazırlıklar yapılırken, RNA ve proteinler sentezlenir. S safhasında ise DNA eşlenmesi sonrası, G_2 safhasında hücre büyümeyi sürdürür ve RNA sentezi ile protein sentezi de gerçekleşerek mitoz bölünmeye hazırlanılmaktadır. Mitoz bölünme profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden meydana gelmektedir.

Telofazda tam bölünme (sitokinez) gerçekleşir ve aynı genetik materyali bulunduran iki yeni hücre oluşur (Şekil 5) (Cabadak, 2008).



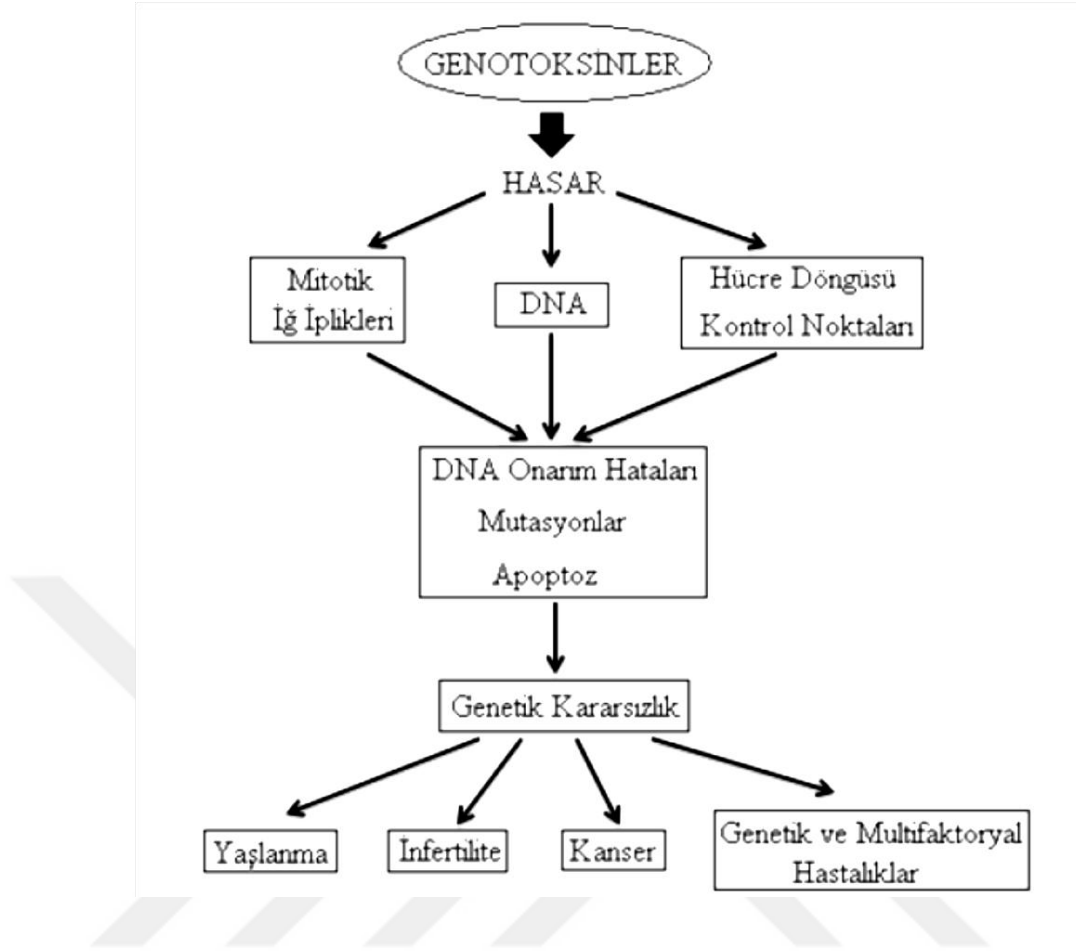
Şekil 5. Hücre döngüsü (Cabadak, 2008)

Hücre döngüsünde bir safha tamamlanmadan sonraki safhaya atlanırsa genetik materyal normal şekilde kopyalanmamış olacağından hücrenin büyüme ve gelişmesinde bozukluklar oluşabilmektedir. Hücre döngüsünde G_1 safhasından S safhasına geçiş, G_2 safhasından M safhasına geçiş ve mitoz bölünmenin metafaz evresinden anafaz evresine geçişlerin hepsinde kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktaları sayesinde hücrenin döngüyü sürdürüp sürdürmeyeceği belirlenmektedir. Genotoksik ajanlara maruz kalan hücrelerin DNA'larında oluşan hasarların durumu ve şiddetine göre hücre döngüsü kontrol noktaları G_1 safhasından S safhasına ya da G_2 safhasından mitoz safhasına geçişleri düzenlemektedir. DNA ile ilgili bozukluklar normal DNA replikasyonunu da engelleyebilmektedir (Cabadak, 2008).

Hücre döngüsünde iki çeşit gen grubunun hayati derecede önemli işlevlerinin olduğu bildirilmektedir. Bunlardan ilki kanser gelişimini doğrudan veya dolaylı yollardan etkileyebilen gen grubu olan onkogenler, diğeri ise kanserleşmeyi baskılayan tümör baskılayıcı genlerdir (Foster, 2008; Cabadak, 2008).

1.1.4. Genotoksisite Testleri

Genetik toksikoloji, toksikoloji biliminin bir alt dalı olarak canlıların normal yaşam süreçlerinin işleyişi esnasında fiziksel, kimyasal veya biyolojik faktörlerden etkilenebilecek kalıtsal materyallerindeki değişimlerin incelendiği bilimsel bir alandır (Choy, 2001; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011b). Genotoksisite terimi; kromozom, nükleus ve DNA üzerinde oluşan DNA fazlalıkları, DNA kırıklıkları, kromozom anormallikleri, gen bölgesi mutasyonları ve anöploidi gibi bozuklukları kapsamaktadır. Nükleik asit (DNA) ya da gen ifadelerinin açığa çıkarılmasında rol alan enzimleri etkileyen ve mutasyonlara sebep olan toksik ajanların DNA üzerinde bozukluklar oluşturarak kalıtsal değişikliklere sebep olması ise “genotoksik etki” adı ile tanımlanmaktadır (Choy, 2001) Nükleik asitler üzerinde mutasyonlara neden olan etkenler veya mutajenler DNA’daki etkilerini, doğrudan veya genlerin ifadesi sonucu sentezlenen proteinleri etkileyerek dolaylı olarak gerçekleştirmektedirler. Nükleik asitlerin fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde görevli molekül ve yollardaki istenmeyen değişiklikler ise kanser, doku hasarı, infertilite, yaşlanma veya bazı multifaktoryal kalıtsal hastalıklara sebep olabilmektedir (Şekil 6) (Kirsch-Volders ve ark., 2003; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011b). Genotoksisite, mutajenite ve karsinojenite ile ilgili araştırmalar insanlar için karsinojen olan bileşiklerin genotoksisiteyi artırdığı bildirilmiştir. Kimyasal bileşiklerin mutajenik özellikleriyle karsinojenik etkilerinin birbirleriyle yakından ilişkili olduklarının saptanması, genotoksisite testlerinin bilimsel ve sanayi kuruluşlarınca kimyasal bileşiklerin karsinojenik veya antikarsinojenik potansiyellerinin belirlenmesinde önemli bir konuma gelmesine neden olmuştur (Mavournin ve ark., 1990; Zeiger, 2004; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011b).



Şekil 6. Genotoksitesi olan faktörlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları

Genotoksitesi bilinmeyen faktörlerin karsinojenik veya mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan *in-vitro* ve *in-vivo* mutajenite belirleme yöntemleri; kromozom aberasyonları (KA) testi, kardeş kromatit değişimi (KKD) testi, mikronükleus (MN) testi, ames testi ve comet testleridir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011b).

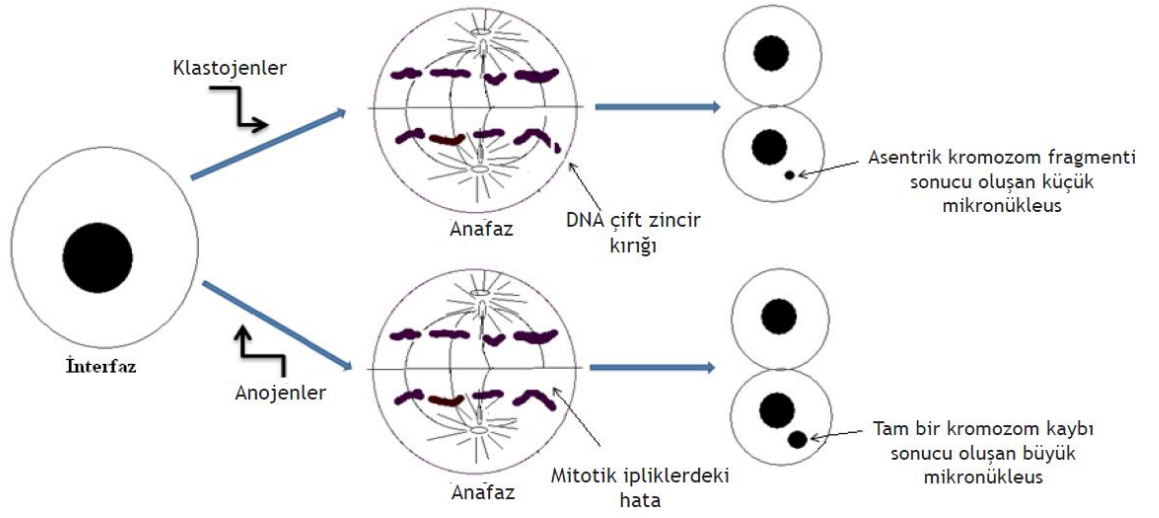
1.1.4.1. Mikronükleus Testi

Mikronükleus (MN) ilk olarak eritrositlerde Howell ve arkadaşları tarafından tespit edilmiş olup, Jolly tarafından tanımlandığından Howell-Jolly cisimciği adı ile de bilinmektedir (Sears ve Udden, 2011). MN, hücre siklusu devam ederken bölünme esnasında ayrı kalan kromozom fragmenti veya kromozomların bir nükleoplazma ile

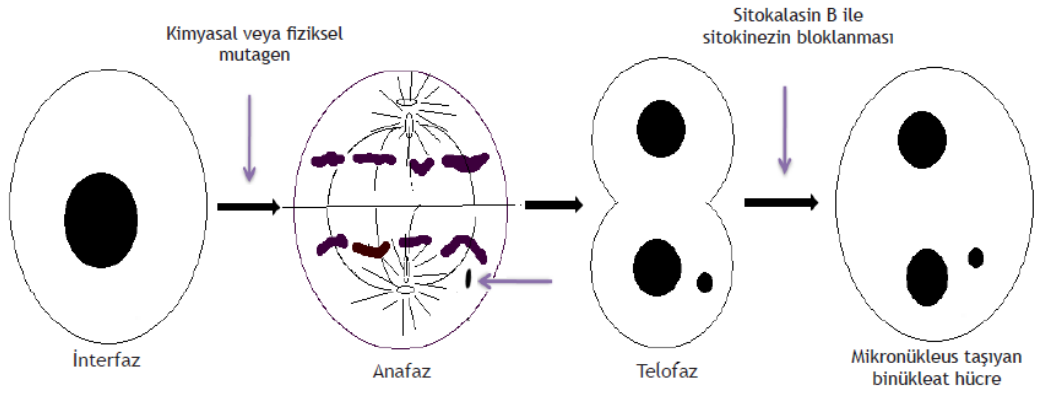
paketlenerek sitoplazmada ana nükleusa yakın olarak yer almasıyla oluşurlar. MN'lar DNA hasarları nedeniyle meydana gelirler. Canlının değişik mutajenik, klastojenik veya karsinojenik faktörlerle karşılaşması nedeniyle DNA'sının yapısında hasarlar oluşabilmektedir. DNA'larda oluşan hasarların oranları *in-vivo* ve *in-vitro* olarak en kullanışlı ve DNA konusunda güvenilir testlerden biri olan MN testi ile belirlenmektedir (Fenech, 2010; Üstüner, 2011).

MN yöntemi, insan periferik kan lenfositlerinde, kemik iliğinde ve yanak mukoza hücrelerinde kimyasal bileşenlerin genotoksik aktivitelerinin analizlerinde değerlendirilmektedir. Kanser türleri ile spesifik kromozom bozuklukları arasında anlamlı ilişkiler bulunduğundan kanser vakalarının değerlendirilmesinde MN testi önemli bir yere sahiptir. Ayrıca MN testi, hem kanser hem de kanserin tedavisi ve koruyucu faktörleri için yararlı bir yöntem olmaktadır. Sitokalazin-B (Cyt-B), *Helmin dematiodeum*'dan elde edilen bir ekstrakt olup, aktin filamentlerinin terminal kısımlarından polimerize olmalarını önleyerek hücre bölünmesini sitokinez evresinde tutmaktadır (Şekil 7) (Seoane ve Dulout 2001; Toksi ve ark.,2001).

Standart lenfosit kültürlerine Cyt-B'nin belirli miktarlarının uygulanmasıyla nükleolar bölünme gerçekleşmiş fakat sitokinezin olmadığı çift nükleuslu (binükleat) hücrelerde, MN'lu hücrelerin yüzdesi saptanabilmektedir (Şekil 8) (Fenech, 2010; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a).



Şekil 7. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a)



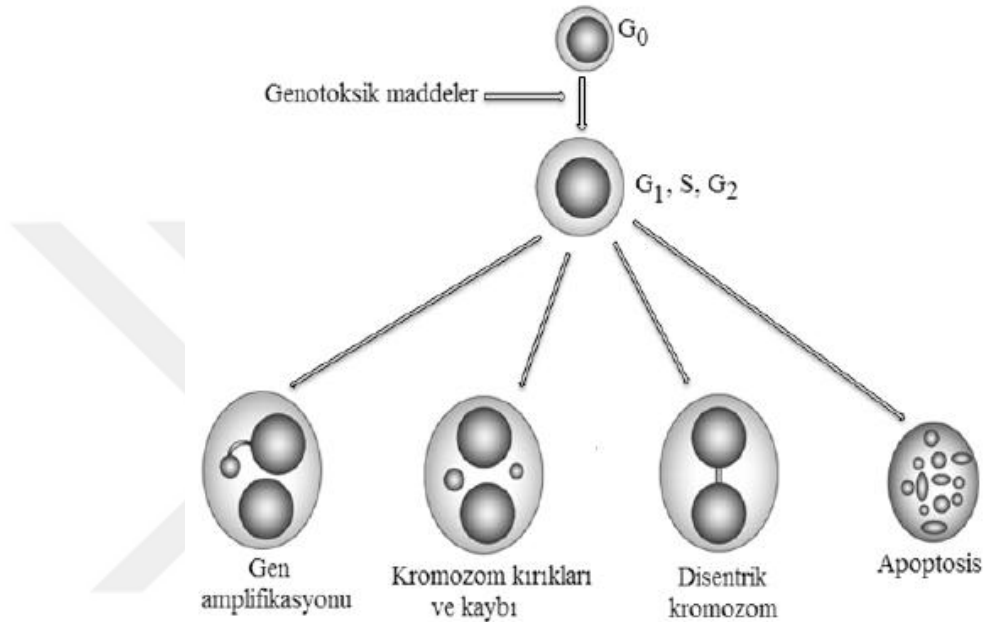
Şekil 8. Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a)

Sitokinezi bloklanmış hücrelerde binükleer hücreler ve MN sayımında aşağıdaki ölçütler uygulanmaktadır (Fenech, 2010; Şekeroğlu, 2011a);

- Hücreler çift çekirdek bulundurmalı ve belirgin sitoplazmalarıyla oval veya yuvarlak görünümlü olmalı,
- Çekirdekler belirgin nükleoplazma ile çevrili yuvarlak veya oval olmalı,
- MN çapı ana çekirdeğin en fazla 1/3'ü kadar olmalı,
- MN'ler yuvarlak ve oval biçimlerde olmalı,
- MN'ler ana çekirdekten ayrı olmalı,
- Boya tutma yeteneği ana çekirdekle benzer olmalı ve
- Sadece sitokinezi bloklanmış çift nükleuslu hücrelerdeki MN'lerin miktarı esas alınmalıdır.

Bu testle hücrelerin MN durumu analiz edilemekte ve bu test kromozom anormallikleriyle tespiti güç olan anöploidiyi uyaran bileşenlerin saptanmasında da daha hızlı sonuç vermektedir. Kimyasal ajan verilen hücrelerden kaynaklanan yavru hücrelerdeki MN'lerin araştırılması, en az bir hücre bölünmesiyle yavru hücrelere aktarılan genetik bozukluğu belirtmektedir. Yani iki nükleuslu hücrelerin içerisindeki MN'lerin belirlenmesiyle hücrenin bölünme aşamasına geçtiği de ortaya çıkarılmış olmaktadır. Sitokinezi durdurulan hücrelerde MN testi ile kromozom kaybı, disentrik kromozom oluşumu ve kromozom kırıkları ve benzeri durumlar, gen amplifikasyonu ve apoptosis gibi olayların sıklığı da analiz edilebilir. MN'lerdeki kromozomal parçacıklar, doğrudan DNA kırıkları ya da DNA sentezi sorunlarından orjinlenebilir. Tamir edilmiş kromozom kırıkları, bir disentrik kromozom ve bir asentrik parçacık oluşumuyla farklı oluşumlara sebep olabilir. Genel olarak disentrik kromozomların sentromerleri anafaz evresinde çekirdekler arasında nükleoplazmik köprü meydana getirir ve asentrik

fragment MN oluşumuna sebep olur. Asentrik fragmentlerin ve kromozom ya da kromatid kırıklarının ya da tüm kromozomun anafazda geri kalması nedeniyle meydana gelen MN'ler, telofaz evresindeki çekirdeklerin dışında kalan küçük çekirdekler şeklinde tespit edilmektedir (Şekil 9) (Aardema ve Kirsch-Volders 2001; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a).



