

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

**KİMYON (*Cuminum cyminum*) BİTKİ UÇUCU YAĞININ FARE KEMİK İLİĞİ
HÜCRELERİNDE MİKRONÜKLEUS FREKANSI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Emin Serhat ÇAKMAKÇI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE

EYLÜL-2016

KARS

**Bu tez çalışması 2014-FEF-10 numaralı proje ile KAÜ Bilimsel Araştırma
Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.**

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

**KİMYON (*Cuminum cyminum*) BİTKİ UÇUCU YAĞININ FARE KEMİK İLİĞİ
HÜCRELERİNDE MİKRONÜKLEUS FREKANSI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Emin Serhat ÇAKMAKÇI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE

EYLÜL-2016

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Emin Serhat ÇAKMAKÇI'nın Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE'nin danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “**Kimyon (*Cuminum cyminum*) Bitki Uçucu Yağının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mikronükleus Frekansı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy...*birliği*... ile kabul edilmiştir.

30.03.2016

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan: Prof. Dr. Süleyman GÜL

Üye: Yrd. Doç. Dr. Emin SENGÜL

Üye: Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../... gün ve .../... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada literatür taraması sonucu daha önce çalışılmadığı tespit edilen, kimyon (*C. cyminum*) bitki uçucu yağının fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus frekansı üzerine etkileri incelenmiştir. Farelere verilen çeşitli dozlardaki kimyon uçucu yağının, fare kemik iliği hücreleri üzerinde genotoksik hasar oluşturduğu tespit edilmiştir.

Tez konusunun seçiminde, tezin yürütülmesinde, gerekli laboratuvar olanaklarını sunan ve yardımlarını esirgemeyen Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi, danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE'ye, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Süleyman GÜL'e, Biyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Yağmur YILDIZ'a, Yüksek Lisans öğrencisi Davut KIŞIOĞLU'na, çalışmama maddi destek sağlayan Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Başkanlığı'na ve eğitimimin her aşamasında maddi-manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Kars, 2016

Emin Serhat ÇAKMAKÇI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
GRAFİK VE TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Genotoksisite	3
2.1.1. Genotoksisite Testlerinin Kullanım Alanları	4
2.1.2. Genotoksisite Testleri	5
2.1.2.1. Ames Testi	5
2.1.2.2. Comet Testi/Comet Assay (Tek Hücre jel Elektroforezi).....	6
2.1.2.3. Kromozomal Anomali (KA) Testi	7
2.1.2.4. Kardeş Kromatid Değişimi Testi	8
2.1.2.5. Mikronükleus (MN) Testi	9
2.1.3. Mikronükleus Test Yönelimi	11
2.1.3.1. Hücre Tipleri	11
2.1.3.2. İn-Vitro Mikronükleus Testi	11
2.1.3.2.1. Mikronükleus Sayımının Saptanması	12
2.1.3.2.2. Sitotik Etkinin Belirlenmesi	13
2.1.3.3. İn-Vivo Mikronükleus Testi.....	14
2.1.3.3.1. Mikronükleus Sayımının Belirlenmesi	15

2.1.3.3.2. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	16
2.2. Bitki Ekstraktı.....	17
2.2.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimi	17
2.2.2. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri	17
2.3. <i>C. cyminum</i> Bitkisinin Genel Özellikleri.....	20
2.3.1. <i>C. cyminum</i> Bitkisinin Sistematığı	20
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Hayvan Materyali (Mus Musculus)	21
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	21
3.1.2.1. Kimyon.....	21
3.1.2.2. Eter	22
3.1.2.3. Sorensen Tampon (Sorensen Buffer) Çözeltisi.....	22
3.1.2.4. Giemsa	22
3.1.2.5. May-Grunwald	22
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Diğer Ekipmanlar	22
3.1.3.1. Hassas Terazî	22
3.1.3.2. Santrifüj.....	22
3.1.3.3. Mikroskop	23
3.2. Metot	24
3.2.1. Gruplar	24
3.2.2. Mikronükleus Testi	24
3.2.3. Boyama İşlemi	24
4.BULGULAR	25
4.1. İn vivo Deney ve Kontrol Gruplarının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığı Üzerindeki Etkileri	25

5.TARTIŞMA VE SONUÇ	32
6. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	47



ÖZET

Bu tez çalışması ile kimyon (*C. cuminum*) bitkisinden elde edilen uçucu yağın fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus frekansı üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Oluşturulan üç deney grubundaki farelere 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg kimyon (*C. cuminum*) uçucu yağı, vücut ağırlıklarına göre 24 saatte bir iki kez oral yolla verilmiştir. Bu gruplar haricinde negatif kontrol grubu oluşturularak in-vivo mikronükleus test yöntemi kullanılmıştır. Kimyon uçucu yağı uygulamasının farelerde mikronükleus sayıları üzerine etkileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, negatif kontrol grubuna göre 250 mg/kg, 500 mg/kg ve 1000 mg/kg dozunda kimyon uçucu yağının mikronükleus sayılarını istatistiksel olarak önemli oranda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0.001$). Deney gruplarında gözlemlenen mikronükleus frekansındaki artış kimyon (*C. cuminum*) uçucu yağı doz artışıyla paralellik göstermiştir. Sonuç olarak yapılan bu tez çalışması ile, kimyon (*C. cuminum*) uçucu yağının madde miktarına göre fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus frekansını artırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *C. cuminum*, Mikronükleus, Uçucu yağ

ABSTRACT

This study was carried out in order to examine the effects of essential oil obtained from cumin (*C. cyminum*) on the micronucleus frequency of bone marrow cells of mice. To the mice in 3 experiment groups, 250 mg/kg, 500 mg/kg, and 1000 mg/kg doses of essential oil of cumin (*C. cyminum*) were orally given once every 24 hour for 2 times. Besides these groups, by establishing a negative control group, in vivo micronucleus test method was implemented. The effects of essential oil of cumin on the number of micronuclei in mice were examined statistically, and it was determined that, when compared to negative control group, 250 mg/kg, 500 mg/kg and 1000 mg/kg doses of essential oil of cumin statistically significantly increased the number of micronuclei ($p < 0.001$). The increase observed in the number of micronuclei in experiment groups showed parallelism with the increase in dose of essential oil of cumin (*C. cyminum*). In conclusion, in this thesis study, it was determined that, in parallel with its dose, essential oil of cumin (*C. cyminum*) increased the micronucleus frequency of bone marrow cells of mice.

Keyword: *C. cyminum*, Micronucleus, Essential Oil

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Ames testi	5
Şekil 2.2 (a) Sağlam DNA (b) Bozuk DNA, Comet testi	6
Şekil 2.3 21.kromozom çiftinde fazladan bir kromozom bulunması (Down sendromu) .	7
Şekil 2.4 a- BrdU içeren DNA iplikleri, b- Kromatid değişimi görünümü	8
Şekil 2.5 Klastojen ve anojenlerin MN üzerindeki etkileri.....	9
Şekil 2.6 Sitokinezin durdurulması yöntemi ile binükleat hücre görünümü	10
Şekil 2.7 İn-vitro yöntem ile yapılan MN testi	12
Şekil 2.8 İn-vivo Mikronükleus test protokolü.....	15
Şekil 2.9 Clavenger aparatı	18
Şekil 2.10 Soxhlet Aparatı	19

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1 a- Bir mikronükleus bulunduran, b- İki mikronükleus bulunduran binükleat hücreler.....	13
Resim 2.2 Mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücreler.....	14
Resim 2.3 Kemik iliğinde gözlemlenen PCE, NCE ve MNPCE.....	16
Resim 4.4 Deney Grubu Farelerin Kemik İliği Hücrelerinde MNPCE ve normal PCE, NCE (X1000)	26
Resim 4.5 Deney Grubu Farelerin Kemik İliği Hücrelerinde iki mikronükleuslu PCE (X1000)	27



GRAFİKLER VE TABLOLAR DİZİNİ

1.GRAFİKLER

Grafik 4.1 Kimyon uçucu yağı uygulanan farelerde mikronükleus sıklığı.....26

2.TABLolar

Tablo 4.1 Negatif kontrol grubu sonuçları.....28

Tablo 4.2 250 mg/kg Kimyon uçucu yağı uygulanan 1. Deney grubu MN
test sonuçları.....29

Tablo 4.3 500 mg/kg Kimyon uçucu yağı uygulanan 2. Deney Grubu MN
test sonuçları.....30

Tablo 4.4 1000 mg/kg Kimyon uçucu yağı uygulanan 3. Deney grubu MN
test sonuçları.....31

1. GİRİŞ

Günümüzde yapılan araştırmalara göre yaklaşık bir milyon civarında bitki türünün olduğu bilim insanlarınca tahmin edilmektedir. Bu türlerin yarısından fazlası adlandırılıp bilim dünyasına kazandırılmıştır[1].

Bilime kazandırılan bu bitki türleri insanlar açısından önemli bir yere sahip olup çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yaptığı çalışmalara göre insan nüfusunun 3/4'ün sağlık problemlerini bu bitkiler ile halletmeye çalıştıkları bilinmektedir[2].

Ayrıca doktorlar tarafından, insan tedavisinde kullanılmak için reçetelere yazılan ilaçların çoğunun bitkisel kökenli oldukları (aspirin, kinin, atropin) bilinmektedir[2].

Dünya Sağlık Örgütü 1900'lü yıllarda, bazı bitkilerin insanlar üzerinde tedavi edici özelliğinin olduğunu açıklamışlardır. Bu bitkisel ilaçların tedavide kullanılmadan önce iyi araştırılıp etki mekanizmasının bilinmesi ve doz oranının ona göre ayarlanması gerekmektedir[3].

Tedavide kullanılan bitkilerin, ülkemizdeki iklim çeşitliliğinden dolayı fazla olması ve tedavi amacıyla kullanılmasından dolayı ticarete önemli bir yere sahiptir[4].

Bitkisel tedavi için kullanılan bu bitkilerin, ülkemizde önemli türlerinin olmasına rağmen yinede bu bitkilerden fazla yararlanılamamaktadır[5].

M.Ö. 1550'li yıllarda mısır halkının kimyon bitkisinden bitkisel ilaç olarak yararlandıkları tespit edilmiştir. Yaz aylarının başlarında yetişmeye başlayan kimyon bitkisi tek yıllık otsu bir bitki türleri arasındadır. Apiaceae familyasına ait bu bitki türü beyaz ve pembemsi renkte olup, anavatanı Doğu Akdeniz ve Orta Doğu olduğu bilinmektedir[6].

Bitkisel ilaç olarak kullanılan bu bitkinin yararları olmasının yanında, kullanılacak olan dozun iyi ayarlanılamamasından dolayı canlılar üzerinde genotoksik hasar oluşturabileceği günümüzde yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Bundan dolayı bitkilerin özelliklerinin iyi araştırılması gerekmektedir[7,8].

Zararlı ajanların canlılarda DNA hasarına yol açarak, gelecek nesillere aktarılan genetik bilgilerde hasarın kalıcı olması olayına genotoksisite denilmektedir. Genotoksik etki

DNA yapısında mutasyona yani değişmesi ve buna bağlı olarak bozulmalara yol açmaktadır[9].

Genetik materyalde hasar oluşturduğundan dolayı, kullanılacak olan bitkilerin genotoksisite testleri dediğimiz birçok test yöntemi sayesinde araştırılıp kullanım dozunun belirlenmesi ve oluşturabilecek hastaların tespiti için kullanılmaktadır. Bu testler in-vivo ve in-vitro genotoksik testler olarak adlandırılmıştır[10,11].

Genotoksisite testleri arasında en çok kullanılan testler Comet testi, Ames testi, Kardeş Kromatid testi (KKD) , Kromozomal Aberasyon (KA) ve Mikronükleus (MN) testleridir.

Mikronükleus testi 1950'den itibaren bitki üzerinde, 1970'den itibaren ise hayvan hücreleri ve insan hücreleri üzerinde kimyasal kanserojen etkileri araştırmada kullanılmaya başlanmıştır[12-14].

Mikronükleus testi genellikle lenfosit hücrelerinin, kemik iliği hücrelerinin ve periferel kan hücrelerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Bazı bilim insanları bu testi yaparken kanserojenik etki oluşturan ajanları MN farkı ile tespit etmişlerdir. Klastojenden etkilenen hücrelerde kromozomal parçalar içeren küçük MN'ler meydana gelmesine karşın, anojenlerden etkilenen hücrelerde kromozom içeren oldukça büyük ebatlarda mikronükleuslar ortaya çıkmaktadır[15,16].

Bitkisel ilaçla tedavi yöntemlerinin fazla olduğu bilinmektedir. Bu bitkiler arasında bilindiği gibi en çokta insanlar tarafından kullanılan kimyon bitkisi, toplum arasında, süt arttırıcı, ishal kesici, romatizma tedavisi ve diş ağrısı gibi çeşitli hastalıkların tedavi edici özelliğinin olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda kimyonun faydasının yanında, bahsedildiği üzere fazla dozda kullanılması genotoksik etkinin oluşturabileceği yapılan genotoksisite testleri çalışmalarında tespit edilmiştir[17,18].

Yapılan literatür araştırmaları sonucu kimyon (*C. cuminum*) bitkisinin in-vivo mikronükleus üzerine etkisinin çalışılmadığı görülmüştür. Bu çalışma ile halk arasında yaygın olarak kullanılan kimyon bitki uçucu yağının fare kemik iliği hücrelerinde in-vivo mikronükleus oluşumuna etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genotoksisite

Genotoksisite, çevrenin etkisi ve kullanılan maddelerin yani fiziksel ve kimyasal ajanların genetik yapıda meydana getirdiği bozukluklar olarak adlandırılır. Bu hasarlar genetik yapıda bulunan, tek zincir kırıkları, çift zincir kırıkları, alkali ve DNA bozukluklarıdır[19].

Her canlı kendisine has özellikleri, yapısının farklılığının belirlendiği, farklı sayılarda kromozom yapısına sahip bir genetik materyali bulunmaktadır. Kimyasal ve fiziksel ajanların, canlılarda bulunan bu genetik materyaller üzerinde meydana getirdiği değişikliklere mutasyon adı verilmektedir. Bu mutasyonlar fiziksel ve kimyasal ajanlardan etkilenerek oluşmasının yanında kendiliğinden de ortaya çıkabilmektedir. Mutasyonların DNA üzerinde meydana getirdiği değişiklikler iki farklı özellikte açıklanır. Bunlardan birincisi mutasyona uğramış olan bölgenin kendiliğinden onarılabilmesidir. Onarılabilme yeteneği olan vücut mekanizması, bu hasarlı bölgeyi onarabilmektedir. DNA da oluşan bu hasarların diğer bir özelliği ise vücut mekanizmasının hasarlı bölgeyi onaramamasıdır, yani kalıcı olabilmektedir. Vücut savunma mekanizması tarafından düzeltilemeyen bu hasarlı bölge kalıcı olmakla birlikte, gelecek nesillere aktarılabilir. DNA'da oluşan bu mutasyonlar, çeşitli hücrelerde bozukluklara neden olmaktadır. Bu sorunlu hücrelerde bazıları etkinliğini kaybeder ve ölür. Bazıları ise genetiği bozulmuş olarak kalır. Kanseri oluşumu bu genetik yapısı bozuk olan hücrelerin vücut içerisinde kalması ile meydana gelir. Bazı fiziksel etkiler, canlıların genetik yapısında bozukluk oluşturmayabilir. Canlıların zor çevre şartlarına ayak uydurmasına ve dayanıp hayatta kalabilmesine yardımcı olabilmektedir. Kutup bölgelerinde yaşayan kutup ayılarının kürk renklerinin beyaz olması zorlu şartlarda hayatta kalabilmesine faydası olarak gösterilebilir. Zararlı etki oluşturabilecek kimyasal ve fiziksel etkenlerin canlı organizmaya olan etkisi, geliştirilmiş yöntemlerle araştırılıp, canlıların ona göre önlem almasını sağlamaktadır. Bu açıdan önlem almak için zararlı etkenlerin tespiti amacıyla çok fazla testler geliştirilmiştir. Bu geliştirilen yöntemler sayesinde, canlı mekanizmasında DNA üzerinde oluşturabileceği zararlı maddeler araştırılarak önlem alınması amaçlanmıştır. Bu testlerin kısa sürede sonuç vermesi önemlidir. Bu testler kısa sürede sonuç

verdiğinden dolayı bu testlere kısa süreli testler de denilmektedir. Bu testler genellikle, insanların yaşadığı ortamdaki kimyasal etkilerin, kullanılan ilaçların mutajen olup olmadığı hakkında bilgi edinebilmemizi sağlamaktadır. Elde edilen sonuçlara göre kullanılacak olan maddelerin dozu hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Bazı genotoksisite testleri bazı durumlarda tek başına yeterli sonuçlar veremeyebilir. Bunun için alerjik testler, akut ve kronik toksisite testleri gibi testler de kullanılır[20,21].

Mutajenlerin tespiti için kullanılan bu genotoksisite testleri in-vivo ve in-vitro diye ikiye ayrılır. Bu testler moleküler, gen ve kromozom düzeyinde olabilir. Günümüzde en çok kullanılan testler Ames testi, Comet testi, Kromozomal Aberason testi, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testidir[21].

2.1.1. Genotoksisite Testlerinin Kullanım Alanları

1970'li yıllardan itibaren kullanılmaya başlanan bu testler fiziksel veya kimyasal ajanların canlılar üzerinde kanserojenik etki değerlerini ölçmede ve değerlendirmede yardımcı olmaktadır[19].

İn-vitro ve in-vivo olarak kullanılan bu testler genetik materyalde meydana gelen bozuklukların tespiti için kullanılır[22-24].

Genotoksisite testleri genellikle kullanılan maddelerin insanlarda risk olup olmadığının tespit edilmesi ve bu zararlı maddelere karşı nasıl bir önlem alınması konusunda yardımcı olabilmektedir. Zararlı maddelerin engellenmesi genetik toksikoloji dalının en önemli amaçlarından biridir[23].

Genotoksisite testleri genellikle insanların sürekli karşılaştığı zararlı ajanlar, kullanılan ilaçlar, tüketilen gıdalar gibi maddelerin insanlar üzerindeki etkilerinin tespiti ve kullanılan doz miktarı hakkında bilgi vererek insanlarda oluşabilecek kanser riskini azaltmak açısından genotoksisite testleri uygulanmaktadır[11,22,25,26].

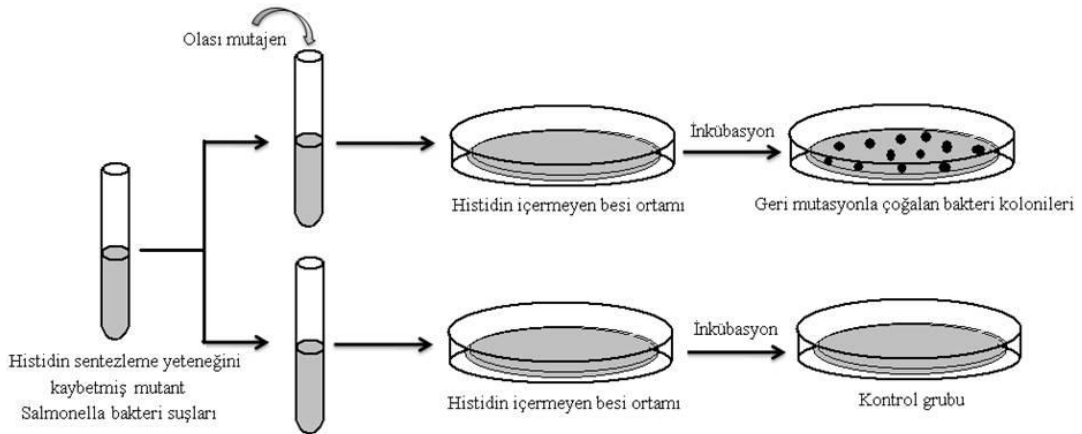
Zararlı ajanların oluşturduğu genetik bozuklukların tespiti için tek bir genotoksisite testi yeterli olmadığından dolayı birçok genotoksisite testi kullanılmaktadır[22,27-31].