Şekil 9. Sitokinezi bloklanmış MN yöntemi ile bazı sitogenetik bozuklukların analizi (Aardema ve Kirsch-Volders 2001; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a)

1.1.4.1.1. Mikronükleus Frekansının Hesaplanması

İnsan lenfositlerinin bloklanan sitokinezinde MN için detaylı hesaplama metodları Washington'da Genotoxicity International Work Shop'la tüm dünyaya belirtilmiştir. Buna göre, sitokinezi bloklanmış MN (CBMN) analizlerinde öncelikle hücre tipleri belirlenmelidir. Hücreler, mononükleus, binükleus, multinükleus, hücre tipinde ya da apoptotik ya da nekrotik tipe sahip olabilirler. Bir çekirdek bulunduran hücreler küçük sitoplazma, büyük nükleus şeklindedir. İki çekirdekli hücreler ise aynadaki görüntü gibi eş büyüklükteki iki hücre şeklindedir. Bu şekildeki hücreler nükleoplazmik köprüyle

birlikte bulunabilirler. Nükleuslar temas halinde ya da birbiri üstünde bulunabilir. Çok çekirdekli hücreler üç ya da dördlü halde, değişik ebatlardadırlar ve çok sayıda MN bulundurabilirler. Apoptotik hücrelerde ise sitoplazma bozulmamıştır. Kromatinler yoğunlaşmış, nükleer hatlar erken ya da geç apoptotik durumdadır. Nekrotik hücrelerde, sitoplazmik hatlar daha az belirgin ve sitoplazmada vakuoller bulunur. Erken nekrotik hücre fazında plazma membranının bozulup çekirdeğin çok az hasara uğramıştır, geç nekrotik hücre fazında ise sitoplazma bulunmamaktadır. Sitokinezi bloklanmış hücreler CBMN sıklığı için hesaplanırken aşağıdaki özellikleriyle karakterizedir (Fenech, 2000; Üstüner, 2011):

- MN sayımları BN' (Binükleus) da yapılmalı.
- MN'ların çapı ana çekirdeğin yarı çapının 1/16 ile 1/3 arasındaki değerlerde olmalı.
- MN'ın alanı ana çekirdeğin alanının 1/256 ile 1/9'u arasında olmalı.
- MN'lar ana çekirdeğe bağlı olmamalı.
- MN'ların çoğu çekirdeklerin arasındadır ancak aynı zamanda hücrelerin kutuplarında da olabilir.
- MN'ların yapıları küçük çekirdeklere benzer. Fakat kabarcıklar, noktalar MN olarak kabul edilmemektedir (Fenech, 2000).

Sensitif nükleer bölünme frekansını hesaplamak için nekroza ve apoptoza uğramış hücreler de sayılmalıdır. Bu nedenle daha hassas olan formüllere gerek duyulmuştur. Hücrelerin çoğunluğu yüksek toksik dozlardaki kimyasal ajanlarla ölmektedir. Hücre bölünme kinetiği kullanılarak modifiye edilen eşitlikte aşağıda belirtilen NDI (Nükleer Bölünme İndeksi) ve NSBİ (Nükleer Bölünme Sitotoksite İndeksi) hesaplamaları ile lenfositlerin mitojenik yanıtları saptanmaktadır (Fenech, 2000; Üstüner, 2011).

$$\text{NBİ: } [\text{MI} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{N}$$

$$\text{NSBİ: } [\text{Ap} + \text{Nec} + \text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{N}^*$$

Ap: Apoptotik hücre

Nec: Nekrotik hücre

M1: Bir çekirdekli hücre

M2: İki çekirdekli hücre

M3: Üç çekirdekli hücre

M4: Dört çekirdekli hücre

N: Toplam yaşayan hücre

N*: Toplam hücre (Yaşayan hücre + Apoptotik hücre + Nekrotik hücre)

NBİ: Nükleer Bölünme İndeksi

NSBİ: Nükleer Bölünme Sitotoksite İndeksi

1.1.4.2. Mitotik İndeks Testi








Bir hücre popülasyonundaki mitoz bölünme yapan hücrelerin sayısının saptanması ve bu sayının tüm hücrelere oranının hesaplanması ile mitotik indeks (MI) elde edilmektedir. Bu test, hücrelerin bölünme sıklığını yansıtmaktadır. MI'deki azalmayla doğru orantılı olarak büyüme ve gelişme olayları da gerilediğinden bu test büyüme gelişme oranını saptamada önemli bir araç olarak yarar sağlamaktadır (Çelik ve Ateş 2006). MI testi tüm canlı organizmalarda sitotoksisitenin değerlendirilmesi için kabul gören metottur. Sitotoksisitenin derecesi MI oranındaki düşüşle analiz edilmektedir. Yani uygulanan ajanın toksisitesi arttıkça MI değeri azalmaktadır. MI oranının % 50'den daha aşağılarda olması rutin olarak subletal özelliği temsil etmektedir. MI oranındaki düşüş % 50'nin üzerinde tespit edilirse araştırılan bileşiğin test organizması üzerinde letal özelliğe sahip olduğu belirtilebilir. Sitotoksisitesi söz konusu olan ajanlar çoğunlukla mitoz bölünme üzerine mikrotübüllerin sentezini engelleyerek işlev yaparlar (Fındıklı ve Türkoğlu 2010).

1.1.4.3. Kromozom Aberasyonları Testi












Kültür hücrelerinde yapılan kromozom aberasyon testi, dış faktörlerin mutajenite veya karsinojenite özelliklerini değerlendirmek için kullanılan hassas genotoksisite yöntemlerinden biridir. Kromozom aberasyonları, kromatidlerin kırılması veya kırılan kromatidlerin yeniden düzenlenerek birleşmesini ifade etmektedir. Bu tip değişiklikler genlerin sayı ve konumlarını değiştirerek yeni genotipik yapıların oluşmasına sebep olmaktadır. Genotoksik etkilerin derecesinin tespitinde kromozomal aberasyonlarının frekansı belirlenmekte ve bu analiz mitoz bölünmenin beş aşamasından biri olan, bütün kromozomların kolaylıkla gözlemlenebildiği metafaz safhasında uygulanmaktadır. Genotoksik etkisi incelenmek istenen bileşiğin verildiği kültür ortamındaki hücreler mitoz bölünmenin metafaz safhasında kolsemid veya kolşisin gibi ajanlara maruz bırakılır ve iğ ipliklerinin inhibisyonu aracılığıyla kromozomlar metafaz aşamasında sabitlenmektedir. Böylece kromozomal bozuklukların analizi kolaylaştırılmış olunur. Kromozomal anormalliklerin mekanizmasında hedef DNA'nın çift sarmal yapısının hasara uğratılması bulunmaktadır. Kromozom aberasyonlarının canlı bir organizmanın çeşitli doku ve hücre tiplerinde benzer niteliklere sahip olduğu kabul edildiğinden, periferik lenfosit kültür hücrelerindeki kromozomal aberasyon oranının vücutta genel kanserleşme riskini yansıtacağı umulmaktadır. Kromozomal aberasyonlar genellikle kromozomal kırıkları ve düşük oranda kararsız disentrik kromozomların oluşumu gibi kromozomal yeniden düzenlenmeleri içermektedir (Norppa ve ark., 2006).

Kromozom ve kromatid kırıkları, ring kromozom, fragment, kardeş kromatid birleşmesi, disentrik kromozom, inversiyon, izokromozom ve translokasyonlar yapısal kromozom aberasyonları olarak bilinmektedir. Kromozomlardaki yapısal anormallikler, anormalliklerin kromozomun bir ya da iki kromatidinde de tespit edilmesine göre iki tiptedir. Anormallik sadece bir kromatid ile ilgiliyse kromatid tip, her iki kromatidde saptanırsa kromozomal tip anormallikten söz edilir. Kromozom veya kromatid tipi aberasyonlar, mutajenik ajanların çeşitine ve uygulandıkları hücre döngüsü fazına göre şekillenmektedir. İyonize ışınlar, hücre döngüsünün G1 fazında etki gösterirse kromozomal tip anormallikler, G2 fazında etki gösterirse kromatid tip anormallikler ve hücre döngüsünün S (sentez) fazında etki gösterirse hem kromozom hem de kromatidle

İlgili anormallikler oluşabilmektedir (Natarajan ve Obe 1982). Kırılmaların ve yeniden birleşme yerlerinin olduğu kromozom tipi aberasyonlar her zaman her iki lokalde de kardeş kromatitleri etkiler (Şekil 10). Kırılmaların ve yeniden birleşme yerlerinin olduğu kromatid tipi aberasyonlar kardeş kromatitlerden sadece birini etkilemektedir (Şekil 11) (Huret ve ark., 2003).

Kromozomlar arasında değişim	Kromozom kolları içinde değişim	Kromozom kolları arasında değişim	Kromozom kırığı
 Disentrik	 Sentrik-halka	 İnterstitial delesyon	
 Resiplokal translokasyon	 Perisentrik inversiyon	 Parasentrik inversiyon	

Şekil 10. Kromozomal aberasyonlar (Huret ve ark., 2003)

Kromatidler arası değişim	Kromatid içinde kromatidler arası değişim		Kromatid içinde kromatidler içi değişim		Kromatid kırığı
	intra-chromatid	inter-chromatid	intra-chromatid	inter-chromatid	
 Disentrik	 Sentrik-halka	 Disentrik	 İnterstitiyal delesyon	 İzokromatid delesyon	
 Resiprokal translokasyon	 Perisentrik inversiyon	 Duplikasyon/Delesyon	 Parasentrik inversiyon	 Duplikasyon/Delesyon	

Şekil 11. Kromatid tipi aberasyonlar (Huret ve ark., 2003)

İyonlaştırıcı radyasyon gibi bazı aberasyon indükleyici ajanlar için metafazda geri kazanılan aberasyon tipi tedavi edilen hücrede kromozomların çoğalma durumunu yansıtmaktadır. Ancak, anormallikleri uyarabilen kimyasal ajanların büyük bir çoğunluğu ve ultraviyole ışığın sebep oldukları primer kromatid tipleri spontan veya yeniden sentezlenme yoluyla geri kazanılabilmektedir. İnterfazda bu kromatidler çoğaldıklarında sonraki jenerasyonlara aktarılabilmektedir. Böylece, herhangi bir klastojen ile "akut" bir uygulamayı takiben, sonraki nesillerdeki hayatta kalan hücrelerin sadece kromozom tipi değişiklikler taşıyabileceği bildirilmektedir (Savage, 1976; Huret ve ark., 2003).

Birçok çalışmada kimyasal maddelerin hücrede kromozom aberasyonlarını indükleme yoluyla sitotoksik özellikler gösterebileceği anlaşılmıştır. Madle ve ark. (1993), tarafından kromozom anormallikleri bulunan hücrelerde kromozom aberasyonlarının mitotik seçimle sıklıktan uzaklaştırılacağı ve bu nedenle MI değerinin azaltılacağı bildirilmektedir. Mitotik seçim, bölünme bakımından faal olan hücre popülasyonlarında kromozom anormallikleri taşıyan hücrelerin yok edilmesi biçiminde belirtilebilir. Bir anlamda mitotik seçim veya seleksiyon onarılamayacak düzeyde anormallikler bulunduran hücrelerin hücre siklusundan çıkarılması ve yaşamına son verilmesidir (Madle ve ark., 1993).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

Bu çalışmaya Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 01.03.2017/21 sayılı izni ile başlandı. Çalışmada test maddesi olarak *Vaccinium myrtillus* L. ve *Rubus idaeus* L.'nin topraküstü kısımlarının sıvı ekstraktları, materyal olarak da sağlıklı 6 erkek ve 6 kadından (20-25 yaş) alınan periferik kan örnekleri kullanıldı.

2.1.1. Kullanılan Maddeler ve Çözeltiler

2.1.1.1. Mitomisin-C

Mitomisin-C (MMC) (Katalog no: M0440-5mg, from *Sreptomycetes caespitosus*, Sigma) mavi/menekşe renkli, kristal halinde suda eriyebilen kimyasal bir maddedir. Hücreler üzerindeki çalışmalarda antineoplastik ve geniş spektruma sahip sitostatik (hücre bölünmesini bloke eden) ajan olarak kullanılmaktadır. MMC çözeltisi kültür ortamına (Chromosome Synchro P Complete Medium, EuroClone, İtalya) pozitif kontrol olarak ve diğer deneyler için 0.3 µg MMC/ml besiyeri olacak şekilde eklendi. Bu solusyon (pH=6-9), ışıktan korunarak ve 2-8°C arasında tutularak kullanılır.

2.1.1.2. Sitokalsin B

Sitokalsin B (Katalog no: C6762-1MG, Sigma)'den toz halinde iken 3 mg alınarak 3 ml distile su içerisinde çözüldü. Sonra 6 µg/mL besiyeri olacak şekilde kromozom mediumlarına ilave edildi.

2.1.1.3. Kolşisin

Kromozom preparatlarının elde edilmesinde hücre bölünmelerinin bloklanarak metafaz evrelerinin stabilizasyonu için kolşisin (Katalog no: C9754, Sigma) kullanıldı. Kolşisin çözeltisi distile su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µL olacak biçimde 5 ml'lik kromozom medyumuna eklendi.

2.1.1.4. *Vaccinium myrtillus* L. ve *Rubus idaeus* L. Ekstraktları

V. myrtillus L. veya *R. idaeus* L. (yaban mersini ve ahududu meyve ve yaprak kompleks sıvı ekstraktları, Katalog no: NM3010KEF.1, Talya Bitkisel Ürünler, Kepez-Antalya, Türkiye) ekstraktlarından 100 µL alınıp 400 µL aseton ile karıştırılarak homojen bir çözelti elde edildi.

2.1.1.5. Kromozom Medyumları

Kromozom medyumunu olarak steril tüpler içerisinde 5 mL besiyeri ve solusyonları (solusyon A ve B) olan hazır ticari kitler (Chromosome Synchro P Complete Medium, Katalog no: EKAMTSY 50M, İtalya) kullanıldı. Medium senkronizasyon solusyonları periferik kan lenfosit kültür çalışmaları için özel olarak tasarlanmış ve optimize edilmiş ticari ürünlerdir. Hücre bölünme evrelerinden metafaz sayısı ve kromozom kalitesinin sağlanmasında oldukça etkindir. Solusyon A kromozom medyumuna ekimden 48 saat sonra 100 µL ilave edilerek hücre bölünmesinin S fazında bloklanması sağlanır. İnkübasyondan yaklaşık 65 saat sonra ise solusyon B'den 100 µL eklenerek S fazında bloklanan hücrelerden 5 saat boyunca metafaz aşamasındaki hücrelerin çoğalması sağlanmış olunur. Çalışmada, EuroClone şirketinden satın alınan senkronizasyon solüsyonları kullanıldı.

2.1.1.6. Hipotonik Çözelti

Kristal toz halinde saf KCl'den % 0,4'lük KCl (Merck) stok çözeltisi hipotonik eriyik olarak kullanıldı. Solüsyon bidistile su ile bütün kromozom medyumlarına yetecek miktarda hazırlanarak 37°C'lik etüvde (NUVE EN 400) tutuldu.

2.1.1.7. Carnoy Fiksatif

Glasiyel asetik asit (Merck) ve absolüt metanolün (Sigma) 1/3 oranında karıştırılması ile edlde edildi ve kromozom aberasyon, mitotik indeks ve mikronükleus testleri için kullanıldı.

2.1.1.8. Sorensen Tampon Solüsyonu

Bu tampon solusyonu (Sorensen Buffer) tampon 1 ve tampon 2 olarak iki stok solusyon şeklinde hazırlandı. Sonra tampon 1 ve 2 solusyonları genotoksisite testleri esnasında farklı noktalarda amaca uygun olarak gerekli karışımlar halinde kullanıldı.

Tampon 1: 11.34 g KH_2PO_4 250 ml distile suda çözüldü (pH=4.8)

Tampon 2: 14.83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml distile suda çözüldü (pH=9.3)

2.1.1.9. Entellan

Preparatları hazırlarken lam ve lameli birbirine yapıştırmak için kullanılan solüsyonudur (Merck, Katalog no: 7961).

2.1.1.10. Giemsa

Sorensen Tampon Solusyonu içerisinde Giemsa boyasının (Merck, Katalog no: 45380) % 10'luk çözeltileri çalışmada preparatları boyamak için kullanıldı.

2.1.1.11. Heparin

Kan örnekleri alınırken antikoagülan olarak 5000 U/ml'lik heparinden (Biochrom, Almanya) hacime göre kullanıldı.

2.1.2. Kullanılan Laboratuvar Aletleri

2.1.2.1. Hassas Terazı

Dış fiziksel etkilere karşı kabinli koruma sağlayan ve 0,0001 g hassasiyetine sahip olan Precisa XB 220 A (Swiss) marka hassas terazisi kimyasalların tartılmasında kullanıldı.

2.1.2.2. Santrifüj

Çalışmada deney tüpü içerisinde ayırıştırma işlemleri için 5000 rpm'e kadar devri olan, zaman ayarlı ve 8 tüp kapasiteli Hettich EBA 20 (Almanya) marka santrifigatör kullanıldı.

2.1.2.3. Mikroskop

İmmersiyon objektifli ve koordinat cetveli Olympus CX21 ve Leica DM500 marka binoküler ışık mikroskobu preparatta görüntüleme işlemleri için kullanıldı. Fotoğraflar da Olympus marka mikroskopta kaydedildi.

2.1.2.4. Benmari

Benmari (Su banyosu, Termal) preparatlar boyanırken nem oranının uygun koşullarda tutulması için kullanıldı.

2.1.2.5. Vorteks

Deney tüpleri içerisinde homojen karışımlar elde etmek için Yellowline marka vorteks kullanıldı.

2.1.2.6. pH Metre

Sıvı karışımların pH'sını ölçmek için Selecta marka pH metre kullanıldı.