2.1.2. Genotoksisite Testleri

2.1.2.1. Ames Testi

Ames olarak adlandırılan bu testin diğeri adı olan *Salmonella* testi, sık kullanılan testler arasında olmakla birlikte, canlıların maruz kaldığı zararlı ajanların mutajenik etkisinin olup olmadığının tespiti için kullanılan bakteriyel test sistemidir. Yapılışı açısından kolay ve verdiği değerlerin doğruluğu açısından kullanılan testler arasından en yaygın olanlarından biridir. Ames testi canlılar üzerinde yapılan çalışmalarda, kanser hücresi oluşumu sırasında somatik yapılı hücrelerin kanserli hücreleri engelleyici genlerinde meydana gelen bozuklukların tespitinde, aynı zamanda zararlı olan maddelerin genetik materyal üzerindeki etkileri azaltabilen yapıdaki antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tespit edilmesi açısından sıklıkla kullanılmaktadır[22,27,32].

Ames testi yapılırken mutant suşları olan *salmonella typhimurium*dan yararlanılmaktadır. Bu yöntemin amacı, *S. typhimurium*'un yapay mutasyonla ortaya çıkan histidin meydana getirme kabiliyetini yitirmiş suşlarının, sitokrom P-450 enzimine sahip memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) bulunması ya da bulunmaması durumunda, test maddesi ile etkileşiminden sonra tekrar mutasyon geçirmesini sağlayıp histidini oluşturan ve histidinsiz ortamda çoğalması esasına dayanmaktadır. Mutajenik etki belirlenirken histidin olmayan ortamda koloniler sayılarak tespiti yapılır (Şekil 1). Ortamda mutajenik etki oluşturan bir madde varsa geri mutasyonla çoğalan bakteriler sayısında istatistiksel olarak artış görülmektedir[22,23,32-34].



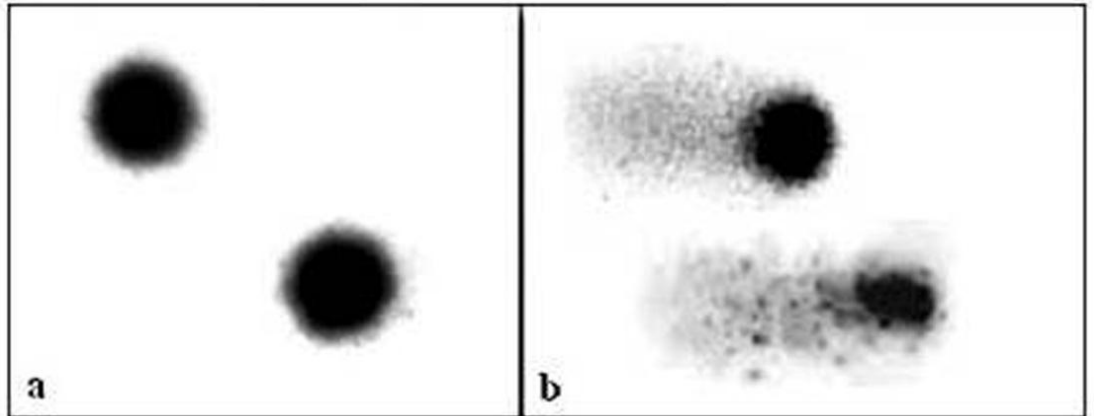
Şekil 2.1 Ames testi[22,23,27,32-34].

2.1.2.2. Comet Testi/Comet Assay (Tek Hücre jel Elektroforezi)

Diğer genotoksisite testlerine göre daha sonralarda kullanılmaya başlanan Comet testi, hassas, hızlı ve güvenilir olmasıyla birlikte, zararlı maddelerin etkilediği DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespitinde kullanılmaktadır. Comet testi, memeli hücrelerde zararlı ajanların neden olduğu DNA’da oluşan bozukluğu ve onarım mekanizmasındaki bozukluğun tespitinde kullanılmaktadır. Bunun yanında zararlı etki oluşturan maddelerin DNA’ ya vermiş olduğu zararın etkisini, kanser hastalarında oluşan DNA bozukluğunun derecesi ve bu hasarlı bölgelerin tedavisinin tespitinde kullanılan bir test çeşididir. Ayrıca genetik hasardaki etkinin tespitinin hemen olması, kullanılması açısından basit ucuz ve yeterli derecede sonuç vermesi açısından çok kullanılan testlerden biridir[22,35,36].

Comet testi, DNA’nın elektriksel yüklere sahip olmasından dolayı, elektriksel ortamda farklı yönlerde doğru göç etmesine dayanır. Tespit edilecek olan hücre ve çekirdekçikler agarozta yerleştirilir, bu işlemden sonra lizis ve alkali elektroferezinde nötralizasyon ve yürütme aşamaları uygulanarak florasan boyama özelliği ile boyanır. Boyanmış preparatlar incelenirken hasarlı olmayan DNA’larda herhangi bir kuyruk oluşumu görülmez.

Hasarlı olan DNA’larda ki fragmentler ise farklı elektriksel yapıda olduklarından dolayı elektriksel alanda farklı yönlerde doğru bir göç oluşur ve bu esnada dışa doğru bir kuyruk oluşumu gözlenir (Şekil 2)[29,35,37-40].



Şekil 2.2 (a) Sağlam DNA (b) Bozuk DNA, Comet testi[29,35,37-40].

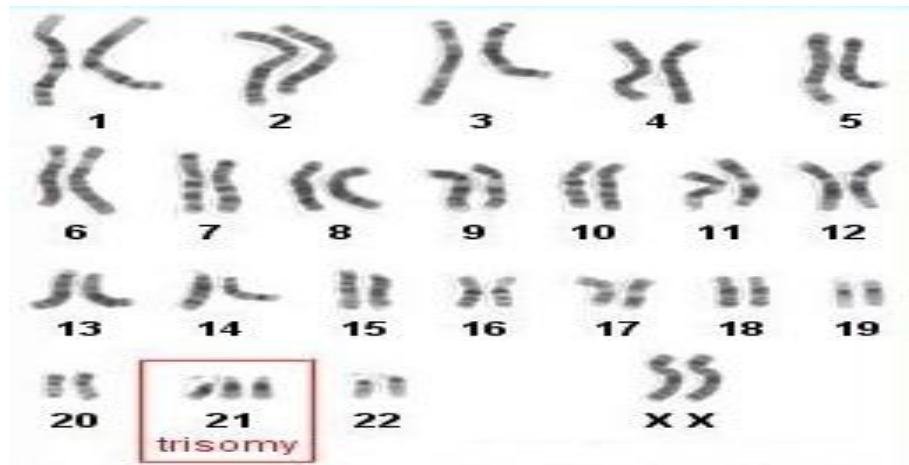
2.1.2.3. Kromozomal Anomali (KA) Testi

Kromozomal anomaliler, zararlı ajanların oluşturmuş olduğu DNA yapısındaki bozukluklardan dolayı ortaya çıkmaktadır. DNA yapısında oluşan bu bozukluklar ya onarılamayan çift zincir kırıklarından ya da yanlış onarılan kırıklardan dolayı ortaya çıkmaktadır. DNA'daki oluşan bu hasarın onarılamamasından dolayı kromozomal anomaliler ortaya çıkmaktadır[29,41-43].

Diğer genotoksisite testleri gibi bu testte mutajenik etkinin tespiti için sık kullanılan yöntemlerden biridir. Geliştirilmiş yöntemlerden olan in-vitro, memeli hücrelerinde uygulanırken, in-vivo kemik iliği hücrelerindeki kromozomal anomalilerin frekansının ölçümünde kullanılmaktadır.

Ayrıca in-vivo KA testi, kromozomal hasarın tespit edilmesinin yanında, DNA onarım mekanizmasında ve doku hasarının düzeltilmesi yönündeki faktörlerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır[22,26,44,45].

İn-vitro yöntemini ile mitoz bölünme aşamaların gerçekleştirilerek değerlendirilir. İn-vivo uygulanırken genellikle tercih edilen kemik iliğidir. Bu yöntemler uygulanırken belli bir saat aralığında hücre bölünmesini durdurmak amacıyla kolsişin maddesi uygulanmaktadır. İncelenecek olan örnekler metafaz evresindeyken alınıp değerlendirilir[26,44,46].



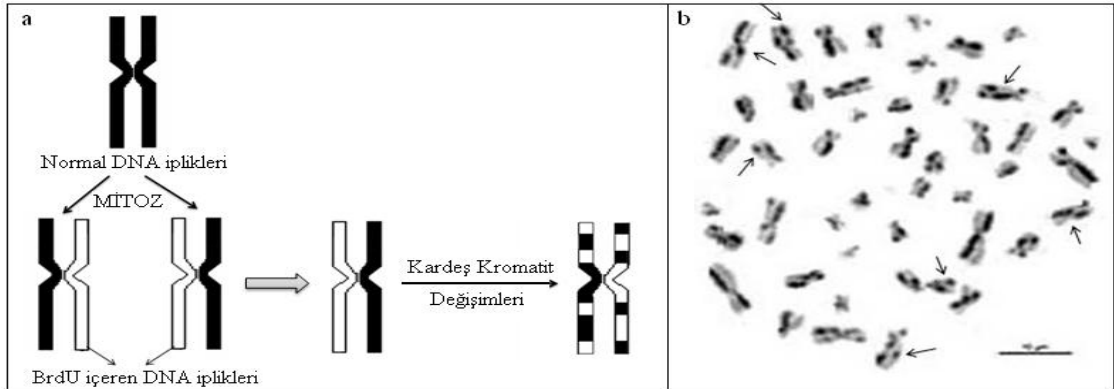
Şekil 2.3 21.kromozom çiftinde fazladan bir kromozom bulunması (Down sendromu)[47].

2.1.2.4. Kardeş Kromatid Değişimi Testi

Kardeş kromatid değişimi (KKD), kardeş kromatidlerde bulunan homolog lokuslarında DNA replikasyon materyallerinin karşılıklı olarak değiş tokuşudur ve DNA'da meydana gelmiş olan kırıkların homolog rekombinasyon yoluyla düzeltilmesini göstermektedir[48,49].

Bu test diğer genotoksisite testleri ile benzer olarak, zararlı ajanların kromozomlarda meydana getirdiği etkinin tespitinde kullanılır. Fiziksel ve kimyasal etkiler sonucu mutajenite olan hücreler incelenirken KKD frekansında olan artış miktarının paralel olarak insanlarda oluşan zararın bir göstergesidir[29,48-51].

KKD testinde, DNA'da timin analogu gibi davranan Bromodeoksiüridin (BrdU) maddesi DNA kırıklarını tespit etmek için uygulanmaktadır. BrdU maddesi, hücresel olayların gerçekleştiği esnada, kardeş kromatidler arasına girip, homolog kromozomların değişimi sırasında boyanma özelliğinden dolayı değişen parçalar hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Kültürlerde hücre bölünmesi olurken DNA'nın replikasyonu sırasında meydana gelen polinükleotid ipliğine ortamda bulunan BrdU içeren bromurasil nükleotidleri katılmaktadır. Ultraviyole ortamda incelenmeye alındığında BrdU'nun açık renkte boyanma özelliğinden dolayı DNA içine yerleşmiş olan BrdU daha iyi görünmesini sağlar (Şekil 4a). Bu boyanma özelliğinden dolayı, DNA'da oluşan kardeş kromatidler arasındaki değişen parçaların net görünüm sağlanır (Şekil 4b)[49,52-54].

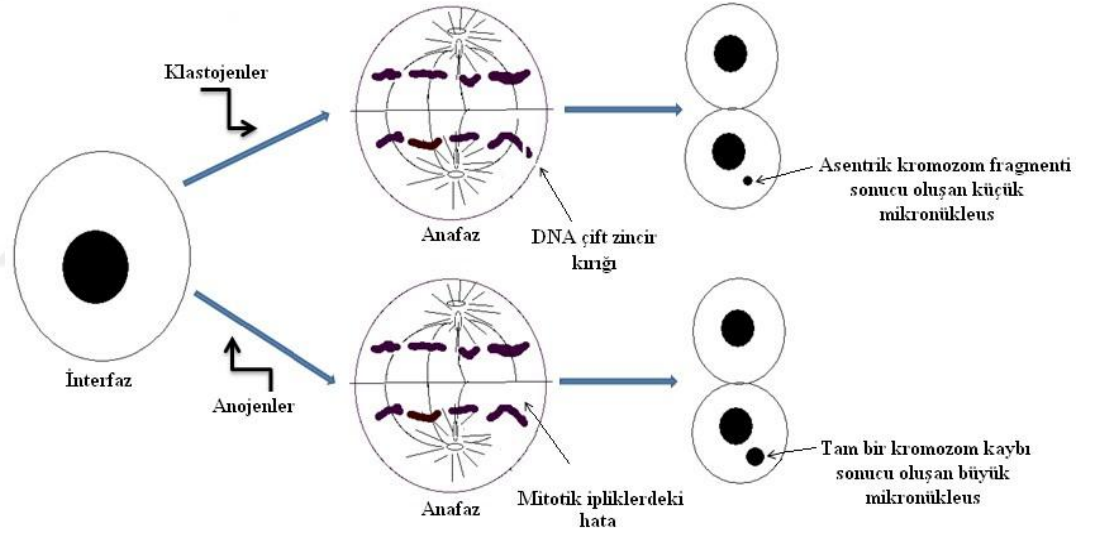


Şekil 2.4 a- BrdU içeren DNA iplikleri, b- Kromatid değişimi görünümü[49,52-54].

2.1.2.5. Mikronükleus (MN) Testi

MN testi 1950 yılında bitki hücrelerinde, 1970 yılında ise hayvan hücreleri ve insan lenfositlerinde kanserojen maddelerin zararlarının tespiti için kullanılmaya başlanmıştır[12-14].

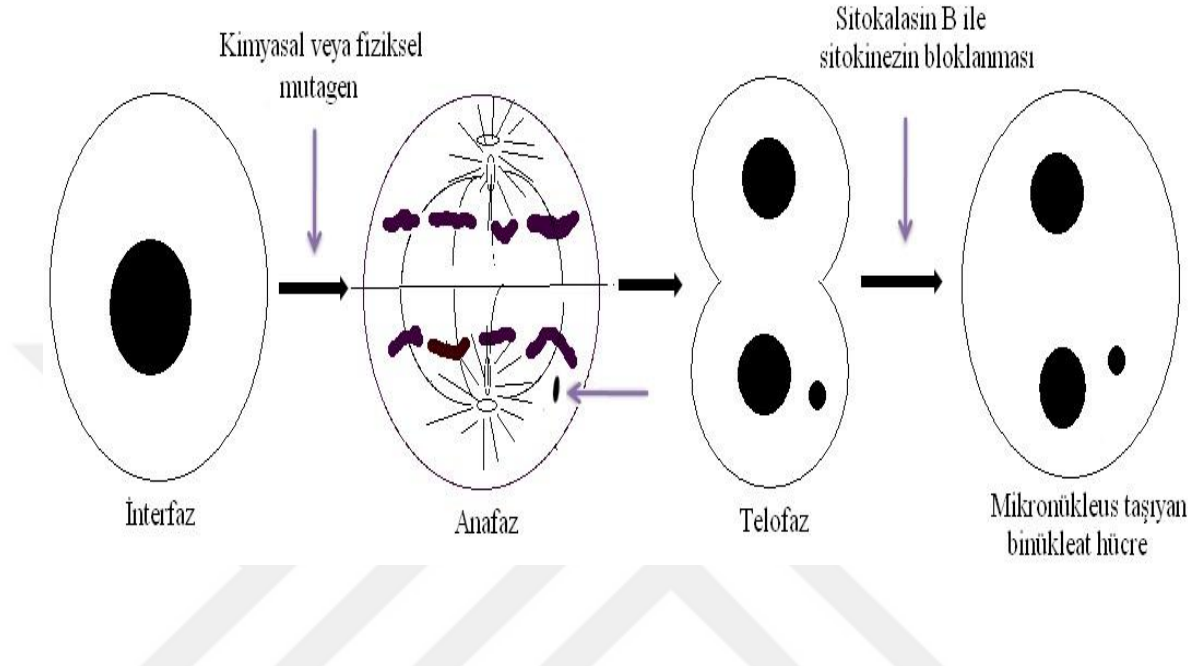
Bu testi çalışan kişiler farklı teknikler kullanmışlardır. Bu teknikler lenfosit hücrelerde ve kemik iliğinde veya periferal hücrelerinin analizinde kullanılmaktadır. Geliştirilmiş bu farklı araştırma yollarıyla anöploidi meydana getiren maddeler ile klastojen etki oluşturan maddeleri birbirinden ayırmada MN testinden yararlanılmaktadır. Klastojenlerin verdiği etki ile hücrelerde asentrik kromozomal parçalar bulunduran küçük boyutlardaki MN'ler oluşmaktadır (Şekil 5)[15,16].



Şekil 2.5 Klastojen ve anojenlerin MN üzerindeki etkileri[15,16].

Eastmond ve tucker[55] bu yöntemle yaptığı çalışmada kinetikorun pozitif MN'lerde tam bir kromozom görünüm, kinetikor negatif MN'lerin ise kromozom parçaları bulundurduğu ve bu kullanılan yöntemin anöploidi tetikleyen ajanları klastojenlerden ayıran daha kesin bir yol olduğunu göstermiştir. Bir sonraki çalışmalarda Fenech ve Morley[56] tarafından küf mantarlarının metabolitlerinde bulunan sitokalsin-B yani (cyt-B) ile mitoz geçirme özelliği olan hücrelerde sitokinez olayını durdurma yöntemine

dayanan ve bir hücre siklusunu gerçekleştiren hücrelerin binüklear görünümüyle ayırt edilebilmesini sağlayan farklı bir yöntem geliştirilmiştir (Şekil 6)[12,57-59].



Şekil 2.6 Sitokinezin durdurulması yöntemi ile binükleat hücre görünümü[12,57-59].

Sitokalasin-B bölünen hücrenin bölünmesini etkileyen mikroflamentleri meydana getirecek olan aktin moleküllere tutunarak aktin polimerizasyonu inhibe eder. Bu olaydan dolayı aktinle ilişkili bütün hareketler durdurulmakta ve sitokinez durmaktadır. Sitokinezi bloklama yöntemi ile bazı kinetik sorunlar ortadan kalkmış ve in-vitro mikronükleus tekniğinde güvenilirlik artmıştır[12,57-59].