2.1.2.7. Etüv

Elektro.mag marka (M 420 BP İnkübatör) 0-100°C'ye ayarlanabilen etüv, deneyde hücrelerin kültüre edilmesinde ve bazı solüsyonların 37°C'ye ısıtılıp tutulmasında kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Kromozom Aberasyonlarının (KA, Chromosomal Aberration, CA) Tespiti

2.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Herhangi bir tedavi görmeyen ve sigara içmeyen yaşları 20-25 arasında olan sağlıklı 6 erkek ve 6 kadından elde edilen periferik kan örnekleri heparinli enjektörler vasıtasıyla alındı. Kan örneklerinden her kromozom medyumu için steril koşullarda 11 damla (yaklaşık 0.4 mL) sızdırılarak ilave edildi. Bu ekilen kromozom medyumları etüvde $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat süreyle hücrelerin çoğalması için bırakıldı. Deneysel gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

Grup I (Negatif kontrol grubu): Steril 5 mL kromozom medyumu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak ekildi. Ekimden 48 saat sonra 100 μL solüsyon A, 65 saat sonra 100 μL solüsyon B eklendi.

Grup II (Pozitif kontrol grubu): Steril 5 mL kromozom medyumu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak ekildikten 48 saat sonra 0.3 μg MMC/mL medyum ve 100 μL solüsyon A, 65 saat sonra 100 μL solüsyon B eklendi.

Grup III (*Vaccinium myrtillus* L. ekstraktı grubu): Steril 5 mL kromozom medyumu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak ekildikten 48 saat sonra 0.2 μL /mL *V. myrtillus* ekstraktı, 0.3 μg MMC/mL medyum ve 100 μL solüsyon A, 65 saat sonra 100 μL solüsyon B eklendi.

Grup IV (*Vaccinium myrtillus* L. ekstraktı grubu): Steril 5 mL kromozom medyumu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak

ekildikten 48 saat sonra 0.4 µL /mL *V. myrtillus* ekstraktı, 0.3 µg MMC/mL medyum ve 100 µL solüsyon A, 65 saat sonra 100 µL solüsyon B eklendi.

Grup V (*Vaccinium myrtillus* L. ekstraktı grubu): Steril 5 mL kromozom medyumu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak ekildikten 48 saat sonra 0.8 µL/mL *V. myrtillus* ekstraktı, 0.3 µg MMC/mL medyum ve 100 µL solüsyon A, 65 saat sonra 100µL solüsyon B eklendi.

Grup VI (*Vaccinium myrtillus* L. ekstraktı grubu): Steril 5 mL kromozom medyumu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak ekildikten 48 saat sonra 1.6 µL /mL *V. myrtillus* ekstraktı, 0.3 µg MMC/mL medyum ve 100 µL solüsyon A, 65 saat sonra 100 µL solüsyon B eklendi.

Grup VII (*Rubus idaeus* L. ekstraktı grubu): Steril 5 mL kromozom medyumu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak ekildikten 48 saat sonra 0.2 µL /mL *R. idaeus* ekstraktı, 0.3 µg MMC/mL medyum ve 100 µL solüsyon A, 65 saat sonra 100 µL solüsyon B eklendi.

Grup VIII (*Rubus idaeus* L. ekstraktı grubu): Steril 5 mL kromozom medyumu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak ekildikten 48 saat sonra 0.4 µL /mL *R. idaeus* ekstraktı, 0.3 µg MMC/mL medyum ve 100 µL solüsyon A, 65 saat sonra 100 µL solüsyon B eklendi.

Grup IX (*Rubus idaeus* L. ekstraktı grubu): Steril 5 mL kromozom medyumu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak ekildikten 48 saat sonra 0.8 µL /mL *R. idaeus* ekstraktı, 0.3 µg MMC/mL medyum ve 100 µL solüsyon A, 65 saat sonra 100 µL solüsyon B eklendi.

Grup X (*Rubus idaeus* L. ekstraktı grubu): Steril 5 mL kromozom medyumunu içeren tüplere steril şartlarda yaklaşık olarak 0.4 mL heparinize kan sızdırılarak ekildikten 48 saat sonra 1.6 µL /mL *R. idaeus* ekstraktı, 0.3 µg MMC/mL medyum ve 100 µL solüsyon A, 65 saat sonra 100 µL solüsyon B eklendi.

Kromozom medyumlarının inkübasyon süresinin (72 saat) bitiminden 2 saat öncesinde her bir tüp için 40 µL kolşisin çözeltisinden (0.06 µL kolşisin/mL medyum) ilave edildi ve karıştırıldı. Kromozomları bulduran medyum hücreleri 2 saat süre ile kolşisine maruz bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda tüpler 2000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüjlendi ve santrifügasyon sonrası üstteki süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Dip kısımda hücreleri barındıran 0.5-0.7 mL'lik kısım pipetajla karıştırılarak her bir tüp içerisine inkübatörde 37°C'de tutulan hipotonik çözeltiden 5 mL belli bir mesafeden damlatıldı. Oluşan süspansoid karışım pipetaj ile homojen duruma getirildikten sonra tüplerin ağzı kapatılarak 37°C'de 30 dk süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin bitiminde tüpler 2000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Her bir tüp içerisine yavaşça ve karıştırarak toplam hacim 5 mL olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edildi. Tüplerin her biri yaklaşık 25°C'de 2000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatantlar uzaklaştırıldı. Ardından tüplerin içerisine yeniden fiksatif ilave edildi ve bu proses 3 kere tekrarlandı. En son santrifügasyon işleminden sonra tüplerin dip kısmında 0.5-0.7 mL arasında sıvı bulunacak biçimde son süpernatant kısımları da uzaklaştırıldı. Her bir tüpün dip kısmında kalan hücrelerin dağılımı pipetaj ile homojen hale getirildi. Daha sonra pastör pipeti içerisine 4-5 damla bu süspansiyonun çekilerek yaklaşık 50 cm yükseklikten her bir lam üzerine 3 damla düşecek biçimde damlatılarak bırakıldı. Bu esnada damlaların lam üzerinde değişik kısımlara düşmesine özen gösterilerek hücrelerin birbiri üzerine gelmemesi sağlandı. Hazırlanmış olan tüm preparatlar kurumaları için yaklaşık 25°C sıcaklıkta 24 saat süre bekletildi (Gül ve ark., 2009; Gül ve ark., 2012).

2.2.1.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Olarak Hazırlanması

Kurumuş olan preparatların boyanması için yaklaşık 15 dk önce hazırlanmış % 10'luk giemsa boya solusyonu kullanıldı. Giemsa solusyonunun hazırlanması işleminde Tampon 1'den 5 mL ve Tampon 2'den 5 mL alınarak 10 mL giemsanın eklenmesi sonrası distile su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı (pH: 6.72). Elde edilen solusyon şale içine dik olarak yerleştirilip süzgeç kağıdı ile filtrelendi. Kuruması sağlanmış preparatlar doğrudan bu boya solusyonu içine bırakıldı ve yaklaşık 10 dk süre boyunca tutuldu. Preparatların üzerinde kalan fazla boyanın uzaklaştırılması için 3 ayrı kapta bulunan distile sudan sırayla geçirme işlemi uygulandı. Daha sonra ıslak olan preparatlar dikey pozisyonda yaklaşık 24 saat süre ile kurumaya bırakıldı. Preparatlar kuruduktan sonra daimi hale getirilmeleri için entellan ile kaplandı. Entellanın kurumasını takiben preparatların mikroskopik inceleme süreci başlatıldı.

2.2.1.3. Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimi preparatlar binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi altında gözlemlendi (X1000). Kromozomların uygun şekilde dağılım gösterdiği preparatlarda metafaz evresinde olan hücrelerden 100 tanesi belirlenerek kromozomal veya kromatid tipi değişiklikler tespit edilmeye çalışıldı. Tespit edilen anormal değişiklikler kayıt altına alınarak 100 hücre içerisindeki oranları hesap edildi. Gözlemlenen kromozom anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) göre analiz edildi (Paz-y-mino ve ark., 2002).

2.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Belirlenmesi

Vaccinium myrtillus L. ve *Rubus idaeus* L. bitkilerinin ekstraktlarının hücre siklusu evrelerinden mitoz bölünme üzerine etkilerini tespit etmek için mitotik indeks hesaplandı. Her bir grubun hazırlanan daimi preparatlarından toplam 2000 hücre

gözlemlendi ve bu hücrelerden metafaz aşamasında olanlar kayıt altına alındı. Metafazların yüzde oranı hesaplanarak mitotik indeks belirlendi.

2.2.3. Mikronükleus Testi

Mikronükleus testi Rothfuss ve ark. (2000) tarafından geliştirilen yöntemin modifiye edilmesiyle yapıldı (Rothfuss ve ark., 2000). Mikronükleusların varlığını tespit etmek için alınan kan örnekleri kromozom aberasyonlarının tespiti kapsamında açıklandığı şekilde gruplara ayrıldı. Hücre kültürü ortamına kan örnekleri damlatıldı ve 37°C'de 72 saat süre ile inkübasyonda tutuldu. Hücre kültürü ortamında iki çekirdekli hücreleri indüklemek amacıyla inkübasyon periyodunun sonuna 24 saat kala her bir tüp içerisine 6 µg/ml (besiyeri) oranında sitokalazin B ajanı eklendi. İnkübasyon periyodunun sonunda (72. saat) kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlendi ve süpernatantları uzaklaştırıldı. Tüplerin dibinde hücreleri bulunduran yaklaşık olarak 0.5-0.7 ml'lik karışım iyice pipetajla karıştırıldıktan sonra üzerine 37°C'de bekletilmiş hipotonik solüsyon eklendi. Hipotonik solüsyon 5 mL miktarında damla damla ve karıştırılarak ilave edildi. Tüpler kapatılarak etüvde 37°C'de 20 dk süre tutuldu. Daha sonra tüplerin 1200 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmesi sağlandı ve süpernatantları uzaklaştırıldı. Her bir tüp içerisine hipotonik solüsyonun uygulanmasındaki gibi yavaşça ve karıştırılarak toplam hacim 5 ml olacak biçimde soğuk fiksatif eklendi. Fiksatif 1/3 oranında asetik asit ve metanol ile elde edildi. Fiksatif uygulanan hücreler 10 dk süre ile 1200 rpm'de santrifüjlendi ve karışımların süpernatantları uzaklaştırıldı. Fiksatif ekleme ve santrifügasyon prosesi 3 kez yinelendi. Berraklaşmanın sağlandığı en son santrifügasyon işleminden sonra dipte yaklaşık olarak 0.5-0.7 mL sıvı olacak biçimde süpernatant uzaklaştırıldı. Pipetajla homojen karışım oluşturuldu ve pastör pipetine yaklaşık olarak 4-5 damla bu hücre süspansiyonundan vakumlandı. Lam üzerinde değişik bölgelere isabet edecek şekilde yaklaşık 20-30 cm gibi belli bir mesafeden bu süspansiyondan damlatıldı ve lam üzerinde yayılmış hücreler elde edildi. Elde edilen preparatlar kurumaları için 24 saat süre ile 25°C'de tutuldu.

2.2.3.1. Preparatların Boyanması

Preparatlar % 10'luk giemsa boyası solüsyonu ile boyandı. Kurumuş olan preparatlar doğrudan boya içerisine yerleştirildi ve solüsyon içinde yaklaşık olarak 10 dk süre bekletildi. Daha sonra preparatlar boya solüsyonundan çıkarıldı, ayrı ayrı 3 kaptaki bulunan distile sudan geçirilerek fazla boyalardan arındırıldı ve kurumaları için dikey pozisyonda tutuldu. Kurumuş olan preparatlar entellan ile kaplanarak daimi preparat oluşturuldu. Entellanın da kurumasını takiben bu preparatlar mikroskopta gözlemlendi.

2.2.3.2. Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimi preparatlar binoküler ışık mikroskopunda 40'lık objektif altında gözlemlendi. Her preparatdan 2000 adet iki çekirdekli hücre sayıldı ve bunlardan mikronükleus içeren hücreler belirlenerek yüzdeleri hesaplandı.

2.2.3.3. Nükleus Bölünme İndeksinin Hesaplanması

Nükleus Bölünme İndeksi (NBI)'nin hesaplama işlemi Fenech (2000) tarafından kaydedilen formüle göre yapıldı.

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

N1: bir çekirdekli,

N2: iki çekirdekli (Resim 18),

N3: üç çekirdekli (Resim 16) ve

N4: dört çekirdekli (Resim 17) hücre sayılarını simgelemektedir. NBI'nin belirlenmesi için her preparatta total 2000 hücre incelendi.

2.2.3.4. Nükleer Bölünme Sitotoksite İndeksinin Hesaplanması

Nükleer Bölünme Sitotoksite İndeksi (NSBİ)'nin hesaplaması da Fenech (2000) tarafından kaydedilen formüle göre yapıldı.

$$\text{NSBİ} = [\text{Ap} + \text{Nec} + \text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{N}$$

Nec: Nekrotik hücre (Resim 10)

Ap: Apoptotik hücre (Resim 11)

2.2.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Çalışmada amaçlara uygun olarak hücre, kromozom ve nükleuslarla ilgili tüm fotoğraflar Olympus marka mikroskop kullanılarak 10x100'lük büyütmede elde edildi.

2.3. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel hesaplamaları bilgisayar ortamında paket program (SPSS 20.0 for Windows, IBM) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında farklılıkların tespiti için çoklu karşılaştırma testlerinden olan Dunnett ve Tukey testleri kullanıldı. Doza bağlı olarak oluşan etkiler arasındaki ilişkileri belirlemek için tüm verilerin regresyon ve Spierman korelasyon analizleri yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. *Vaccinium myrtillus* L. ve *Rubus idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferel lenfosit kültüründe antimutajenik etkileri

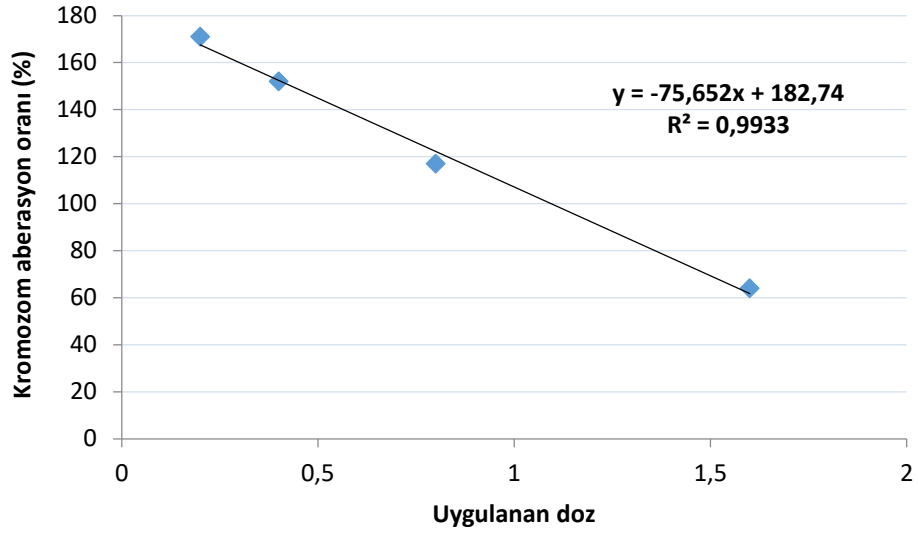
3.1.1. *Vaccinium myrtillus* L. ve *Rubus idaeus* L. ekstraktlarının MMC'ye karşı kromozom aberasyon oranları üzerine antimutajenik etkileri

V. myrtillus L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının insan periferel lenfosit kültürü kromozomlarında aberasyon oranları üzerine etkileri kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, poliploidi, disentrik kromozom ve kardeş kromatid birleşmesi durumları değerlendirilerek saptandı. Ekstrakt gruplarında saptanan kromozomal aberasyon oranları pozitif kontrolle karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak önemli ($P < 0.001$) bulundu ve *V. myrtillus* 'un en düşük dozu olan 0.2 $\mu\text{L} / \text{mL}$ 'lik grubunda pozitif kontrol grubu olan MMC grubuna göre aberasyon oranlarını azaltmadığı ancak her iki ekstrakt tipinin diğer doz gruplarında aberasyonların önemli oranda azaldığı tespit edildi (Tablo 1, Şekil 12 ve 13).

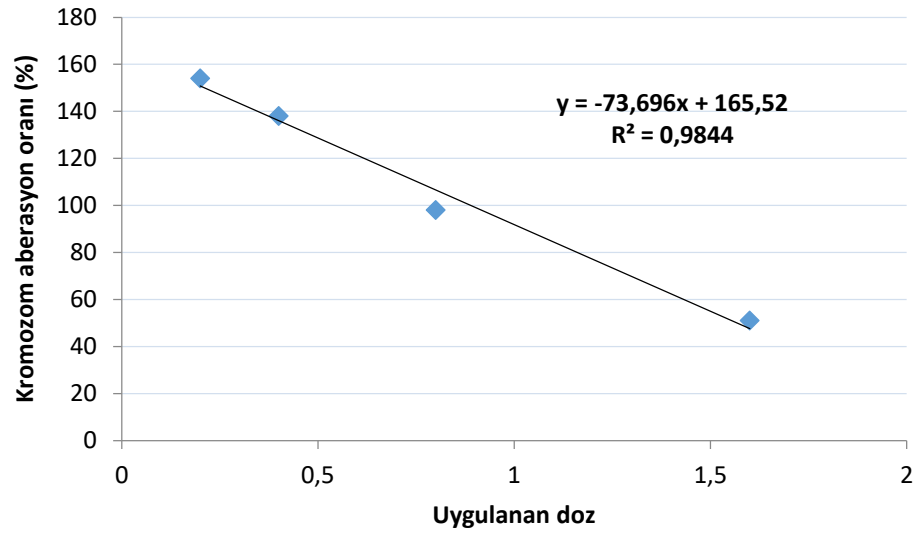
Tablo 1. *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferel lenfosit kültürü kromozomlarında aberasyon oranları üzerine etkileri

Gruplar	Doz (24 h)	KK	Kk	F	P	DSK	KKB	Toplam (%)	±SEM (%)
Negatif Kontrol	-	0	1	1	0	0	0	2	0,07
MMC (µg/mL)	0.3	73	86	12	2	5	28	206	0,79
<i>V. myrtillus</i> (µL /mL)+ MMC (µg/mL)	0,2	70	83	5	1	3	17	179	1,06*
	0,4	67	71	3	0	0	11	152	0,63*
	0,8	62	48	0	0	1	6	117	0,44*
	1,6	49	11	0	0	0	4	64	0,41*
<i>R. idaeus</i> (µL /mL))+ MMC (µg/mL)	0,2	67	76	1	0	1	9	154	0,45*
	0,4	63	64	0	1	0	10	138	0,50*
	0,8	50	45	0	0	0	3	98	0,33*
	1,6	36	11	0	0	0	4	51	0,41*

KK: Kromozom kırığı, **Kk:** Kromatid kırığı, **F:** Fragment, **P:** poliploidi, **DSK:** Disentrik kromozom **KKB:** Kardeş kromatid birleşmesi **MMC:** Mitomisin-C, **±SEM:** Ortalamanın standart hatası.. *: Kontrolle karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak önemli (P< 0.001).



Şekil 12. *V. myrtillus* L. ekstraktlarının farklı dozları ile birlikte 0.3 µg/mL MMC uygulanmış insan periferal lenfosit kültürü kromozom aberasyon oranları arasındaki regresyon



Şekil 13. *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozları ile birlikte 0.3 µg/mL MMC uygulanmış insan periferal lenfosit kültürü kromozom aberasyon oranları arasındaki regresyon

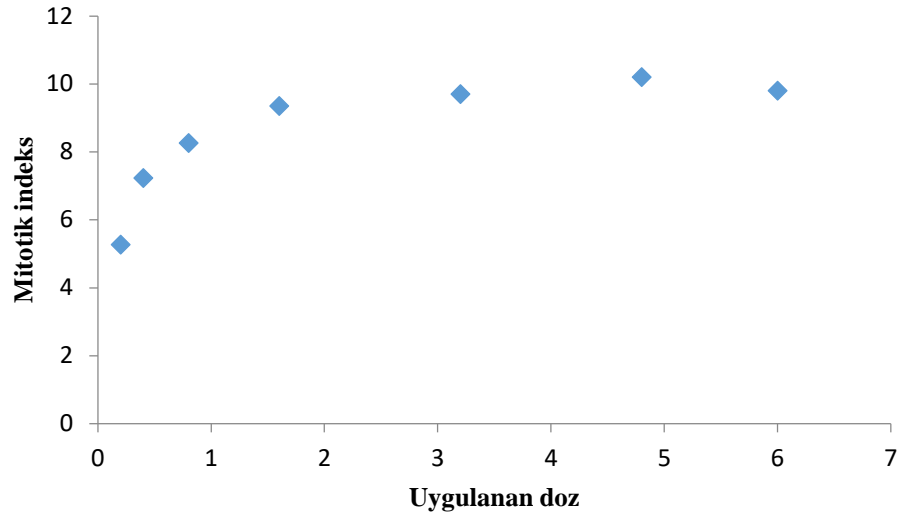
3.1.2. *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının MMC'ye karşı mitotik indeks üzerine etkileri

V. myrtillus L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının insan periferik lenfosit kültüründe 24 saat uygulama sonrasında mitotik indeks değerlerinin pozitif kontrol grubuna göre önemli oranda artmış olduğu belirlendi. *V. myrtillus* L. ekstraktlarının Mİ üzerine *R. idaeus* L. ekstraktlarından daha etkili olduğu da saptandı ($P < 0.001$) (Tablo 2). Mİ değerleri ile kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, poliploidi, disentrik kromozom ve kardeş kromatid birleşmesi durumlarını içeren kromozom aberasyon oranları arasında güçlü negatif korelasyon ilişkileri de tespit edildi ($P < 0.01$) (Tablo 5). Doz belirleme aşamasında *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozları ile birlikte 1 µg/mL MMC uygulanmış insan periferik lenfosit kültüründe mitotik indeks düzeyleri değerlendirildiğinde Mİ üzerine artırıcı etkilerin yoğun görüldüğü konsantrasyonlardaki dozlar (0.2, 0.4, 0.8 ve 1.6 µL/5 mL besiyeri için) uygulamalara dahil edildi (Şekil 14 ve 15).

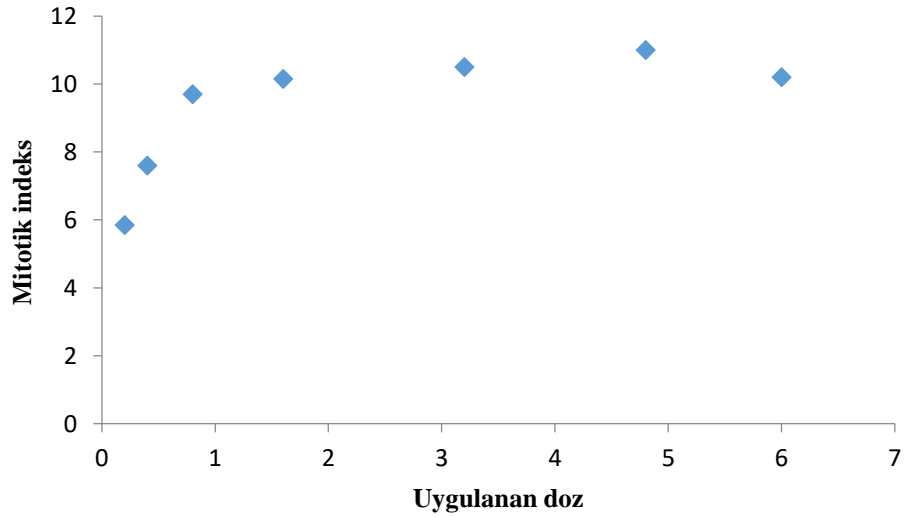
Tablo 2. *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferik lenfosit kültüründe mitotik indeks üzerine etkileri

Gruplar	Doz (24 h)	Mİ (% X)	± SEM (%)
Negatif Kontrol	-	7,37	0,07
MMC (µg/mL)	0.3	2,98	0,21
<i>V. myrtillus</i> (µL /mL) + MMC (µg/mL)	0,2	6,23**	0,95
	0,4	5,14**	0,14
	0,8	5,56**	0,38
	1,6	6,71**	0,38
<i>R. idaeus</i> (µL /mL) + MMC (µg/mL)	0,2	3,95	0,10
	0,4	4,68*	0,19
	0,8	4,34*	0,14
	1,6	4,69*	0,15

MMC: Mitomycine-C (pozitif kontrol), Mİ: Mitotik indeks, X: 2000 hücrede yüzde Mİ, ±SEM: Ortalamanın standart hatası, X* ve X**: Pozitif kontrolle karşılaştırıldığında fark Tukey testine göre istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$ ve $P < 0.001$).



Şekil 14. Doz belirleme aşamasında *V. myrtillus* L. ekstraktlarının farklı dozları ile birlikte 0.3 µg/mL MMC uygulanmış insan periferal lenfosit kültüründe mitotik indeks değerleri



Şekil 15. Doz belirleme aşamasında *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozları ile birlikte 0.3 µg/mL MMC uygulanmış insan periferal lenfosit kültüründe mitotik indeks değerleri

3.1.3. *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının MMC'ye karşı mikronükleus indeksi üzerine etkileri

V. myrtillus L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının mikronükleus indeksi üzerine etkileri hücrelerde nükleus ve binükleer hücrelerde mikronükleus sayıları 24 saat uygulama sonrası 2000 hücre içerisinde belirlenip yüzdeleri alınarak hesaplandı. Bun göre MN sayısının pozitif kontrol olan MMC grubuna göre her iki bitki ekstraktının tüm dozlarıyla istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı saptandı ($P < 0.001$) (Tablo 3). Ancak bu azalmaların 0.2 ve 0.4 $\mu\text{L} / \text{mL}$ 'lik dozlara göre 0.8 ve 1.6 $\mu\text{L} / \text{mL}$ 'lik dozlarla daha etkili olduğu anlaşıldı. 2, 3 ve 4 nükleuslu hücre sayıları ile Mİ değerleri arasında pozitif korelasyon, 1 ve 2 MN'lu hücre sayıları ile Mİ değerleri arasında negatif korelasyon ilişkisi olduğu belirlendi ($P < 0.001$). 2 nükleuslu hücre sayısı ile kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, poliploidi, disentrik kromozom ve kardeş kromatid birleşmesi durumlarını içeren kromozom aberasyon oranları arasında güçlü negatif korelasyon ilişkileri saptanırken ($P < 0.001$), 1 ve 2 MN'lu hücre sayıları ile aynı parametreleri içeren kromozom aberasyon oranları arasında güçlü pozitif korelasyon ilişkileri de tespit edildi ($P < 0.001$) (Tablo 5).

Tablo 3. *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferel lenfosit kültüründe mikronükleus indeksi üzerine etkileri

Gruplar	Doz (24 h)	Hücrelerde Nükleus Sayıları				BN Hücrelerde MN Sayıları				MN/hücre (%) ± SEM
		1	2	3	4	1	2	3	4	
Negatif Kontrol	-	725	1022	71	182	1	0	0	0	0,05±0,01
MMC (µg/mL)	0,3	1315	617	34	41	155	27	2	0	9,20±0,11
<i>V. myrtillus</i> (µL /mL)) + MMC (µg/mL)	0,2	1121	719	69	93	19	6	1	0	1,30±0,05*
	0,4	1143	730	61	66	20	4	0	0	1,20±0,06*
	0,8	1157	734	51	56	6	1	0	0	0,35±0,03*
	1,6	1179	724	48	52	4	1	0	0	0,25±0,02*
<i>R. idaeus</i> (µL /mL)) + MMC (µg/mL)	0,2	2602	752	63	88	24	7	0	0	1,55±0,05*
	0,4	1134	754	46	72	15	5	0	0	1,00±0,05*
	0,8	1175	724	46	55	3	0	0	0	0,15±0,01*
	1,6	1188	741	39	53	2	0	0	0	0,10±0,01*

MMC. Mitomisin-C (Pozitif kontrol), **BN:** Binükleer, **SEM:** Ortalamannın standart sapması, **X*:** Pozitif kontrole karşılaştırıldığında fark Dunnett testine göre istatistiksel olarak önemli (P< 0.001).

3.1.4. *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının MMC'ye karşı nükleer bölünme ve nükleer sitotoksik bölünme indeksi üzerine etkileri

V. myrtillus L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının NBİ üzerine etkileri 1, 2, 3 ve 4 çekirdekli hücre sayıları sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 ile çarpılarak toplam sayılan hücre ile oranlanarak değerlendirildi. NSBİ üzerine etkileri ise apoptotik ve nekrotik hücre sayılarının eklenmesiyle değerlendirildi. Hem NBİ hem de NSBİ'nin *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının tüm doz gruplarında negatif kontrol grubuna göre düşük, pozitif kontrol grubuna göre ise yüksek düzeylerde olduğu tespit edildi. Pozitif kontrol grubu olan MMC grubunda ise bu düzeylerin negatif kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptandı ($P < 0.001$) (Tablo 4). Hem NBİ hem de NSBİ ile Mİ arasında güçlü pozitif korelasyon ilişkisi saptanırken ($P < 0.001$), NBİ ile kromozom kırığı, kromatid kırığı ve kardeş kromatid birleşmesi durumlarını içeren kromozom aberasyon oranları arasında güçlü negatif korelasyon, NSBİ ile kromozom kırığı ve kardeş kromatid birleşmesi durumlarını içeren kromozom aberasyon oranları arasında güçlü negatif korelasyon ilişkileri tespit edildi ($P < 0.001$) (Tablo 5).

Tablo 4. *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı insan periferal lenfosit kültüründe nükleer bölünme ve nükleer sitotoksik bölünme indeksi üzerine etkileri

Gruplar	Doz (24 h)	NBİ	AHS	NHS	NSBİ
Negatif Kontrol	-	1,87±0,04	0	0	1,87±0,04
MMC (µg/mL)	0.3	1,41±0,04**	36	48	1,45±0,03* *
<i>V. myrtillus</i> (µL /mL))+ MMC (µg/mL)	0,2	1,55±0,05*	8	13	1,56±0,05*
	0,4	1,56±0,03*	5	3	1,57±0,03*
	0,8	1,58±0,04*	4	3	1,59±0,04*
	1,6	1,54±0,04*	1	2	1,54±0,05*
<i>R. idaeus</i> (µL /mL))+ MMC (µg/mL)	0,2	1,52±0,05*	8	12	1,53±0,04*
	0,4	1,55±0,04*	3	3	1,56±0,02*
	0,8	1,53±0,03*	2	1	1,53±0,02*
	1,6	1,56±0,02*	1	0	1,56±0,02*

MMC: Mitomisin-C (Pozitif kontrol), **NBİ:** Nükleer bölünme indeksi, **AHS:** Apoptotik hücre sayısı, **NHS:** Nekrotik hücre sayısı, **NSBİ:** Nükleer sitotoksik bölünme indeksi, **SEM:** Ortalamanın standart sapması, **X*** ve **X**:** Negatif kontrolle karşılaştırıldığında fark Dunnett testine göre istatistiksel olarak önemli (sırasıyla; P< 0.01 ve P< 0.001).

Tablo 5. İnsan periferal lenfosit kültüründe *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri

		Mitotik İndeks	Kromozom Kırığı	Kromatid Kırığı	Disentrik Kromozom	Fragment	Poliploidi	KK Birleşmesi
Kromozom Kırığı	r	-,512**						
	P	,000						
Kromatid Kırığı	r	-,384**	,778**					
	P	,002	,000					
Disentrik Kromozom	r	-,371**	,481**	,692**				
	P	,003	,000	,000				
Fragment	r	-,374**	,450**	,690**	,890**			
	P	,003	,000	,000	,000			
Poliploidi	r	-,313*	,403**	,432**	,693**	,680**		
	P	,015	,001	,001	,000	,000		
KK Birleşmesi	r	-,437**	,695**	,797**	,852**	,899**	,741**	
	P	,000	,000	,000	,000	,000	,000	
<i>R. idaeus</i> Dozları	r	,140	-,182	-,595**	-,758**	-,852**	-,493**	-,688**
	P	,313	,187	,000	,000	,000	,000	,000
<i>V. myrtillus</i> Dozları	r	,140	-,214	-,603**	-,811**	-,889**	-,564**	-,751**
	P	,311	,120	,000	,000	,000	,000	,000
Bir Nükleuslu Hücre Sayısı	r	-,153	,186	,198	,051	,008	-,023	,066
	P	,244	,154	,130	,697	,952	,864	,615
İki Nükleuslu Hücre Sayısı	r	,489**	-,740**	-,461**	-,426**	-,409**	-,258*	-,548**
	P	,000	,000	,000	,001	,001	,047	,000
Üç Nükleuslu Hücre Sayısı	r	,389**	-,209	,095	-,125	-,167	-,277*	-,231
	P	,002	,108	,471	,339	,203	,032	,076

MN: Mikronükleus, **KK**: Kardeş kromatid, **r**: Korelasyon katsayısı, * ve **: Korelasyon ilişkisinin istatistiksel önemi (P< 0.05 ve P< 0.01), -: Negatif korelasyon ilişkisi.

Tablo 5 (Devam). İnsan periferal lenfosit kültüründe *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri

		Mitotik İndeks	Kromozom Kırığı	Kromatid Kırığı	Disentrik Kromozom	Fragment	Poliploidi	KK Birleşmesi
Dört Nükleuslu Hücre Sayısı	r	,483**	-,675**	-,232	-,195	-,180	-,169	-,343**
	P	,000	,000	,075	,135	,168	,196	,007
Bir MN'li Hücre Sayısı	r	-,518**	,445**	,592**	,851**	,896**	,676**	,843**
	P	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
İki MN'li Hücre Sayısı	r	-,517**	,491**	,645**	,832**	,889**	,678**	,865**
	P	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
Üç MN'li Hücre Sayısı	r	-,229	,250	,358**	,482**	,570**	,391**	,502**
	P	,078	,054	,005	,000	,000	,002	,000
Dört MN'li Hücre Sayısı	r	-,003	-,148	,013	,177	,215	,139	,112
	P	,979	,258	,920	,176	,098	,289	,393
Apoptoz	r	-,479**	,481**	,647**	,847**	,883**	,598**	,870**
	P	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
Nekroz	r	-,496**	,480**	,660**	,902**	,914**	,654**	,868**
	P	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
MN/(%)	r	-,521**	,455**	,606**	,855**	,904**	,682**	,854**
	P	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
NBİ	r	,557**	-,708**	-,440**	-,412**	-,382**	-,250	-,514**
	P	,000	,000	,000	,001	,003	,054	,000
NSBİ	r	,535**	-,693**	-,396**	-,346**	-,313*	-,201	-,453**
	P	,000	,000	,002	,007	,015	,123	,000

MN: Mikronükleus, KK: Kardeş kromatid, r: Korelasyon katsayısı, * ve **: Korelasyon ilişkisinin istatistiksel önemi (P< 0.05 ve P< 0.01), -: Negatif korelasyon ilişkisi.