Tespit edilecek olan lenfosit kültürlerine Cyt-B eklendikten sonra, incelenen çekirdek bölünme işlemini tamamlamış, fakat sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirmemiş olduğundan dolayı çift çekirdek oluşan hücrelerdeki MN oranı tespit edilmektedir[12,57].

Hücrelerde oluşan MN sayılırken şu kriterler göz önünde tutulmalıdır[57,60,61].

1. Hücrelerde çift nükleus bulunmalıdır. Sitoplazma yapısı belirgin görülmeli ve yapısı bakımından oval görünüme sahip olmalıdır.

2. Dağılmamış ve nükleus zarı ile çevrili olan belirgin nükleuslar yuvarlak yapıda veya oval yapıda görülmelidir.
3. Mikronükleus ana nükleusa göre 3'te 1 oranında küçük çapta olmalıdır.
4. MN oval veya yuvarlak yapıya sahip olmalıdır.
5. MN ana nükleusundan ayrılmış veya ayırt edebilecek şekilde olmalı.
6. Boya yoğunluğu kıvamında görünümü olmalıdır.
7. Hesaplanırken sitokinez iptal olmuş iki çekirdeği bulunan MN'lerin sayıları hesaplanmalıdır[57,60,61].

2.1.3. Mikronükleus Test Yöntemi

2.1.3.1. Hücre Tipleri

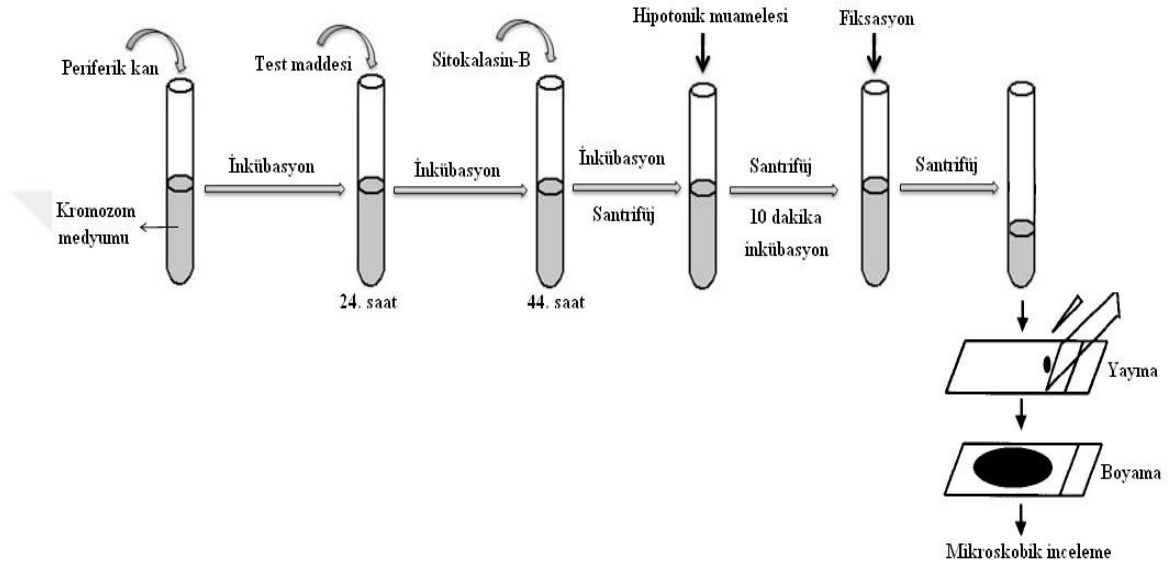
Kullanılan bu test, mitoz geçirebilen tüm hücrelerde genotoksik etkiyi belirlemek amacı ile uygulanabilir. MN testi daha çok kan ve kemik iliği hücrelerinde uygulanmaktadır. Bu test farklı organizmalar üzerinde de kullanılır. Bunlar insan hücreleri, fare, sıçan, balık gibi canlılardır[12,62-64].

İnsanlarda uygulandığı zaman daha çok periferik kan hücrelerinde uygulanır. MN testi sayesinde kanserli kişilerden alınan periferik kan hücresinde MN artış miktarı tespit edilebilir[59,65-68].

2.1.3.2. İn-Vitro Mikronükleus Testi

Alınan hücreler, mitoz bölünmesi için uygun ortam oluşturan steril tüplere aktarılır ve kültür inkübasyonuna bırakılır. Eğer kimyasal özellikteki bir kanserojen maddenin etkisi araştırılıyorsa kültüre 24. saatte test bileşiği ilave edilir. 48 saat bekletilecek olan tüpe, sitokinezi engellemek amacıyla bitime 24 saat kala (inkübasyon süresinden 48 saat sonra) Cyt-B ilave edilir. Süre bittikten sonra santrifüj edilerek süpernatant kısmı çıkarılır ve tüpe hipotonik eriyik eklenerek 10 dk. 37°C'deki inkübasyonuna bırakılır. 10

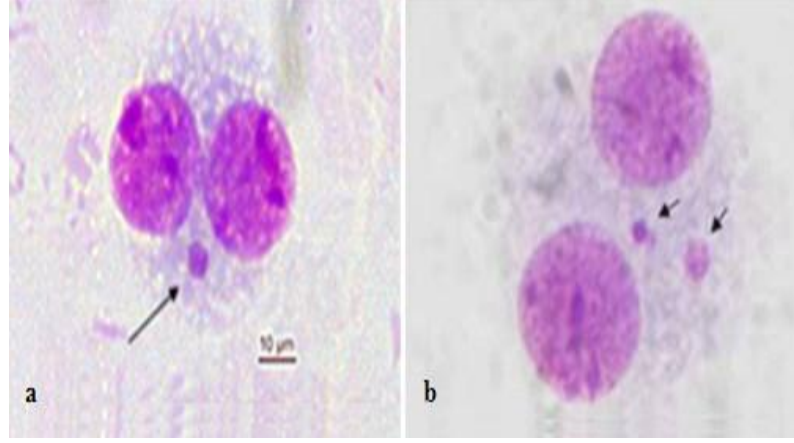
dk. bittikten sonra santrifüj işlemi yapıp tüpe glasiyel asetik asit ve metanol karışımı olan fiksatif eklenir. İlk fiksatiften sonra tüpler tekrardan santrifüj işleminden geçer ve bu işlem sıvı berraklaşınca kadar birkaç kez tekrar edilir. Tüplerden alınan örnekler preparatlara yayılarak, Giemsa boyası gerçekleştirilir. Mikroskop altında incelenmeye alınır (Şekil 7)[57,66,69].



Şekil 2.7 İn-vitro yöntem ile yapılan MN testi[57,66,69].

2.1.3.2.1. Mikronükleus Sayımının Saptanması

Oluşan MN sıklığını belirlemek için bir preparattan yaklaşık 2000 binükleat hücre ve bu hücrelerden mikronükleus bulunduranlar tespit edilir. Ayrıca tespit edilen binükleat hücrelerde bulunan mikronükleus sayısını belirleyerek, mikronükleus bulunduran binükleat olan hücrelerin toplam mikronükleus sayısı incelenen binükleat hücre sayısına bölünüp, hücre başına düşen mikronükleus ortalaması ve bu mikronükleusların yüzdesi hesaplanır (Şekil 8)[57,61].

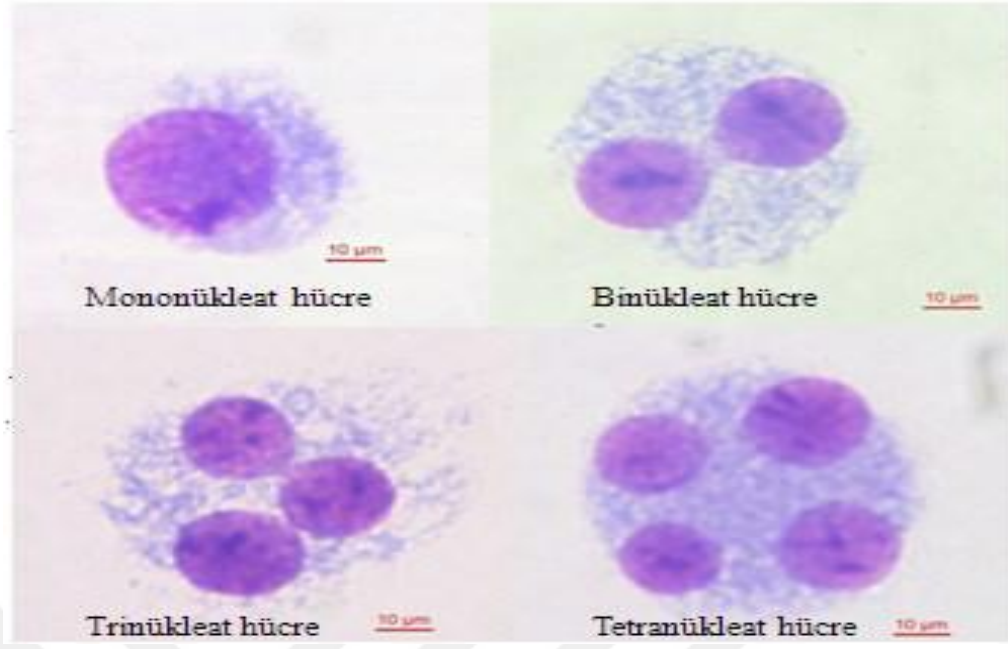


Resim 2.1. a- Bir mikronükleus bulunduran, b- İki mikronükleus bulunduran binükleat hücreler[57,61].