Tablo 5 (Devam). İnsan periferal lenfosit kültüründe *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri

		<i>R. idaeus</i> Dozları	<i>V. myrtillus</i> Dozları	Bir Nükleuslu Hücre Sayısı	İki Nükleuslu Hücre Sayısı	Üç Nükleuslu Hücre Sayısı	Dört Nükleuslu Hücre Sayısı	Bir MN'li Hücre Sayısı
<i>V. myrtillus</i> Dozları	r	,961**						
	P	,000						
Bir Nükleuslu Hücre Sayısı	r	,086	,094					
	P	,536	,498					
İki Nükleuslu Hücre Sayısı	r	,162	,193	-,165				
	P	,243	,162	,207				
Üç Nükleuslu Hücre Sayısı	r	,016	,082	,111	,504**			
	P	,906	,556	,400	,000			
Dört Nükleuslu Hücre Sayısı	r	-,004	,016	-,122	,763**	,510**		
	P	,976	,909	,353	,000	,000		
Bir MN'li Hücre Sayısı	r	-,697**	-,750**	,047	-,443**	-,309*	-,289*	
	P	,000	,000	,722	,000	,016	,025	
İki MN'li Hücre Sayısı	r	-,650**	-,708**	,231	-,441**	-,295*	-,270*	,934**
	P	,000	,000	,075	,000	,022	,037	,000
Üç MN'li Hücre Sayısı	r	-,422**	-,471**	-,026	-,332**	-,137	-,094	,581**
	P	,001	,000	,845	,009	,295	,476	,000
Dört MN'li Hücre Sayısı	r	-,223	-,231	-,042	,241	,128	,145	,221
	P	,106	,093	,750	,063	,328	,268	,090

MN: Mikronükleus, KK: Kardeş kromatid, r: Korelasyon katsayısı, * ve **: Korelasyon ilişkisinin istatistiksel önemi (P< 0.05 ve P< 0.01), -: Negatif korelasyon ilişkisi.

Tablo 5 (Devam). İnsan periferal lenfosit kültüründe *V. myrtilus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri

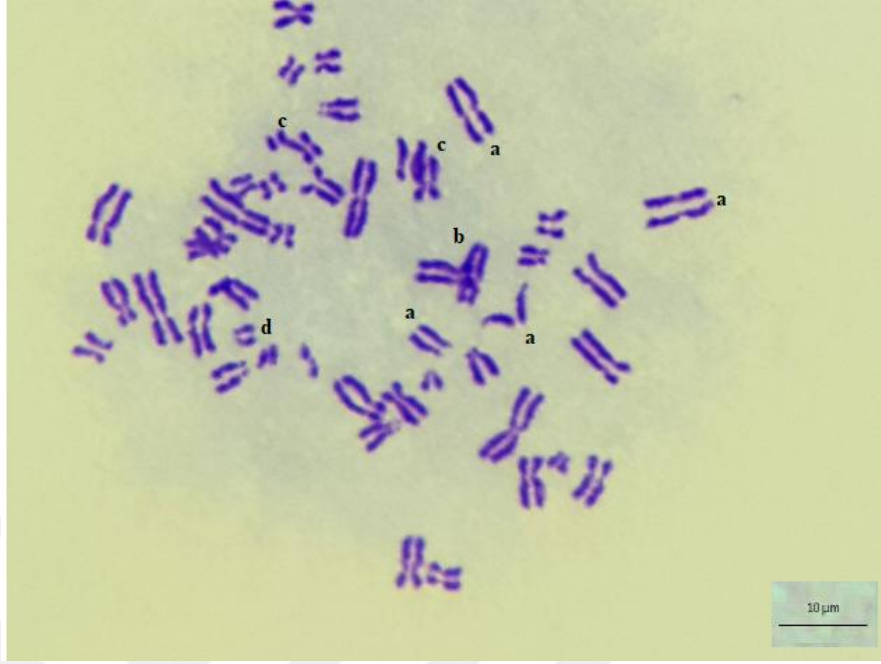
		<i>R. idaeus</i> Dozları	<i>V. myrtilus</i> Dozları	Bir Nükleuslu Hücre Sayısı	İki Nükleuslu Hücre Sayısı	Üç Nükleuslu Hücre Sayısı	Dört Nükleuslu Hücre Sayısı	Bir MN'li Hücre Sayısı
Apoptoz	r	-,701**	-,759**	,025	-,479**	-,347**	-,277*	,941**
	P	,000	,000	,847	,000	,007	,032	,000
Nekroz	r	-,689**	-,758**	,078	-,479**	-,243	-,254*	,964**
	P	,000	,000	,552	,000	,061	,050	,000
MN/(%)	r	-,696**	-,751**	,075	-,447**	-,308*	-,288*	,999**
	P	,000	,000	,571	,000	,017	,026	,000
NBİ	r	,104	,162	-,136	,895**	,514**	,687**	-,445**
	P	,455	,243	,300	,000	,000	,000	,000
NSBİ	r	,044	,098	-,136	,887**	,509**	,691**	-,374**
	P	,755	,480	,299	,000	,000	,000	,003

MN: Mikronükleus, **KK:** Kardeş kromatid, **r:** Korelasyon katsayısı, * ve **: Korelasyon ilişkisinin istatistiksel önemi (P< 0.05 ve P< 0.01), -: Negatif korelasyon ilişkisi.

Tablo 5 (Devam). İnsan periferel lenfosit kültüründe *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının MMC'ye karşı değerlendirilen parametreleri arasındaki korelasyon ilişkileri

		İki MN'li Hücre Sayısı	Üç MN'li Hücre Sayısı	Dört MN'li Hücre Sayısı	Apoptotik Hücreler	Nekrotik Hücreler	MN/(%)	NBİ
Üç MN'li Hücre Sayısı	r	,447**						
	P	,000						
Dört MN'li Hücre Sayısı	r	,205	,114					
	P	,117	,384					
Apoptoz	r	,927**	,485**	,201				
	P	,000	,000	,123				
Nekroz	r	,922**	,644**	,198	,922**			
	P	,000	,000	,129	,000			
MN/(%)	r	,950**	,578**	,223	,946**	,968**		
	P	,000	,000	,087	,000	,000		
NBİ	r	-,433**	-,359**	,211	-,466**	-,489**	-,449**	
	P	,001	,005	,106	,000	,000	,000	
NSBİ	r	-,364**	-,319*	,238	-,396**	-,419**	-,377**	,997**
	P	,004	,013	,067	,002	,001	,003	,000

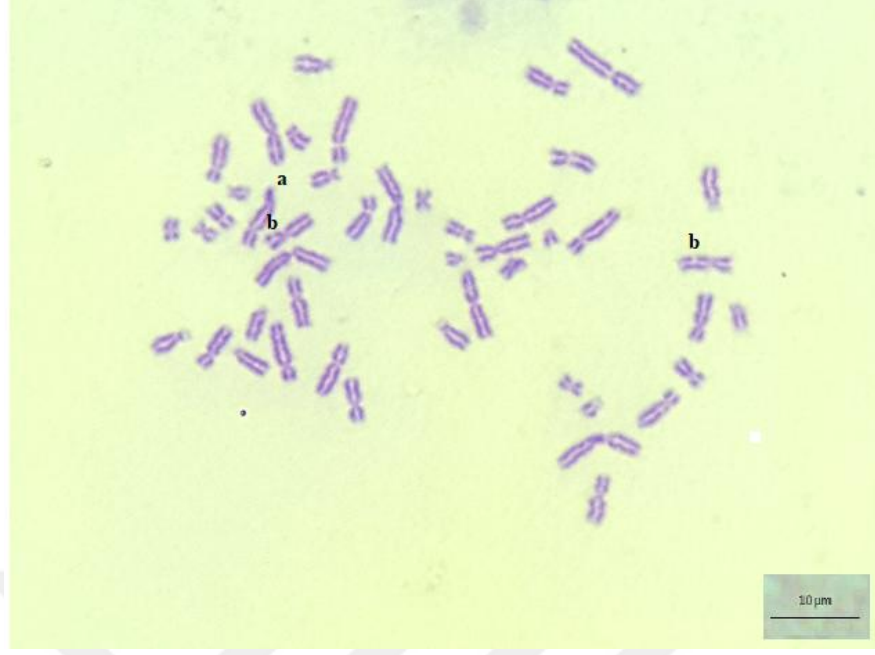
MN: Mikronükleus, KK: Kardeş kromatid, r: Korelasyon katsayısı, * ve **: Korelasyon ilişkisinin istatistiksel önemi (P< 0.05 ve P< 0.01), -: Negatif korelasyon ilişkisi.



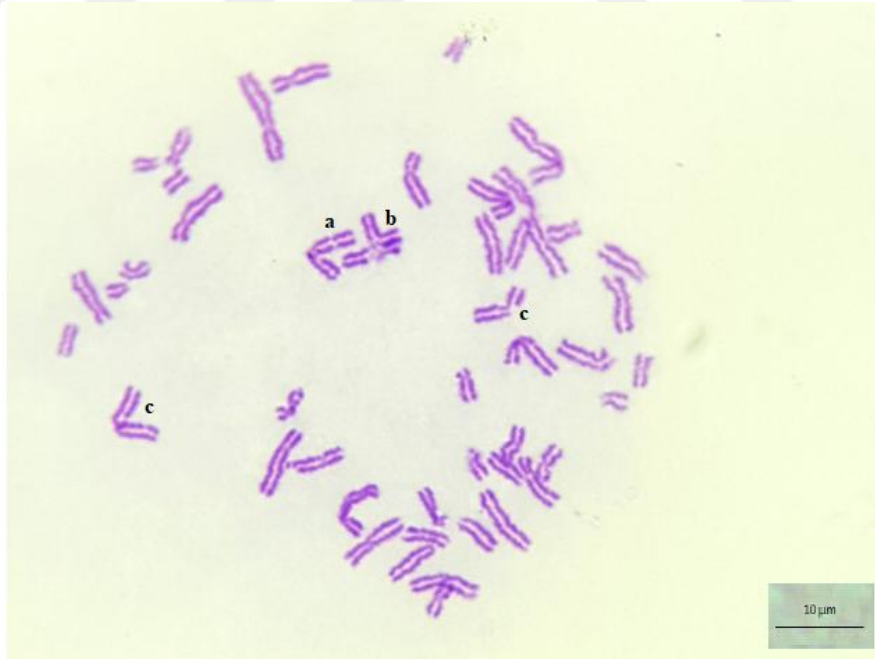
Resim 3. MMC (0.3 µg/mL; pozitif kontrol) grubunda yoğun asentrik kromozomlar ve kromatid ayrılması (a), resiprokal translokasyon (b), kromatid kırığı (c) ve ring kromozom (d) (X1000).



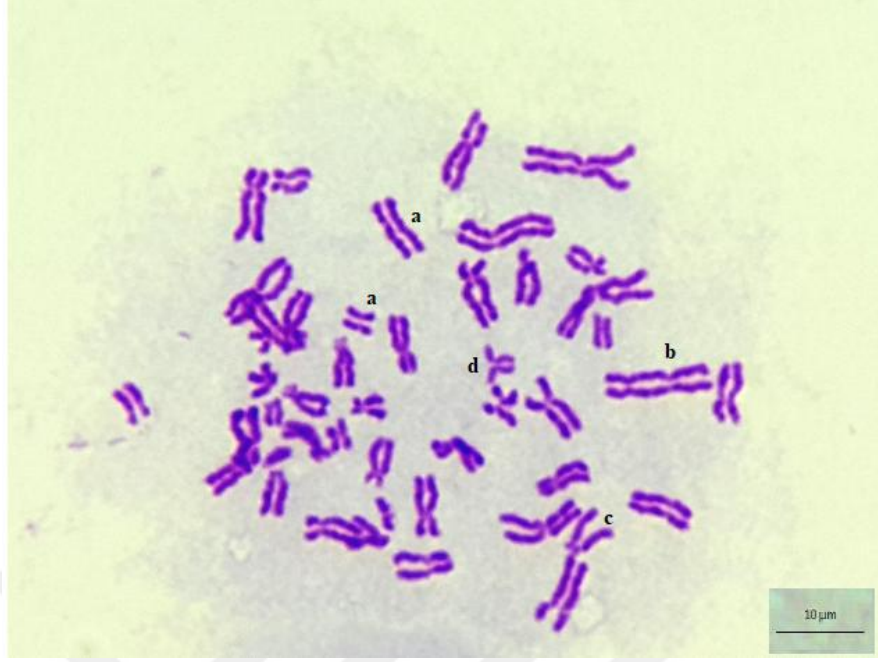
Resim 4. *V. myrtillus* ekstraktı (0,2 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferik lenfosit hücre kültüründe resiprokal translokasyon (a), kromozom kırığı (b), kromatid kırığı (c) ve fragment (d) (X1000).



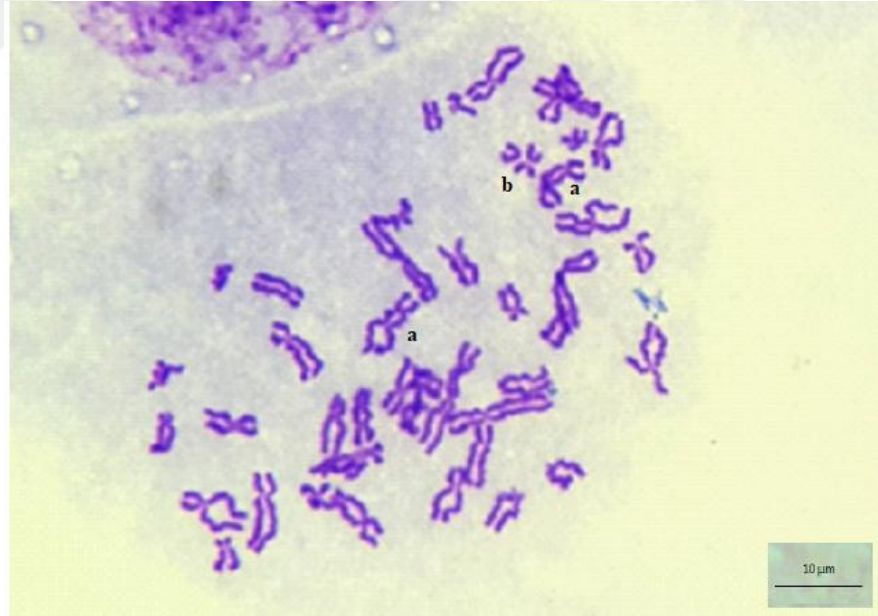
Resim 5. *V. myrtillus* ekstraktı (0,4 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferel lenfosit hücre kültüründe kromatid birleşmesi (a) ve kromatid kırığı (b) (X1000).



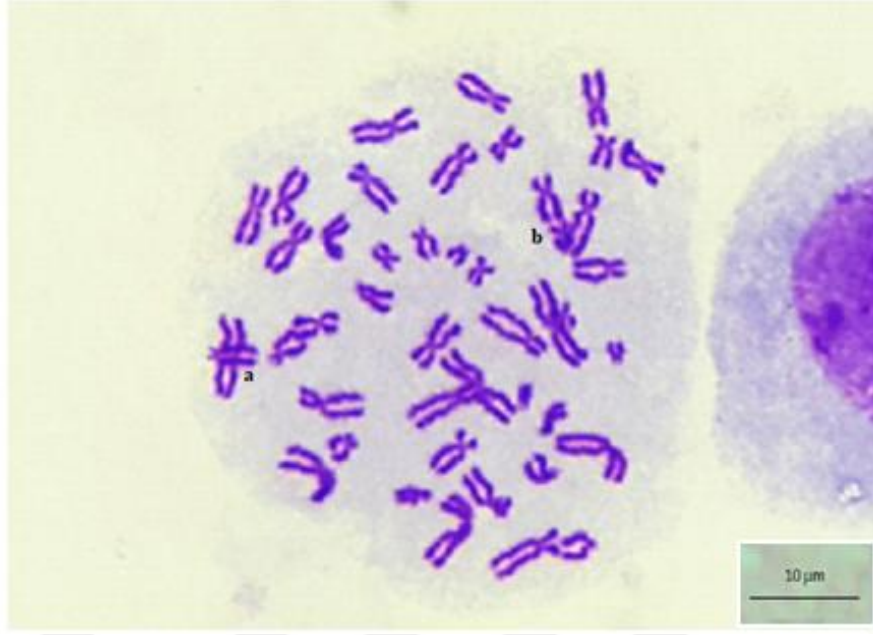
Resim 6. *V. myrtillus* ekstraktı (0,8 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferel lenfosit hücre kültüründe kromozom kırığı (a), resiprokal translokasyon (b) ve kromatid kırığı (c) (X1000).



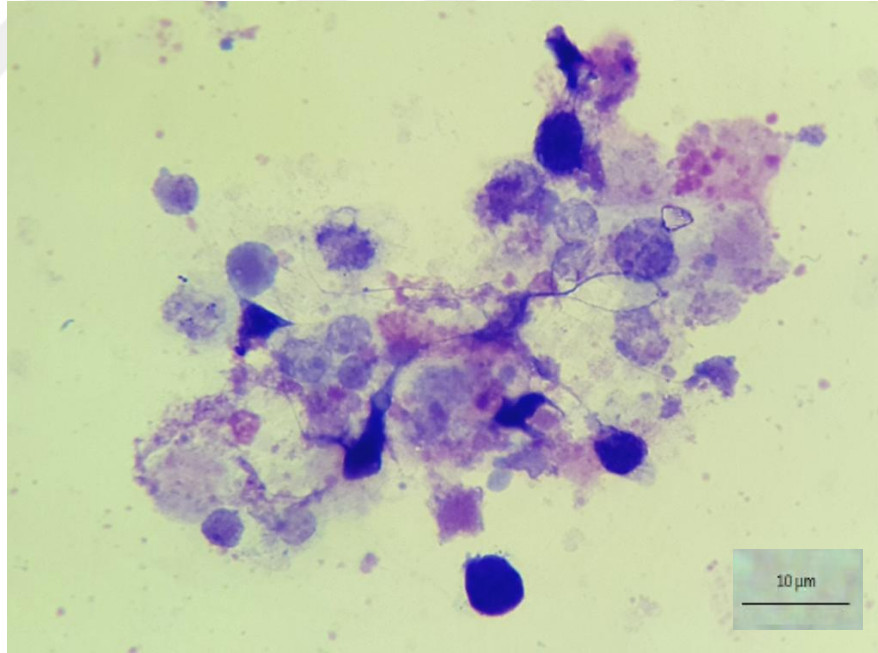
Resim 7. *R. idaeus* ekstraktı (0,2 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferel lenfosit hücre kültüründe asentrik ve disentrik kromozomlar (a ve b), kromozom kırığı (c) ve kromatid ayrılması (d) (X1000).



Resim 8. *R. idaeus* ekstraktı (0,4 µL /mL) + MMC (0.3 µg/mL) uygulanan insan periferel lenfosit hücre kültüründe disentrik kromozom (a) ve fragment (b) (X1000).



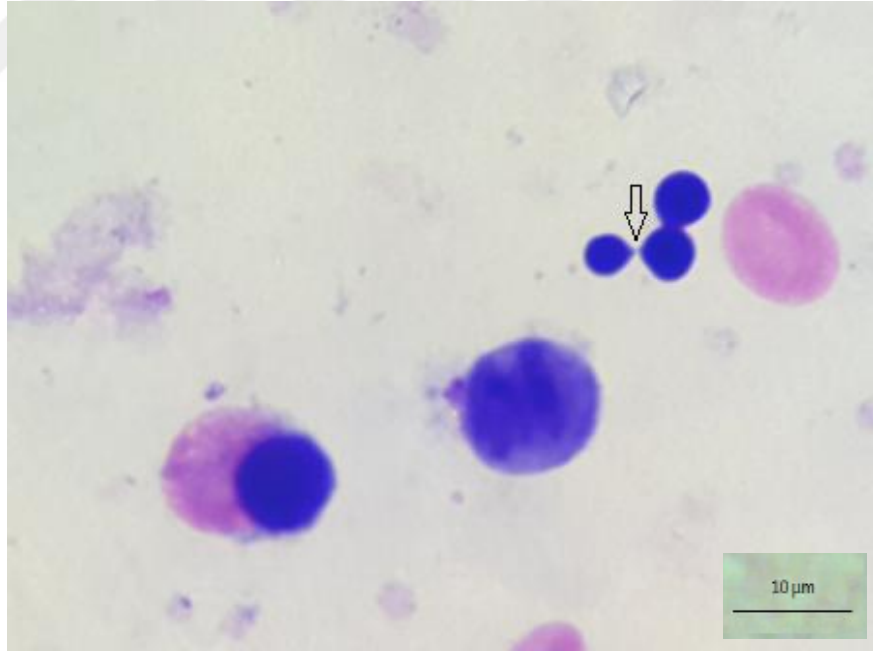
Resim 9. *R. idaeus* ekstraktı (0,4 μL /mL) + MMC (0.3 μg/mL) uygulanan insan periferel lenfosit hücre kültüründe resiprokal translokasyon (a) ve kromatid kırığı (b) (X1000).



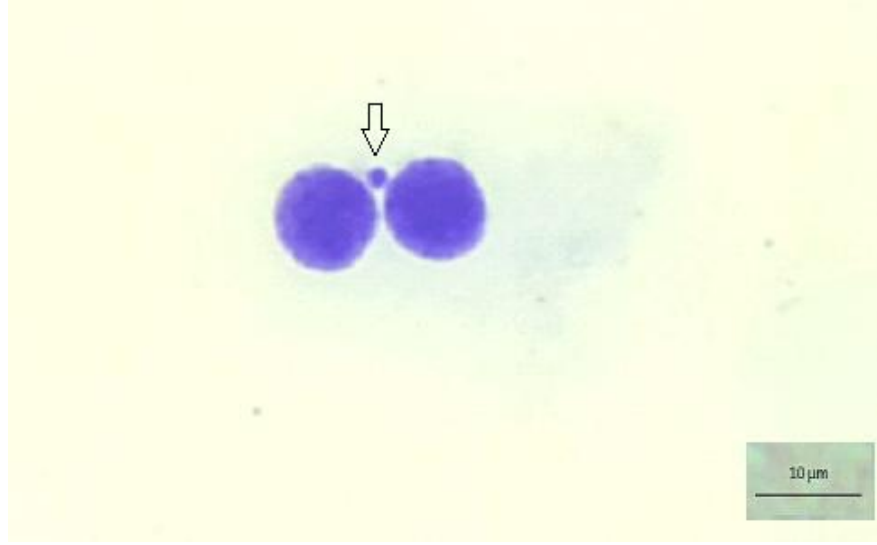
Resim 10. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe nekrotik hücreler (X1000)



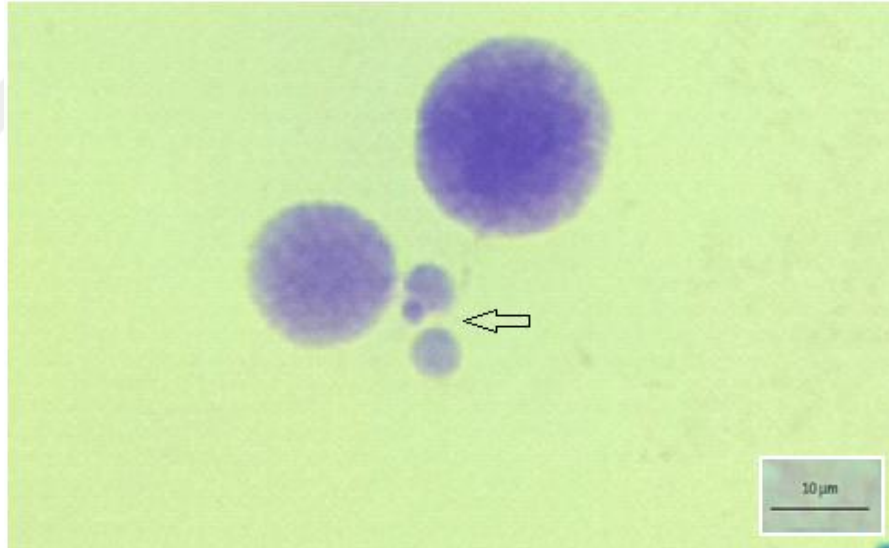
Resim 11. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe apoptoza giden bir hücre (X1000)



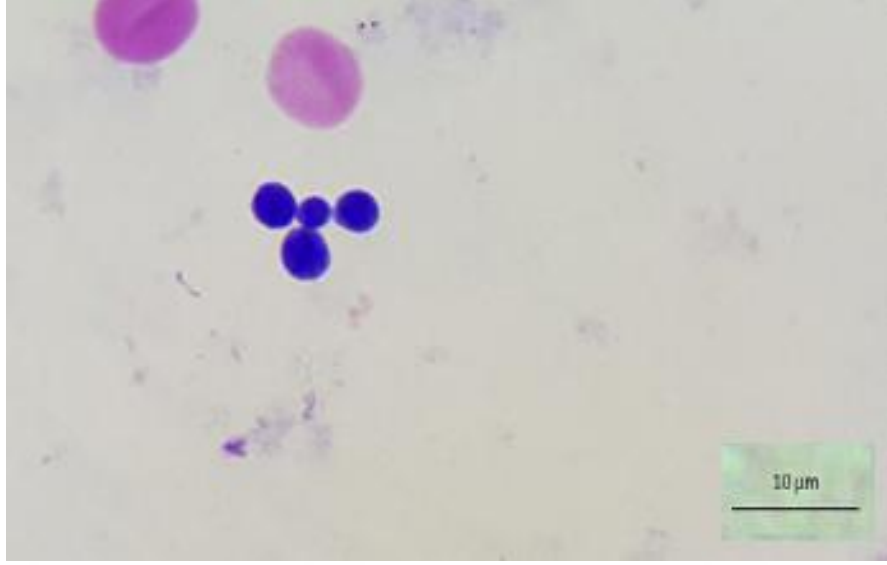
Resim 12. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe nükleoplazmik köprü (X1000)



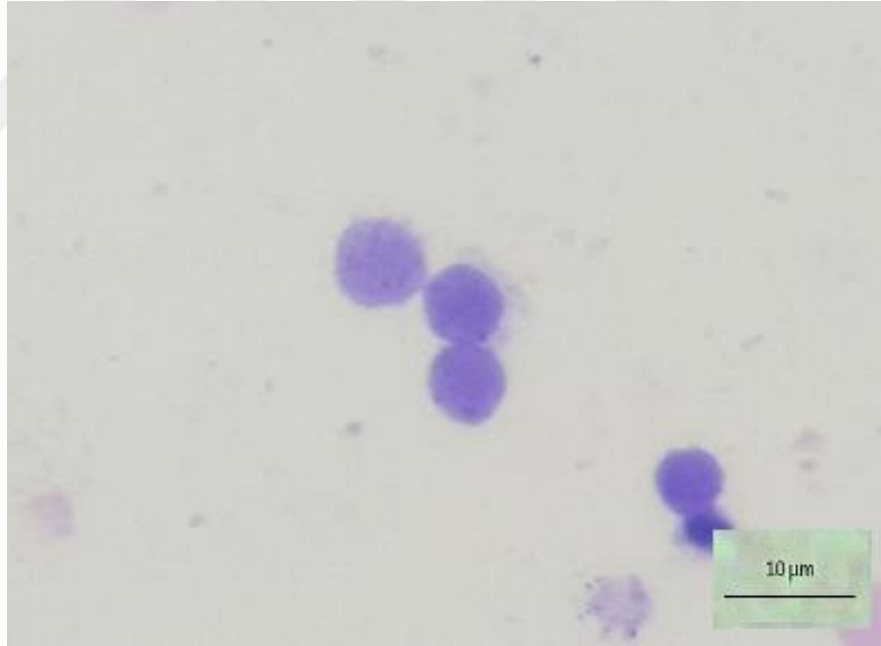
Resim 13. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe mikronükleus (X1000)



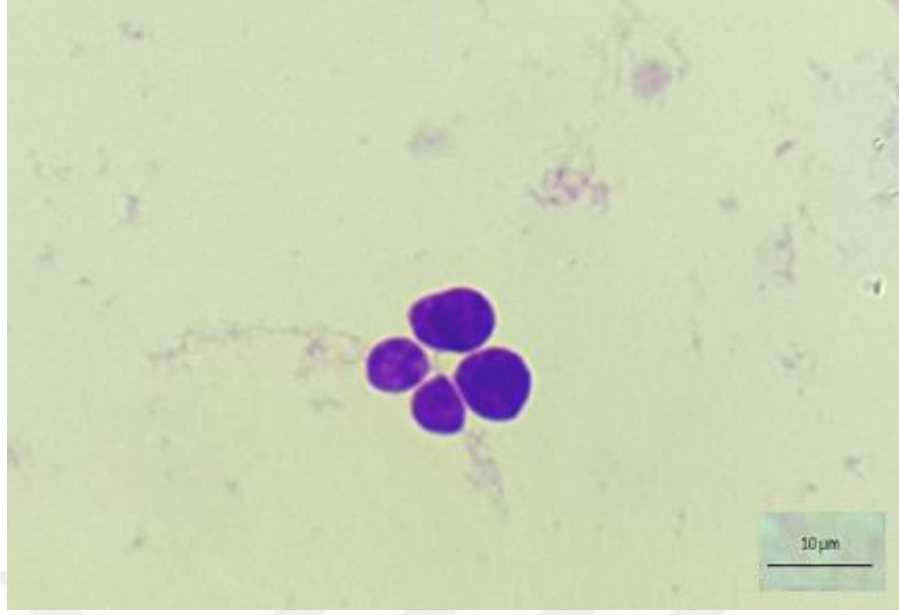
Resim 14. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe iki çekirdekli hücrede üç mikronükleus (X1000).



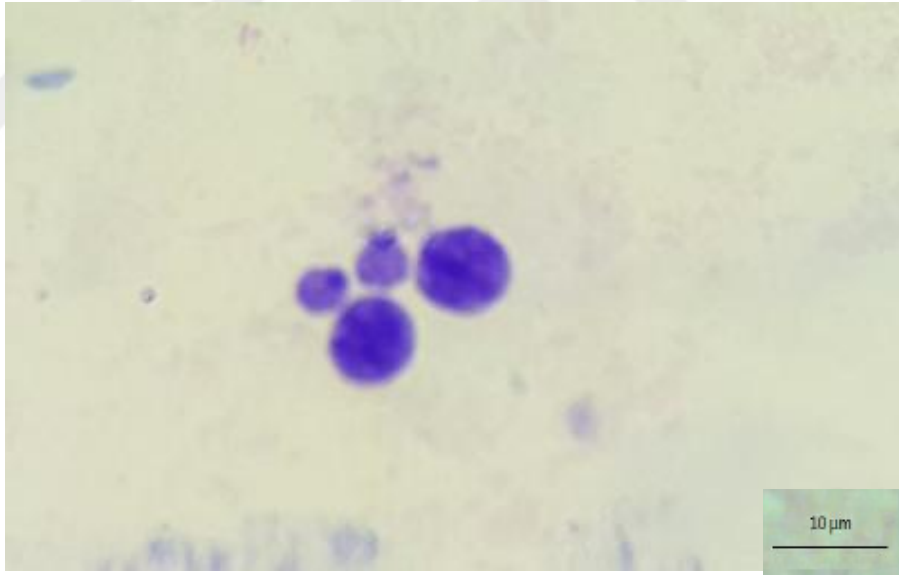
Resim 15. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe nükleuslar arası nükleoplazmik köprüler (X1000).



Resim 16. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe 3 nükleus içeren bir hücre (X1000).



Resim 17. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe 4 nükleus içeren bir hücre (X1000).



Resim 18. İnsan periferel lenfosit hücre kültüründe çift çekirdekli hücrede iki mikronükleus (X1000).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkiler genellikle biyotik ve abiyotik strese karşı kimyasal savunma, rekabet ve üreme potansiyelinin artırılması gibi hayati öneme sahip olan faaliyetleri için sekonder metabolitler üretmektedirler. Geleneksel ilaçlarda kullanılan bazı bitkilerin hastalıkları iyileştirme potansiyelleri üzerinde bu metabolitlerin önemli olabileceği kanaati yaygındır (Vanisree ve ark., 2004; Lila, 2005; Oskay ve Oskay, 2009). Bu nedenle, hastalıkların iyileştirilmesi için bitki türlerinin etkinliği ve mekanizmaları hakkında yapılacak araştırmalar sunabilecekleri potansiyel faydalar bakımından hayati önem taşımaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerdeki sağlık üzerine etkili bileşiklerin kalıtsal materyal üzerine etkilerinin açığa çıkarılması için bitki ekstraktları hazırlanarak genotoksisite testlerine tabi tutulmaktadır. Genotoksisite testleri, bileşiklerin veya ekstraktların karsinojenite ve mutajenitesinin belirlenerek sağlıklı yaşam için piyasaya sunulmasında başvuru güvenlik testlerinin en önemli metodları içerisinde yer almaktadır. Bu testler hem doğal hem de doğal olmayan değişik maruziyetler sonucu olarak genetik materyaldeki değişikliklerin değerlendirilmesi için etkili, güvenilir ve iyi bilinen yöntemlerdir. Kromozom aberasyonları, mikronükleus ve mitotik indeks testleri genotoksisitesi bilinmeyen faktörlerin karsinojenik ve mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan *in-vitro* ve *in-vivo* metodlar arasındadır (Tucker ve ark., 1993; Hagmar ve ark., 2004; Fenech, 2000). *İn-vitro* kromozom anormalliklerinin değerlendirilmesinde hücre kültürleri kullanılabilir. Bu amaç için hücrelerin kültür ortamında gelişme ve büyümeleri, karyotip kararlılığı, kromozom yapı ve durumlarına önem verilmektedir. İnsan periferik lenfosit hücreleri genotoksisite testlerinde özellikle kromozomlarla ilgili farklılıkların ortaya konulmasında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Tucker ve ark., 1993; Hagmar ve ark., 2004; Bonassi ve ark., 2006). Doğal bitki ekstraktlarının bünyelerinde yoğun bir şekilde bulunan fenolik bileşiklerin karsinogenez ve tümör büyümesi üzerindeki inhibitör etkisi iki temel mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan ilki redoks durumunun değiştirilmesi, diğeri ise temel hücresel fonksiyonlara (hücre döngüsü, apoptoz, inflamasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastaz) müdahale etmektir (Dai ve Mumper, 2010).

Daha önce yapılmış çalışmalarda mitotik indeks (Mİ), sitotoksisitenin değerlendirilmesi bakımından iyi bir gösterge olarak kabul edilirken, hücrelerdeki kimyasalların mutajenitesini test etmek için daha çok kromozomal aberasyon analizleri önerilmektedir. Ayrıca, Mİ'nin toksisite testlerinde hücresel bölünmenin sıklığını değerlendirmek için oldukça yararlı bir parametre olduğu kanıtlanmıştır (Marcano ve ark., 2004; Rathnasamy ve ark., 2013). Maddelerin potansiyel sitotoksisitesinin tahmin edilmesi genellikle mitotik aktivitelerin inhibisyonu ile ilişkilendirilmektedir (Smackin ve ark., 1996). Bu çalışmada, kullanılan *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. bitki ekstraktlarının pozitif kontrol olarak değerlendirilen MMC grubuna kıyasla Mİ'ni anlamlı oranda artırdığı ve koruduğu tespit edildi (Tablo 2). Deneysel uygulamalar esnasında 0.2, 0.4, 0.8 ve 1.6 µL /mL konsantrasyonlarında *V. myrtillus* ve *R. idaeus* bitki ekstraktlarının hepsinin MMC grubu ile karşılaştırıldığında Mİ'ni artırdığı ve özellikle 1.6 µL /mL konsantrasyonu ile uygulanan her iki ekstraktın Mİ'yi daha fazla artırdığı saptandı. Hem *V. myrtillus* L. hem de *R. idaeus* L. ekstraktlarının dozları belirlemek amaçlı yapılan ön çalışmalarda 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 ve 4,8 µL /mL konsantrasyonundaki meyve ve yaprak ekstrakt dozları denenmiş, 1.6 µL /mL'ye kadar olan doz denemelerinde mitotik indekste (metafaz sayılarında) bir artış görülmüş, ancak 1.6 µL /mL'den sonra doz artışıyla mitotik indeks arasında negatif bir korelasyon ve buna paralel olarak kromozomal aberasyonlarda bir artış saptanmıştır. 4.8 µL /mL ekstrakt ilave edilen dozlarda kromozom medyumunun kısa bir süre sonra koyu kahverengi bir renk alıp tortulaşarak bozulduğu görülmüştür. Daha önce *V. myrtillus* ve *R. idaeus* ile aynı familyadan olan *Rubus fruticosus*'un sulu yaprak ekstraktının 400, 800 ve 1200 µg/mL (5 mL besiyeri için ele alınırsa 0.4, 0.8 ve 1.2 µg/mL) konsantrasyonuyla yapılan bir *Allium cepa* bitkisi hücre bölünmesi analizinde mitoz bölünmenin profaz evresinde bir birikmenin olduğu ve Mİ'nin azaldığı bildirilmiştir (Madic ve ark., 2017). *R. idaeus* ile yine aynı familyadan olan *Rubus coriifolius* ekstraktının 1.5 ve 3.0 mg/mL'lik dozunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, hücre kültüründe 3.0 mg/mL dozunda *Rubus coriifolius* ekstraktının güçlü sitotoksik etkiler gösterdiği de bildirilmiştir (Gonzalez-Hernández ve ark., 2016). Bu nedenlerle çalışmada, 0.2, 0.4, 0.8 ve 1.6 µL /mL'lik doz uygulamalarının genotoksisite ve sitotoksisite testlerine tabi tutulması uygun bulunmuştur (Şekil 14 ve 15).