2.1.3.2.2. Sitotik Etkinin Belirlenmesi

Sitotoksosite yüksek oranda kromozom değişikliklerine ya da DNA'daki diğer çeşitli hasarlara bağlıdır. Nükleer bölünme indeksi (NBI) ve mitotik indeks (MI) yeterli düzeyde hücre proliferasyonu ve sitotoksiteyi belirlemek için uygulanan indikatör testlerdir. MI veya NBI deki her hangi bir eksilme durumu hücre döngüsündeki bir inhibisyonu ve hücrenin proliferasyon kapasitesindeki bir eksikliği gösterir. Bu kullanılan testler çeşitli kimyasalların hücre üzerindeki etki mekanizması hakkında bilgiler vermektedir[71,72].

Hazırlanan preparatlardan yaklaşık 2000 hücre sayılır ve bu hücrelerin içerdiği mononükleat, binükleat, trinükleat, tetranükleat olanların oranları hesaplanır (Şekil 9). Bu oranlar NBI: $(MI + 2MII+3MIII+4MIV)/N$ şeklinde hesaplanır. Sitototik etkinin görülmesi sağlanır[73-75].



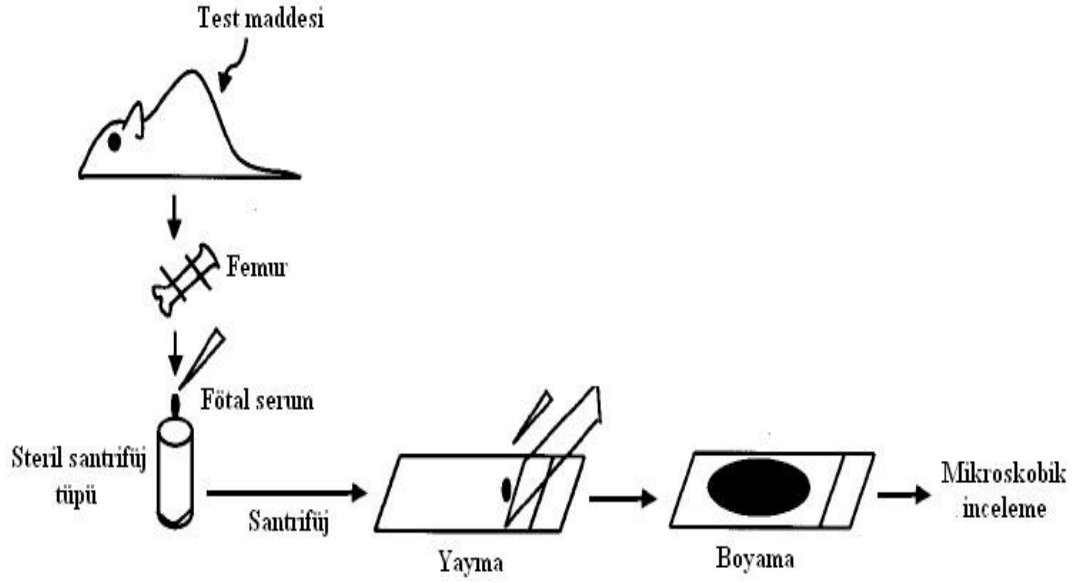
Resim 2.2 Mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücreler[73-75].

2.1.3.3. İn-Vivo Mikronükleus Testi

Bir diğer test olan in-vivo tekniği memelilerdeki mutajenik etkinin ve DNA onarım süreçlerindeki faktörlerin değerlendirilmesinde de kullanılır. Kullanılan in-vivo Mikronükleus testi ile memeli eritrositlerindeki MN sıklığının belirlendiği yöntemdir. Bu yöntem genellikle kemik iliği veya kan hücrelerinde eritrositlerin analizi yapılarak kromozomal hasarın oluşup oluşmadığının tespiti yapılır[14,76-78].

Çeşitli kanserojen madde uygulanan kemik iliğinde hücrelerin bölünme esnasında, kromozom bozukluğuna neden olur ve bölünme işlemini durdurur. Eritropoezis sırasında son mitozdan sonra kemik iliğinde bulunan eritroblastlar polikromatik eritrositlere (PCE) dönüşürken, çekirdeklerini yitirir ve bu esnada oluşan kromozomal hasar sitoplazma içerisinde mikronükleusun ortaya çıkmasına sebep olur. MN bulunduran, olgunlaşmamış (polikromatik) eritrosit sayısındaki yükseliş kromozomal bozukluğun bir göstergesidir[15,78-80].

Bu test uygulanırken, test maddesi hayvanlara verildikten sonra anestezi altında hayvan acı çekmeyeceği şekilde öldürülüp femur kemiğindeki kemik iliği tüplere alınır. Kemik iliğinden alınan örnek santrifüj edilip süpernatant kısmı atılır. Tüpten alınan örnekler lamlara aktarılarak, May-Grunwald ve Giemsa boyları ile boyanıp incelemeye hazır hale getirilir (Şekil 10)[15,78-80].

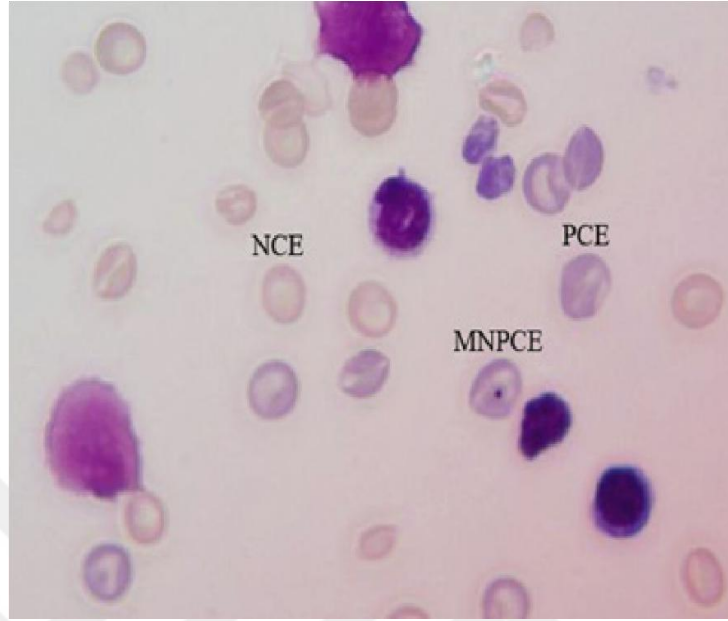


Şekil 2.8 İn-vivo Mikronükleus test protokolü[15,78-80].

2.1.3.3.1. Mikronükleus Sayımının Belirlenmesi

Mikroskop altında her preparat üzerinde rastgele 1000 adet PCE sayılır. Bu sayılan PCE'lerin içerisinde MN bulduranların sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkarılır. Yani toplam sayılan 1000 adet PCE üzerinde inceleme yapılarak bu PCE'ler içerisinde mikronükleus taşıyanlar (MNPCE) tespit edilip yüzdeleri çıkarılır. PCE'ler henüz tam olarak olgunlaşmamış eritrositlerdir. Olgunlaşmamış olmasından dolayı yapılarında halen daha ribozom bulundururlar ve ribozomlar boyandıklarından dolayı gelişimini tamamlamış olan normokromatik eritrositlerden (NCE) daha iyi bir şekilde ayırt edilebilirler. NCE'ler mikroskop altında turuncu renkte görülürken, PCE'ler mavi-yeşil

renkte görülürler. MN ise PCE'lerin içinde ana çekirdeğin 3 te 1'i küçüklüğünde bulunur (Şekil 11)[76,79,81,82].



Resim 2.3 Kemik iliğinde gözlemlenen PCE, NCE ve MNPCE[76,79,81].

2.1.3.3.2. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Herhangi bir hasarın tespitini belirlemek için preparatlardaki incelenen hücrelerde küçük olan mikronükleusların tespit edilmesi gerekmektedir. Herhangi bir kimyasal maddenin kanserojen etki gösteriyorsa incelenen hücredeki çekirdeklerin kenarında daha küçük olan mikronükleuslar oluşur. Ana çekirdeğin yanında oluşan bu mikronükleusların oranları hesaplandıktan sonra, belirlenen orandan (%6) fazla olursa genotoksik hasarın olduğu kabul edilir. Sayılan PCE ve NCE'nin birbirine olan oranında, negatif kontroldeki değerlere göre her hangi bir artış görülüyorsa maruz kalınan bileşiğin MN oluşturduğunun bir göstergesidir. NCE'ler olgunlaştıklarından dolayı ribozomları olmayan eritrositlerdir. Periferik kanda bulunurlar. Gelişimi sırasında, mutajenik etki oluşturan kimyasal madde PCE'ler üzerine etki ederek MN oluşmasına neden olur. Buna bağlı olarak kanda mikronükleuslu PCE'ler (MNPCE) meydana gelir. Bu PCE sayısında azalmaya neden olduğundan dolayı bu azalma PCE/NCE oranında da düşmeye neden olur. Bu durum sonucu maruz kalan bileşikte toksik etki olduğunun bir göstergesidir[36].

2.2. Bitki Ekstraktı

Bitkilerden elde edilen, kendi yapısına göre özgü kokusu, rengi, tadı ve uçucu özellik taşıyan, sıvı olarak açık bir şekilde oda sıcaklığında bırakıldığında uçucu özelliği bulunan karışımlara bitki uçucu yağı adı verilmektedir[17,83].

Elde edilen uçucu yağların, 2000'den fazla kimyasal bağının bulunduğu, bunların yanında uçucu olabilen azot ve kükürt içerdikleri bilinmektedir. Bitkilerden uçucu yağ elde etmek için, bitkinin ya belirli organlarından ya da bitkinin tamamının kullanılması gerekmektedir[84].

2.2.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimi

Bitkiler türlerine göre farklı yapılarda kimyasal bileşikler içerdiklerinden dolayı değişik özellikler gösterirler. Yapılarında terpenik maddeler, aromatik maddeler ve kükürt, azot taşıyan bileşikler şeklinde sınıflandırılırlar. Uçucu yağların neredeyse tamamı (yaklaşık %90) kimyasal bileşiklerinde bulunan terpenik maddelerden oluşmuştur[85].

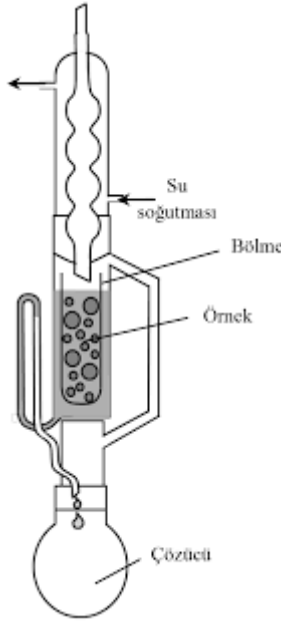
2.2.2. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

Uçucu yağ almak için, kullanılan su buharı destilasyon yöntemi en çok tercih edilen yöntemdir. Uçucu yağ alınacak olan bitkilerin bulunduğu ortamdaki verimliliklerine göre farklılık gösterir ve ortalama %0.53 arasındadır[86].

Uçucu yağ elde etmek için uygulanacak olan testin, önce bitkinin ısıya dayanıklılığına, uçucu yağın miktarına, suda çözünüp çözünmemesine uygun olup olmadığı tespiti yapılmalıdır[87].

Destilasyon yöntemleri, sıvıların kaynama noktalarındaki farklılıklara göre değerlendirilerek, bir ayırma işlemi olup bu yöntem; su, buhar ve vakum destilasyonları olarak 3 kısımda incelenir[88].

Destilasyon: Bu ayırma işleminde cam düzenden oluşan Clavenger Aparatı adı verilen düzener kullanılmaktadır. Bu yöntem belirli bir miktardaki bitki parçalarının su



Şekil 2.10 Soxhlet Aparatı

Uçucu yağ elde etmek için bazı ekstraksiyon yöntemleri;

- Organik çözücü ile ekstraksiyon: Drog, benzen, hekzan, heptan gibi farklı özelliklerdeki çözücülerle yapılan ekstraksiyon yöntemidir. Bu esnada uçucu yağ, sabit yağ, mum ve boya organik çözücü haline geçer ve bu çözücünün alçak basınç uygulanarak uçurulmasıyla da saf uçucu yağ elde edilir[88].
- Sabit yağ ile ekstraksiyon: Uçucu yağ elde etmek için bu yöntemde en çok kullanılan yağ domuz yağıdır. Bunun nedeni domuz yağının kokusuz ve renksiz yapıda olması[88].
- Sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon: Bu yöntemde en fazla CO₂ den yararlanılmaktadır. İşlem sıvılaştırma özelliği bulunan gazın, kritik noktasında (72 kg/cm basınç ve 30 C sıcaklıkta), yüksek basınçlı ekstraksiyon kabında drog üzerinden sirkülasyonla gerçekleştirilir. Çözücü gaz, ekstreden buharlaşma ile uzaklaştırılır. Çözücü artığı içermediğinden dolayı bu yöntem ile elde edilen yağ oldukça değerlidir[88].

2.3. *C. cyminum* Bitkisinin Genel Özellikleri

Kimyon bitkisinin M.Ö. 1550'li yıllardan itibaren Mısır'da kullanılan tıbbi bitkiler arasında olduğu tahmin edilmektedir. Mayıs-Haziran dönemleri arasında yetişen maydanozgiller (Apiaceae) familyasına fizyolojik özelliği bakımından beyaz ve pembemsi renkte çiçek açan, 40- 60 cm boya kadar uzanabilen tek yıllık otsu bitki türleri arasındadır. Doğu Akdeniz ve Orta doğuda çok fazla bulunduğu bilinmektedir. Gövdeleri dik yapıda olup ve üst kısımlara doğru dallanma özelliği gösterir. Yaprakları çizgili ve tüysüz, çiçekleri ise şemsiye yapısında olan bir özelliğe sahiptir. Meyve yapısı köşeli ve oval, 4-5 mm boyda olmaktadır. Kimyon bitkisinin tohum kısmı toplanıp kurutularak baharat çeşiti olarak kullanılmaktadır. Acı, keskin ve sert bir tada sahip olan bu bitkinin meyveleri % 2.- 5,5 uçucu yağ, % 9- 24 sabit yağ, % 14-26 protein, tanen, flavonoid, reçine içerir[6].

2.3.1. *C. cyminum* Bitkisinin Sistematığı

Alem: Plantae

Bölüm: Angiosperms

Sınıf: Eudicots

Takım: Apiales

Familya: Apiaceae

Cins: Cuminum

Tür: *C. cyminum*

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan Materyali (*Mus Musculus*)

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

Çalışmada ağırlıkları 20 ± 1 gr. arasında değişen, 8 haftalık dişi mus musculus cinsi fareler kullanıldı. Mikronükleus sıklığını belirlemek amacıyla 40 adet fare kullanıldı. Zarar görmeyecek şekilde kafeslerde barındırıldı. Hayvanlar kafeslere 10'lu gruplar halinde ayrılarak konuldu. Oda sıcaklığı 20 ± 2 °C oda sıcaklığında 12 saat ışık 12 saat karanlık bir ortamda su ve besin ihtiyaçları giderilerek barındırıldı. Verilecek olan madde negatif kontrol hariç diğer gruptaki farelerin vücut ağırlıklarına göre farklı dozlarda oral yol ile verildi.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

3.1.2.1. Kimyon

Kimyon bitkisi uçucu eterik yağ haline dönüştürüldü. Bu madde gruplara ayrılan farelere hesaplanan miktarda 24 saatte bir peş peşe iki gün oral yol ile verildi. Bu maddenin verildiği günler farelerin tükettiği su ve besinlerinde herhangi bir değişiklik yapılmadı. İlk gruptaki fareler için ağırlıklarına göre toplam 250 mg/kg, ikinci gruptaki fareler için ağırlıklarına göre toplam 500 mg/kg ve üçüncü gruptaki farelere için ağırlıklarına göre toplam 1000 mg/kg miktarında verildi.

3.1.2.2. Eter

Eter veya etoksietan olarak bilinen dietil eter kaynama noktası düşük olup kendine özgü bir kokusu vardır. Çalışmada farelerin kesiminden önce anesteziik madde olarak kullanıldı.

3.1.2.3. Sorensen Tampon (Sorensen Buffer) Çözeltisi

Bu tampon stok çözelti halinde hazırlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında kapalı kaplarda saklandı. Çalışmanın amacına uygun olarak birbiriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanıldı.

3.1.2.4. Giemsa

Giemsa boyası preperatların boyanması için kullanıldı. Boyama için yüzde 20 oranında Giemsa hazırlandı. %20'lik Giemsa boyası hazırlanırken %80 tampon çözeltisi ve %20 Giemsa boyası karıştırılarak hazırlandı.

3.1.2.5. May-Grunwald

Deneyde kullanılmak üzere temin edilen bu boya boyama işlemlerinde kullanıldı. Boyayı hazırlarken %0.25 ve %1.125'lik boya solüsyonu olacak şekilde hazırlandı ve praperat boyamasında kullanıldı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Diğer Ekipmanlar

3.1.3.1. Hassas Terazi

Deney hayvanlarında verilecek olan maddenin miktarının hassas olduğundan dolayı 0,1 gibi düşük ağırlıkta olmasından dolayı miktarların belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

3.1.3.2. Santrifüj

5000 Rpm'e kadar yükselebilen şekilde devir hızı olabilen 15'dk zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli ELEKRO-MAG marka santrifüj çalışmada kullanıldı.

3.1.3.3. Mikroskop

Fotoğraf makinesi ve kamera ayarlanabilen ışık mikroskobu kullanıldı. Deney amacı olan hücre sayımı ve gözlemlenmek istenen preparatlar mikroskop altında incelendi.

Kullanılan diğer deney ekipmanları

1. Etüv (Elektro-mag M420 Bp)
2. Vorteks (Yellowline)
3. Mikroskop (Olympus model CHK)
4. Derin dondurucu
5. Otomatik pipet
6. Fotomikroskop (Olympus BH-2,Nikon Coolpix 8800)

Sarf Malzemeler

1. Heparin (Roche)
2. Metanol (Merck)
3. İmmersiyon yağı (Merck)
4. Alkol (Merck)
5. Distile su
6. Tüplük
- 7.Çeşitli cam malzemeler
8. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
9. Enjektör
10. Çeşitli ebatlarda puarlar
11. Pasteur pipeti
12. Lam
13. Lamel

3.2. Metot

3.2.1. Gruplar

1. Grup (negatif kontrol grubu) n=10: Normal beslenmelerinin yanı sıra, diğer gruptaki farelere yapılan uygulama gibi 24 saatte bir, iki kez çeşme suyu oral gavaj yol ile verildi.

2. Grup(250mg/kg): Bu gruptaki 10 adet fareye her birinin ağırlıklarına göre toplam 250mg/kg olacak şekilde kimyon uçucu bitki yağı oral yol ile her 24 saatte bir, iki kez verildi.

3. Grup(500mg/kg): Bu gruptaki 10 adet fareye her birinin ağırlıklarına göre toplam 500mg/kg olacak şekilde kimyon uçucu bitki yağı oral yol ile her 24 saatte bir, iki kez verildi.

4. Grup(1000mg/kg): Bu gruptaki 10 adet fareye her birinin ağırlıklarına göre toplam 1000mg/kg gelebilecek şekilde kimyon uçucu bitki yağı oral yol ile her 24 saatte bir, iki kez verildi.