Rubus cinsinden bitkilerin genotoksik veya mutajenik potansiyelini ele alan çalışmalar literatürde çok az bulunmakta olup bu bitkinin insan sağlığı üzerine etkilerine son zamanlarda daha fazla dikkat çekilmeye başlanmıştır. *R. idaeus*'tan elde edilen elajik asitler 2.5-160 µg/mL arasında değişen dozlarda CaCo-2 insan adenokarsinoma kolon kanseri hücre hatlarında doza bağlı olarak ve pozitif kontrol gruplarına karşı hücre bölünmesini inhibe edici ve apoptozu indükleyici özellikler göstermektedir. Bu elajitaninleri içermesinden dolayı *R. idaeus* gıda maddelerinin sağlığa faydalı özelliklerini arttırmak için doğal bir gıda katkı maddesi olarak önerilmektedir (Nowak ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada *R. idaeus* ekstraktlarının apoptozu indükleyerek lokal tümörlerin hacmini veya tümör hücresi proliferasyonunu azaltmada çok etkili olduğunu gösterilmiştir. *R. idaeus* ekstraktlarının bu yararlı etkilerinin içerdikleri biyoaktif bileşenlerin hücresel düzeyde antioksidan etkilere sahip olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. *R. idaeus* bitki meyve ekstraktı HepG2 and L₂₀B kanser hücre hatlarında sitotoksik bir etki gösterdiği için potansiyel bir antikanser ilacı olarak dikkat çekmektedir (Assad ve ark., 2015). Daha önce bir çalışmada *R. idaeus* yaprak ekstraktının polifenolik profili ve antioksidatif özellikleri belirlenmiş ve potansiyel biyolojik aktivite açısından incelenmiştir. İnsan laringeal karsinomu (HEp2) ve kolon adenokarsinom (SW480) hücre hatlarında sitotoksik etki, antioksidatif/proksidatif etki ve total glutasyon konsantrasyonuna etkisi incelenmiştir. SW480 hücreleri HEp2 hücreleri ile karşılaştırıldığında *R. idaeus* yaprak ekstraktına daha duyarlıdır. *R. idaeus* yaprak ekstraktının antioksidatif yapısına bağlı olarak SW480 hücrelerinin aksine hidrojen peroksit ile muamele edilmiş HEp2 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu indüklediği gözlemlenmiştir. *R. idaeus* yaprak ekstraktı HEp2 hücrelerinde total glutasyon seviyesini arttırmıştır. Bu etki 24 saatlik bir iyileştirmeden sonra tespit edilmiştir ve bunun sebebi olarak ekstraktta mevcut olan bileşiklerin hücresel metabolizması sırasında oluşan ürünlerin neden olduğu düşünülmektedir. Her iki hücre hattından elde edilen sonuçlara göre *Rubus idaeus* yaprağı polifenollerinin biyolojik aktivitesini doğrulamaktadır ve bu geleneksel bitkinin faydalı sağlık etkileri gösteren değerli doğal antioksidanların günlük alımını destekleyebileceğini göstermektedir (Durgo ve ark., 2012). Bir çalışmada *R. idaeus* ve çilek ekstraktları *in-vitro* kolorektal kanser modellerini kullanarak başlama, ilerleme ve istilanın temel aşamalarında antikanser aktiviteleri için değerlendirilmiştir. Fizyolojik

olarak ilgili doz aralığında ($\mu\text{g}/\text{mL}$ gallik asit eşdeğeri 0-50 μg) kolonideki kanser hücreleri üzerinde önemli antijenotoksik, antimutajenik ve antiinvasif aktivite göstermiştir. Bu çalışma ayrıca, *R. idaeus* ekstraktından elde edilen fenolik bileşiklerin gastrointestinal yoldan geçişleri sırasında önemli yapısal modifikasyonlara maruz kaldıklarını, ancak bunların yıkım ürünlerinin ve metabolitlerinin biyolojik aktivitelerini muhafaza ettiklerini ve kolon kanseri ile bağlantılı hücresel süreçleri modüle edebildiklerini göstermektedir. Yine, *R. idaeus* meyve ekstraktı fermentasyondan sonra aktivitesini korumuş ve HT115 hücrelerinin invazyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir (Brown ve ark., 2012). Başka bir çalışmada *Rubus idaeus* aseton ekstresinin mutajenik potansiyeli, Ames testi kullanılarak *in-vitro* olarak araştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre *R. idaeus* aseton ekstresi CaCo-2 hücrelerine karşı herhangi bir mutajenik etki veya sitotoksikite göstermemiştir (Kreander ve ark., 2006). Çözücü olarak asetonun, bir *in-vitro* antimutajenite çalışmasında belli dozda lenfositlerden oluşan negatif kontrol grubunda toksisiteye sahip olmadığı da bildirilmektedir (Ozkan ve ark., 2013). Tolentino ve ark. (2015), bir comet analizi yöntemi kullanarak *Rubus niveus* ekstresinde (500, 1000 ve 2000 mg/kg) genotoksik ve mutajenik etkilerin olmadığını göstermiştir. Yukarıda açıklanan sonuçlar, *R. idaeus* için genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkilerin yokluğunun da doğrulandığı çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumludur. Bununla birlikte, Alves ve ark. (2014), *Rubus imperialis* ekstreleri (250 ve 500 mg/kg) ile tedavi sonrası MN sıklığında bir artış olduğunu da bildirmişlerdir. *Rubus sancatus* sulu alkolik ekstresinin 1, 5 ve 10 mg/mL dozlarında 3, 6 ve 12 h süre ile *Allium cepa* kök meristem dokusunda sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve 10 mg/mL dozunda 12 h'lik sürede kök meristem hücrelerinde mitotik indeksin azaldığı ve şiddetli sitotoksik etkilerin saptandığı bildirilmektedir (Selmi ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda *R. idaeus* ekstresinin insan periferik lenfosit hücrelerinde, mutajen olduğu bilinen MMC verilen grupta azalan mitotik indeks, nükleer bölünme ve nükleer sitotoksik bölünme indeksini artırdığı saptandı. *R. idaeus* ekstresinin insan periferik lenfosit hücrelerinde, mutajen olduğu bilinen MMC verilen gruba göre kromozomal aberasyon oranları, mikronükleus indeksi, apoptotik hücre ve nekrotik hücre sayılarını azalttığı belirlendi. Kromozomal aberasyon oranlarının *R. idaeus* ekstresinin dozuna bağlı bir şekilde azaldığı da regresyon analizi ile tespit edildi ($R^2 = 0.984$) (Şekil 13). Mikroskop incelemelerinde MMC grubunda görülen yoğun asentrik kromozom, kromatid

ayrılması, resiplokal translokasyon, kromatid kırığı ve ring kromozom durumlarının *R. idaeus* ektresi dozları ile azaldığı da görüntülenerek kaydedildi. Tüm parametreler ele alındığında *R. idaeus* ektresinin uygulanan dozlarda önemli antimutajenik bir etkiye sahip olduğu düşüncesi ileri sürülebilir.

Meyveler insan sağlığı açısından elzem olmakla birlikte mikrobeyinler ve lif kaynağı olarak çok önemli besin kaynaklarıdır. Ayrıca, memeli hücrelerindeki potansiyel faydaları kesinleşmiş birçok fitokimyasalı da barındırmaktadırlar. Antioksidan olmakla birlikte, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antimutajenik özelliklere de sahiptirler. Antioksidan özellikleri içerdikleri yüksek miktardaki fenolik bileşiklerle bağdaştırılmaktadır. Antioksidanlar, ROS (reaktif oksijen türleri) ile girdikleri etkileşimlerle ve dolayısıyla serbest radikal süpürücü olarak kronik komplikasyonlardan koruma özelliklerine sahiptirler. *In-vitro* olarak yapılmış bir çalışmaya göre insan tümör hücre hatları normal hücre hatlarına göre çok yüksek miktarda ROS üretmektedir (Saponjac ve ark., 2015). Çeşitli endüstriyel üretimlerden sonra arta kalan *V. myrtillus* küspesiyle beslenen tavşanlarda abdominal yağ ve plazma kolesterollerinin düşük seviyede olduklarının belirlenmesi *V. myrtillus* küspesinin kolesterol düşürücü etki sağlaması, lipitler üzerinde oksidan etki göstermemesi ve safra asitlerinin hepatik düzenlenmeleriyle ilişkilendirilmiştir (Dabbou ve ark., 2017). *V. myrtillus* ekstraktının ratlarda cisplatin ile indüklenen oksidatif stres ve DNA hasarı üzerinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, cisplatin ile *V. myrtillus* ekstraktı tedavisinin lipit peroksidasyonu seviyesini azalttığı, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimleri içeren antioksidan enzim sistemini desteklediği ve periferik kan hücrelerinde cisplatin tarafından neden olunan genotoksik ve sitotoksik hasarın önlenebildiği kaydedilmiştir (Pandir ve Kara, 2014).

V. myrtillus'un kanser de dahil birçok hastalığın patogeneğinde rol alan ROS'lerin azaltılmasındaki etkilerine ilaveten özellikle kanserin ilerlemesini engellediğine dair birçok kanıt bulunmaktadır. Bu olası mekanizmalardan birisi de kanser hücrelerinin apoptozisini indükleyerek büyümelerini engellemektir. Antikanser özellikleri özellikle polifenoller olmak üzere biyoaktif fitokimyasallarla ilişkilendirilmektedir. *V. myrtillus* bileşenlerinden özellikle antosiyaninlerin yüksek miktarda antiproliferatif etkiye sahip

olduğu gösterilmiştir. *V. myrtillus*'ta bol miktarda bulunan antosiyaninlere ek olarak diğer fenolik bileşenlerden flavonoller, antosiyaninlerin öncüleri olan flavan-3-ol'ler ve hidroksisinnamik asitlerde bulunmaktadır (Aaby ve ark., 2013). Kanseri hücrelerinde apoptozisin indüklenmesinin amaçlandığı bir çalışmada, *V. myrtillus* ekstraktının *in-vitro* HCT116 insan kolon kanser hücreleri ve HL60 insan lösemi hücrelerinin büyümelerinin inhibisyonu üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. *V. myrtillus* ekstraktının HL60 hücrelerinde nükleozomal DNA parçalanmasını ve apoptotik hücreleri indüklediği, HCT116 hücrelerinde *V. myrtillus* ekstraktı ile indüklenmiş apoptotik hücre oranının HL60 hücrelerine göre çok daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca, *V. myrtillus* ekstraktının HL60 ve HCT116 hücrelerinin büyümesi üzerindeki baskılayıcı etkisinin sebebi esas olarak içeriğinde yoğun olarak bulunan ve antosiyanidinlerden olan delphinidin fenolik bileşiği ve glikozitlere bağlanmıştır (Katsube ve ark., 2003). *V. myrtillus*'un, hastalıklara karşı genetik sinyalleri başlatmanın yanı sıra kardiyovasküler bozukluklar, artan yaş ile indüklenen oksidatif stres, inflamatuvar yanıt ve dejeneratif hastalıklarda çeşitli biyomedikal etkileri nedeniyle insanlarda sağlıklı yaşamın sürdürülmesinde birçok koruyucu rollere sahip olduğu gösterilmiştir. Antosiyanin açısından zengin bir meyve olan *V. myrtillus*, hem oftalmik hastalıkların hem de kan damarı bozukluklarının tedavisi için farmasötik bir preparat olarak piyasada mevcuttur. Antosiyanin bileşenleri yüksek *in-vitro* ve *in-vivo* antioksidatif kapasite gösterirler ve ayrıca düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu da inhibe ederler (Pandir ve Kara, 2014). *V. myrtillus* yaprak ve meyve kısımlarında yoğun olan antosiyaninlerin içecekler içerisinde tüketimleri ile kan antioksidan kapasitesinde belirgin bir artış gözlemlendiği bildirilmektedir (Zafra-Stone ve ark. 2007). *V. myrtillus* ekstresinin *in-vitro* olarak çeşitli modellerde sitoprotektif etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Bao ve ark. 2008). *V. myrtillus*'un intraperitoneal yolla 200 mg/kg dozunda ratlara 10 gün boyunca verildikten sonra periferik kan hücrelerinde comet analizi kullanılarak antigenotoksik etkilerin saptandığı bildirilmiştir (Pandir ve Kara, 2014). Bu çalışmada *V. myrtillus* ekstresinin insan periferik lenfosit hücrelerinde, mutajen olduğu bilinen MMC verilen gruba göre metafaz sayısı, mitotik indeks, nükleer bölünme ve nükleer sitotoksik bölünme indeksini artırdığı saptandı. *V. myrtillus* ekstresinin insan periferik lenfosit hücrelerinde, mutajen olduğu bilinen MMC verilen gruba göre kromozomal aberasyon oranları, mikronükleus indeksi, apoptotik hücre ve nekrotik hücre sayılarını azalttığı

belirlendi. Kromozomal aberasyon oranlarının *V. myrtillus* ektresinin dozuna bağılı bir şekilde azaldığı da regresyon analizi ile belirlendi ($R^2= 0.993$) (Şekil 12). Mikroskop incelemelerinde MMC grubunda görülen yoğun asentrik kromozom, kromatid ayrılması, resiprokal translokasyon, kromatid kırığı ve ring kromozom durumlarının *V. myrtillus* ektresi dozları ile azaldığı da görüntülenerek kaydedildi. Tüm parametreler ve daha önce yapılmış genotoksisite ve sitotoksisite çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda *V. myrtillus* ektresinin uygulanan dozlarda önemli bir antimutajenik etkiye sahip olduğu kanısına varıldı.

İnsan periferel lenfosit kültüründe *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. ekstraktlarının farklı dozlarının mutajen olduğu bilinen MMC ile birlikte uygulandığı bu çalışmanın sonucunda, bitki ekstraktları verilen gruplarda MMC grubuna karşı;

1. Kromozomal aberasyon oranının ve mikronükleus oluşumunun azaldığı,
2. Mitotik, nükleer bölünme ve nükleer sitotoksik bölünme indekslerinin arttığı ve
3. Kromozomal aberasyon oranları ve mikronükleus sayısı ile mitotik, nükleer bölünme ve nükleer sitotoksik bölünme indeksleri arasında önemli korelasyon ilişkilerinin saptanmasıyla uygulanan ekstrakt dozlarının antimutajenik ve antigenotoksik etkilerinin anlamlı olduğu ortaya konulmuştur.

Ayrıca, *V. myrtillus* L. ve *R. idaeus* L. bitki kısımlarının özellikle fitokimyasallar olarak bilinen fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu birçok araştırma ile ortaya konduğundan bu çalışmamızda uygulanan ekstrakt dozlarının antimutajenik ve antigenotoksik etkilerinin fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği kanaati taşınmakta olup, kanser, damar hastalıkları ve diyabet gibi hastalıkların tedavisine yardımcı olabilecek bu bitkilerin çalışılan dozlardan daha yoğun olarak tüketilmemesi gerektiği kanısına da varıldı.

5. KAYNAKLAR

- Aaby, K., Grimmer, S., Holtung, L. (2013). Extraction of Phenolic Compounds From Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Press Residue: Effects on Phenolic Composition and Cell Proliferation. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 257-264.
- Aardema, J.M., Kirsch-Volders M., (2001). The In-Vitro Micronucleus Assay. In Choy WN, eds. Genetic toxicology and cancer risk assesment. New York. Marcel Dekker,; 163-86.
- Afaq, F., Syed, D.N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M.H., Khan, N., Zaid, M.A., Mukhtar, H., (2007). Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB mediated oxidative stress and apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 222-232.
- Åkerström, A. (2010). Factors Affecting the Anthocyanidin Concentration in Fruits of *Vaccinium myrtillus* L. Sveriges Lantbruksuniv, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Doktora Tezi, No. 52.
- Akıllıgöz, Y. A., Ezer, N., (2000). Rubus Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları. *FABAD Farmasötik Bilimler Dergisi*, 25(1), 27-31.
- Alves, A.B., dos Santos, R.S., Calil, SdeS., Niero, R., et al. (2014). Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract *in-vivo* and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol.* 153, 694-700.
- Araujo, P. R. F., Santos, V. S., Machado, A. R., Fernandes, C. G., Silva, J. A., Rodrigues, R. S., (2011). Benefits of Blackberry Nectar (*Rubus* spp.) Relative to Hypercholesterolemia and Lipid Peroxidation. *Nutricion Hospitalaria*, 26(5), 984-990.
- Assad, N. K., Dheeba, B. I., Mohammad, F. I., 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.
- Babova, O., Occhipinti, A., Capuzzo, A., Maffei, M. E., (2016). Extraction of Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) Antioxidants Using Supercritical/Subcritical CO₂ and Ethanol as Co-Solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 358-363.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, Samir., (2006). Phenolic Compounds in Plants and Agriindustrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Bao, L., Yao, X. S., Yau, C. C., Tsi, D., Chia, C. S., Nagai, H., Kurihara, H., (2008). Protective Effects of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract on Restraint Stress-

- Induced Liver Damage in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7803–7807.
- Beckett, A. H., Belthle, F. W., Fell, K. R., Lockett, M. F., (1954). The Active Constituents of Raspberry Leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 785-796.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Bigatti, M. P., (2006). An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625-631.
- Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., 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.
- Brown, E. M., McDougall, G. J., Stewart, D., Pereira-Caro, G., González-Barrio, R., Allsopp, P., Gill, C. I. (2012). Persistence of Anticancer Activity in Berry Extracts After Simulated Gastrointestinal Digestion and Colonic Fermentation. *PLOS ONE*, 7(11), e49740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049740>
- Bunea, A., Ruginã, D., Sconța, Z., Pop, R. M., Pinte, A., Socaciu, C., VanCamp, J., (2013). Anthocyanin Determination in Blueberry Extracts from Various Cultivars and Their Antiproliferative and Apoptotic Properties in B16-F10 Metastatic Murine Melanoma Cells. *Phytochemistry*, 95, 436-444.
- Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutiene, I., Stackevicene, E., Nikolajevs, L., 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.
- Cabadak, H., (2008). Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3), 51-61.
- Cesa, S., Carradori, S., Bellagamba, G., Locatelli, M., Casadei, M. A., Masci, A., Paolicelli, P., (2017). Evaluation of Processing Effects on Anthocyanin Content and Colour Modifications of Blueberry (*Vaccinium spp.*) Extracts: Comparison Between HPLC-DAD and CIELAB Analyses. *Food Chemistry*, 232, 114-123.
- Choy, W.N., (2001). *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. Marcel Dekker, New York, 29-187.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., (2005). Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- Çağlar, M. Y., Demirci, M., (2018). Üzümü Meyvelerde Bulunan Fenolik Bileşikler ve Beslenmedeki Önemi. *European Journal of Science and Technology*, 7(11), 18-26.
- Çekiç, Ç., Özgen, M., (2010). Comparison of Antioxidant Capacity and Phytochemical Properties of Wild and Cultivated Red Raspberries (*Rubus idaeus L.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 540-544.

- Çelik, A., Ateş, N. A., (2006). The Frequency of Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes Treated with Metronidazole *In-Vitro*. *Drug and Chemical Toxicology*, 1,85-94.
- Çelik, F. Ercişli, S., (2009). Lipid and Fatty Acid Composition of Wild and Cultivated Red Raspberry Fruits (*Rubus idaeus L.*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(8), 583-585.
- Çelik, H., (2005). Yaban mersini (Likapa) yetiştiriciliği. *Hasad Yayıncılık*, 128s.
- Çelik, H., (2006). Karadeniz Bölgesi İçin Yeni Bir Meyve Türü Yabanmersini (Likapa). II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, 14-16.
- Dabbou, S., Gai, F., Renna, M., Rotolo, L., Dabbou, S., Lussiana, C., Zoccarato, I. (2017). Inclusion of Bilberry Pomace in Rabbit Diets: Effects on Carcass Characteristics and Meat Quality. *Meat Science*, 124, 77-83.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Davis, P. H., (1972). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 4, Edinburg: Edinburg University Press, 4, 30-40.
- Dorđević, B., Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Vulić, T., Oparnica, Č., Radivojević, D., (2010). Biochemical Properties of Red Currant Varieties in Relation to Storage. *Plant Foods Human Nutrition*, 65, 326–332.
- Durgo, K., Belščak-Cvitanović, A., Stančić, A., Franekić, J., & Komes, D. (2012). The bioactive potential of red raspberry (*Rubus idaeus L.*) leaves in exhibiting cytotoxic and cytoprotective activity on human laryngeal carcinoma and colon adenocarcinoma. *Journal of Medicinal Food*, 15(3), 258-268.
- Fenech, M., (2000). The in Micronucleus Technique. *Mutation Research*, 455, 81-95.
- Fenech, M., (2010). The Lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay and its Application in Radiation Biodosimetry. *Health Physiology*, 98(2), 234-243.
- Fenech, M., Crott J, Turner J., Brown, S., (1999). Necrosis, Apoptosis, Cytostasis and DNA Damage in Human Lymphocytes Measured Simultaneously within the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay: Description of the Method and Results for Hydrogen Peroxide. *Mutagenesis*, 14(6), 605-612.
- Fındıklı, Z., Türkoğlu, Ş., (2010). Glyphos ve DDVP'nin *Allium cepa L.*'da Mitoz Bölünme ve Kromozomlar Üzerine Etkisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 31(2), 49-62.
- Foster I., (2008). Cancer: A Cell Cycle Defect. *Radiography*, 14, 144-9.

- Gonzalez-Hernández, S., González-Ramírez, D., Dávila-Rodríguez, M. I., Jimenez-Arellanez, A., Meckes-Fischer, M., Said-Fernández, S., & Cortés-Gutiérrez, E. I. (2016). Absence of toxicity and genotoxicity in an extract of *Rubus coriifolius*. *Genetics and Molecular Research*, 15 (4).
- Gül, S., Demirci, B., Başer, K.H.C., Akpulat, H.A., Aksu, P., (2012). Chemical Composition, and *In-Vitro* Cytotoxic, Genotoxic Effects of Essential Oil from *Urtica dioica* L., *JB Environmental Contamination and Toxicology*, 88(5), 666-671.
- Gül, S., Savsar, A., Tayfa, Z., (2009). Cytotoxic and Genotoxic Effects of Sodium Hypochlorite on Human Peripheral Lymphocytes *In-Vitro*. *J. Cytotechnology*, 59(2), 113-119.
- Gülçin, İ., Topal, F., Çakmakçı, R., Bilsel, M., Gören, A. C., Erdoğan, U., (2011). Pomological Features, Nutritional Quality, Polyphenol Content Analysis, and Antioxidant Properties of Domesticated and 3 Wild Ecotype Forms of Raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Science*, 76(4), C585-593.
- Hagmar, L., Strömberg, U., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Knudsen, L. E., Lindholm, C., Norppa, H. (2004). Impact of Types of Lymphocyte Chromosomal Aberrations on Human Cancer Risk. *Cancer Research*,), 2258-2263.
- Halake, K., Birajdar, M., Lee, J., (2016). Structural Implications of Polyphenolic Antioxidants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 35, 1-7.
- He, J., Giusti, M. M., (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-187.
- Helmstädter, A., Schuster, N., (2010). *Vaccinium myrtillus* as an Antidiabetic Medicinal Plant—Research Through the Ages. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(5), 315-321.
- Huang, H.P., Shih, Y.W., Chang, Y.C., Hung, C.N., Wang, C.J., (2008). Chemoinhibitory effect of mulberry anthocyanins on melanoma metastasis involved in the Ras/ PI3K pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9286–9293.
- Huang, Y. W., Chuang, C. Y., Hsieh, Y. S., Chen, P. N., Yang, S. F., Chen, Y. Y., Chang, Y. C., (2017). *Rubus idaeus* Extract Suppresses Migration and Invasion of Human Oral Cancer by Inhibiting MMP-2 Through Modulation of the Erk1/2 Signaling Pathway. *Environmental Toxicology*, 32(3), 1037-1046.
- Hummer, K. E., (2010). *Rubus* Pharmacology: Antiquity to the Present. *Hort Science*, 45(11), 1587-1591.
- Huret, J. L., Dessen, P., Bernheim, A., (2003). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 272-274.

- Jean-Gilles, D., Li, L., Ma, H., Yuan, T., Chichester, C. O., Seeram, N. P., (2012). Anti-Inflammatory Effects of Polyphenolic-Enriched Red Raspberry Extract in an Antigen-Induced Arthritis Rat Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (23), 5755-5762.
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., & Kobori, M. (2003). Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium Myrtillus*) and The Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 68-75.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, Decordier, U. I., (2003). Indirect Mechanisms of Genotoxicity. *Toxicol Letters*, 140-141, 63-74.
- Krauze-Baranowska, M., Głód, D., Kula, M., Majdan, M., Hałasa, R., Matkowski, A., Kawiak, A., (2014b). Chemical Composition and Biological Activity of *Rubus idaeus* Shoots—a Traditional Herbal Remedy of Eastern Europe. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 480.
- Krauze-Baranowska, M., Majdan, M., Hałasa, R., Głód, D., Kula, M., Fecka, I., Orzeł, A., (2014a). The Antimicrobial Activity of Fruits from Some Cultivar Varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. *Food & Function*, 5(10), 2536-2541.
- Kreander K, Galkin A, Vuorela S, Tammela P, et al. (2006). In-vitro Mutagenic Potential and Effect on Permeability of Co-Administered Drugs Across Caco-2 Cell Monolayers of *Rubus idaeus* and Its Fortified Fractions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 1545-1552.
- Kress, H., (2011). Henriette's Herbal Homepage website. Available from World Wide Web:http://www.henriettesherbal.com/files/images/photos/e/eu/d08_1975_euphorbia-milii-varsplendens.jpg, accession date 20th Dec.
- Lila, M.A., (2005). Valuable Secondary Products from *In-Vitro* Culture. Chapter 24: Plant Development and Biotechnology, CRC Pres, pp285–289.
- Ljevar, A., Ćurko, N., Tomašević, M., Radošević, K., Gaurina Srček, V., Kovačević Ganić, K., (2016). Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and *In-Vitro* Cytotoxicity Assessment of Fruit Wines. *Food Technology and Biotechnology*, 54(2), 145-155.
- Madic, V., Jovanović, J., Stojilković, A., Jušković, M., & Vasiljević, P., (2017). Evaluation of cytotoxicity of ‘anti-diabetic’herbal preparation and five medicinal plants: an *Allium cepa* assay. *Biologica Nyssana*, 8,151-158.
- Madle, S., Beek, B., Nowak, C., (1993). Zum Verständnis von Chromosomenmutationstests an Somazellen. *Mutationsforschung und Genetische Toxikologie*. In: Fahrig R. (ed), Wissenschaftliche Buchgesellschaft Publishers, 224-242.
- Makaracı, A. Z., Çelik, S., (2005). Ahududu Bitkisinde (*Rubus idaeus* l.) En Uygun Dikim Budamasının Belirlenmesi ve Bunun Vegetatif ve Generatif Gelişme Üzerine Etkisi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2, 298-302.

- Makkar, H.P., Siddhuraju, P., Becker, K., (2007). Plant Secondary Metabolites. Methods Molecular Biology, 393, 1-122.
- Marcano, L., Carruyo, I., Del., Campo, A., (2004). Cytotoxicity and Mode of Action of Maleic Hydrazide in Root Tips of *Allium cepa* L. Environmental Research, 94, 221-226.
- Mavournin, H. K., Blakey, H. D., Cimino, C. M., Salamone, F. M., Heddle, A. J., (1990). The *In-Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Researches, 239, 29-80.
- Morris, P., Robbins, M., (1997). Manipulating the Chemical Composition of Plants. Iger Innovate, 12-15.
- Mullen, W., McGinn, J., Lean, M. E. J., Maclean, M. R., Gardner, P. and Duthie, G. G., (2002). Ellagitannins, Flavonoids, and Other Phenolics in Red Raspberries and Their Contribution to Antioxidant Capacity and Vasorelaxation Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 5191-5196.
- Nagase H., Sasaki K., Kito H., Haga A., Sato T., (1998). Inhibitory Effect of Delphinidin from *Solanum melongena* on Human Fibrosarcoma HT-1080 Invasiveness In Vitro. Planta Medical, 64 (3), 216-219.
- Nakajima, J. I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., Saito, K., (2004). LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. BioMed Research International, 5, 241-247.
- 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.
- National Plant Data Center, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. 1996. Erişim tarihi: 26.04.2018. <http://plants.usda.gov>.
- Nizamlioğlu, N. M., Sebahattin, N. A. S., (2010). Meyve ve Sebzelerde Bulunan Technologies, 5(1), 20-35.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, IL., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Srám, R.J., Knudsen, L. E., Barale, R., Fucic, A., (2006) Chromosomal Aberrations and SCEs as Biomarkers of Cancer Risk. Mutation Research, 30, 37-45.
- Nowak, A., Sójka, M., Klewicka, E., Lipińska, L., Klewicki, R., & Kołodziejczyk, K. (2017). Ellagitannins from *Rubus idaeus* L. Exert Geno-and Cytotoxic Effects against Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(14), 2947-2955.

- Osborn, A.E., (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense Against Fungal Attack. *The Plant Cell*, 8, 1821–1831.
- Oskay, D., Oskay, M., (2009). Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoteknolojik Önemi. *Ecological Life Sciences*, 4 (2), 31-41.
- Ozkan, O., Gul, S., Kart, A., Cicek, B. A., & Kilic, K. (2013). In Vitro Antimutagenicity of *Allium tuncelianum* Ethanol Extract Against Induction Of Chromosome Aberration by Mutagenic Agent Mitomycin C. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (2), 259-262.
- Pandir, D., Kara, O. (2014). Chemopreventive effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage as shown by the comet assay in peripheral blood of rats. *Biologia*, 69 (6), 811-816.
- Paz-y-mino, C., Bustamante, G., Sanchez, M.E., Leone, P.E., (2002). Cytogenetic Monitoring in a Population Occupationally Exposed to Pesticides in Ecuador. *Journal of Environmental Health Perspective*, 110 (11), 1077-1080.
- Pehlivan, M., Gülerüz, M., (2004). Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. *Bahçe*, 33(1-2), 51-57.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14 (6), 2202-2211.
- Rathnasamy, S., Mohamed, K. B., Sulaiman, S. F., & Akinboro, A. (2013). Evaluation of Cytotoxic, Mutagenic and Antimutagenic Potential of Leaf Extracts of Three Medicinal Plants Using *Allium cepa* Chromosome Assay. *International Current Pharmaceutical Journal*, 2 (8), 131-140.
- Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Elberhard, E., Kreinberg, R., Vogel, V., Speit, G., (2000). Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. *Journal of Cancer Research*, 60, 390-394.
- Saldamlı, İ., (2007). Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 463-492.
- Šaponjac, V. T., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., & Četojević-Simin, D., (2015). Dried Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract Fractions as Antioxidants and Cancer Cell Growth Inhibitors. *LWT-Food Science and Technology*, 61(2), 615-621.
- Savage, J. R., (1976). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics*, 13(2), 103-122.
- Sears, D. A., and Udden, M. M., (2011). Howell–Jolly bodies: a brief historical review. *American Journal of the Medical Sciences*, 343, 407–409.

- Selmi, S. S., Abdelfattah, T. S., Mostafa, F. D., (2014). Deregulation of mitosis progression and cytotoxic effect triggered in *Allium cepa* L. roots by *Rubus Sancatus* schreber extract. Life Science Journal, 11(11), 1047-1058.
- Seoane, A.I., Dulout, F.N., (2001). Genotoxic Ability of Cadmium, Chromium and Nickel Salts Studied by Kinetochore Staining in the Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay. Mutation Research, 490, 99-106.
- Shahidi, F., Naczki, M., (1995). Food Phenolics. Technomic Publishing Company Book, Lanchester, USA, 199-225.
- Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M., (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. Mutation Research, 368,171–179.
- Şekeroğlu, V., Şekeroğlu, Z. A., (2011a). Genotoksik Hasarın Belirlenmesinde Mikronükleus Testi. Turk Hij. Den Biyol. Derg., 68(4), 241-252.
- Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V., (2011b). Genetik Toksikite Testleri. TÜBAV Bilim Dergisi, 4(3), 221-229.
- Theis, N. Lerdau, M., (2003). The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. International Journal of Plant Sciences, 164, 93–102.
- Toksi, G., Stankovi, M., Radovanovi, S., Dragi, M., (2001). The Use of Cytochalasin Block (CB) Micronucleus Test to Identify Clastogenic and Antiproliferative Action. Archi ve of Oncology, 9, 47-48.
- Tolentino, F., Araújo, P. A., Marques, EdeS, Petreanu, M., (2015). *In-vivo* evaluation of the genetic toxicity of *Rubus niveus* Thunb. (Rosaceae) Extract and Initial Screening of Its Potential Chemoprevention Against Doxorubicin-Induced DNA Damage. Journal of Ethnopharmacology, 164, 89-95.
- Tucker, J. D., Auletta, A., Cimino, M. C., Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. R., & Carrano, A. V., (1993). Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 297(2), 101-180.
- Üstüner, D., (2011). Kromozom kırıkları ve mikronükleus-apoptoz bağlantısı. TÜBAV Bilim Dergisi, 4(1), 64-69.
- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S.M., Lin, C.Y., Tsay, H.S., (2004). Studies on the Production of Some Important Secondary Metabolites from Medicinal Plants by Plant Tissue Culture. Botanical Bulletin Academia Sinica, 45, 1–22.
- Wang, H., Guo, X., Hu, X., Li, T., Fu, X., & Liu, R. H., (2017). Comparison of Phytochemical Profiles, Antioxidant and Cellular Antioxidant Activities of Different Varieties of Blueberry (*Vaccinium spp.*). Food chemistry, 217, 773-781.

- Wang, S. Y., Bowman, L., 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.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A., Bagchi, D., (2007). Berry Anthocyanins as Novel Antioxidants in Human Health and Disease Prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 675–683.
- Zeiger, E., (2004). History and Rationale of Genetic Toxicology Testing: an Impersonal, and Sometimes Personal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44 (5), 363-71.
- Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P., Magnuson, B. A., (2004). Effects of Commercial Anthocyanin-Rich Extracts on Colonic Cancer and Nontumorigenic Colonic Cell Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6122-6128.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Müge MAVİOĞLU KAYA

Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 11.05.1984

Yabancı Dili : İngilizce

İletişim (e-posta) : m.mavioglu@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Cumhuriyet Lisesi (YDA), 2002

Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2008

Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı,
2010

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Kafkas Üniversitesi/ 2013-