3.2.2. Mikronükleus Testi

Çalışmamızdaki mikronükleus testinde eritrositlerden daha kolay yararlanabilmemiz için farenin kemik iliği kullanıldı. Test maddesi verilen fareler 48 saatin sonunda kesildi. Femur kemikleri ikiye bölünerek enjektör yardımı ile dana serumu bulunduran tüpe alındı. Tüpler 2000'rpmde 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Tüplerin üzerine birkaç damla serum konularak süspanse edildi. Bu işlemlerden sonra tüpten 1 damla alınarak lam üzerine yayıldı ve lamlar kurutulmaya bırakıldı[82].

3.2.3. Boyama İşlemi

Hazırlanan preparatlar ilk önce %0.25'lik oranda May-Grunwald ile 5'dk boyanarak saf sudan geçirildi. Daha sonra %0.125'lik oranda tekrardan May-Grunwald boyası ile 5'dk boyanarak saf sudan geçirildi ve kurutulmaya bırakıldı. Bu işlemlerden sonra boyama işlemi olarak preparatlar %20'lik oranda Giemsa boyası içerisinde 30'dk bekletildi ve preparatlar kurutulup 1000 büyüklükte rastgele her bir preparattan 1000 adet PCE sayıldı. Bu PCE'lerin içerisinde MNPCE'lerin sayıları belirtilerek, yüzdeleri çıkarıldı[82].

4.BULGULAR

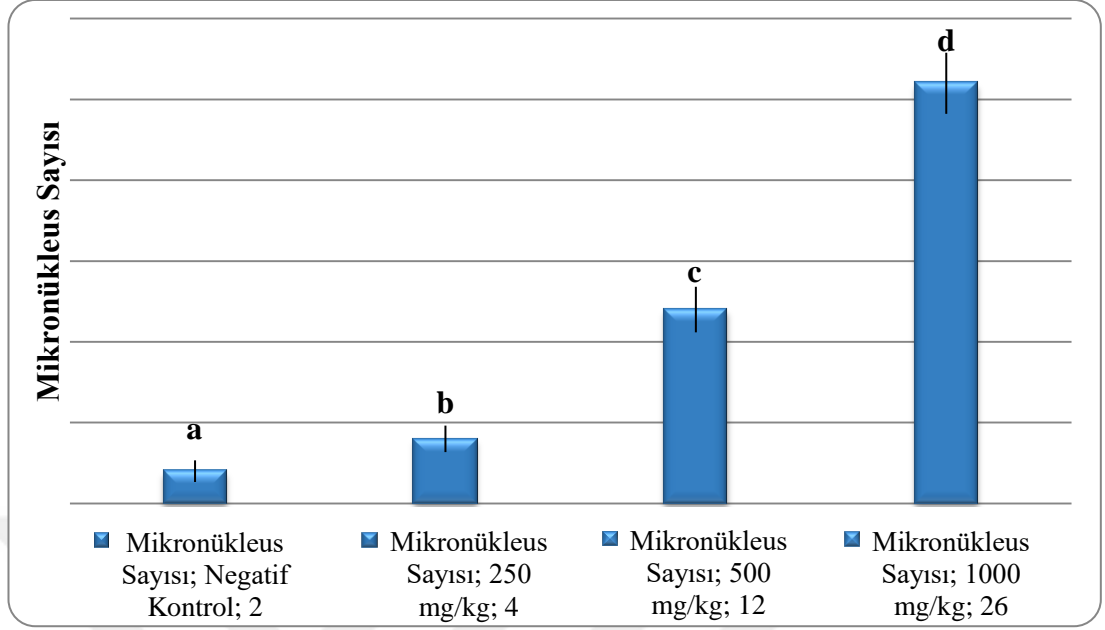
4.1. İn vivo Deney ve Kontrol Gruplarının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığı Üzerindeki Etkileri

Kimyon bitki uçucu yağı farelere belirlenen miktarda verilerek MN sıklığı tespit edildi. Negatif kontrole hiçbir madde verilmedi ve genotoksik hasar görülmedi. 250 mg/kg verilen farelerde MN sıklığı sayıldı ve 4 adet MN olduğu tespit edildi. 500 mg/kg verilen farelerde 12 adet 1000 mg/kg verilen farelerde 26 adet MN sayıldı. Bu sayıların miktara göre artması, uygulanan kimyon bitki uçucu yağının miktarının artması ile genotoksik hasarın artmasının doğru orantılı olduğunu gösterdi.

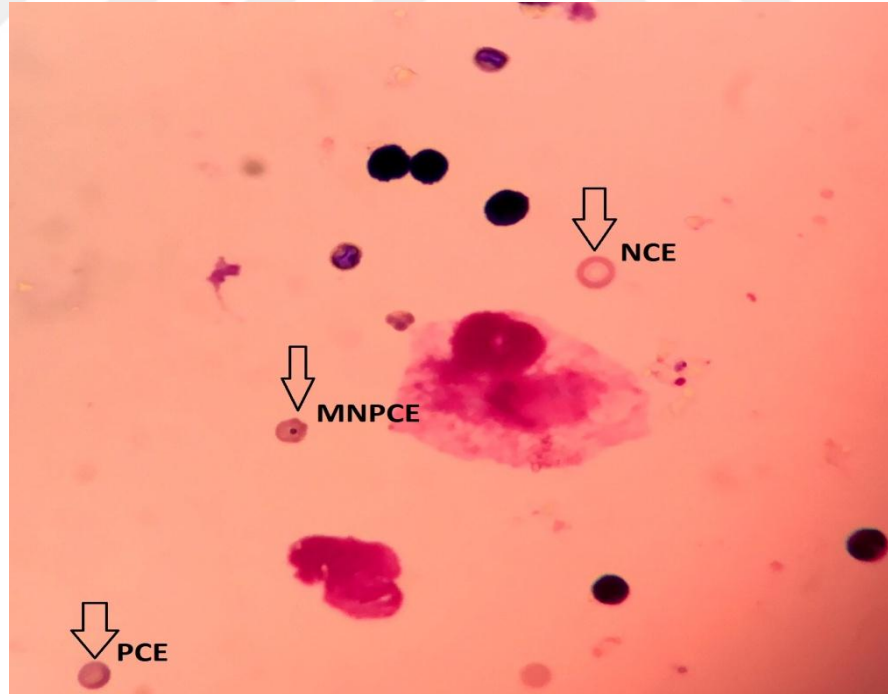
Kimyon uçucu yağı uygulamasının farelerde mikronükleus sayıları üzerine etkileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde negatif kontrole göre 250 mg/kg, 500 mg/kg ve 1000 mg/kg dozunda kimyon uçucu yağının mikronükleus sayılarını istatistiksel olarak önemli oranda artırdığı tespit edildi ($p<0.001$). Kimyon uçucu yağı uygulanan gruplar kendi arasında kıyaslandığında ise doz artışına bağlı olarak mikronükleus sayılarının artış gösterdiği saptandı (Tablo 1, Grafik 1).

Gruplar	Negatif Kontrol	250 mg	500 mg	1000 mg	P Değeri
Mikronükleus Sayısı	2±0.67 ^a	4±0.82 ^b	12±1.41 ^c	26±1.89 ^d	0.001

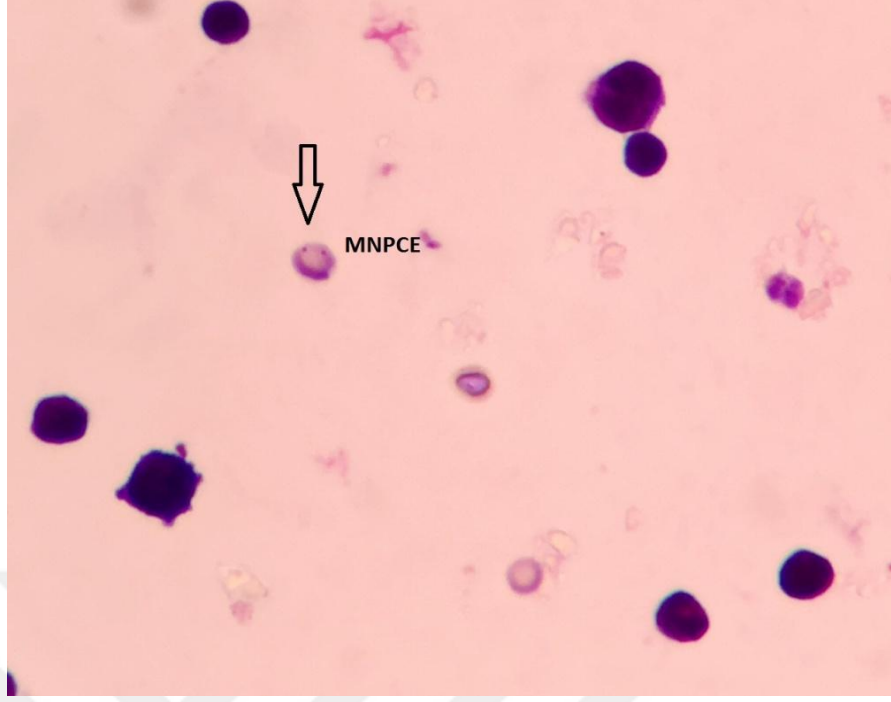
Aynı satırda farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.



Grafik 4.1 Kimyon uçucu yağı uygulanan farelerde mikronükleus sıklığı



Resim 4.4 Deney Grubu Farelerin Kemik İliği Hücrelerinde MNPCE ve normal PCE, NCE (X1000)



Resim 4.5 Deney Grubu Farelerin Kemik İliği Hücrelerinde iki mikronükleuslu PCE
(X1000)

Tablo 4.1 Negatif kontrol grubu sonuçları

Örnek	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE Oranı (%)
1	1000	3	0.3
2	1000	4	0.4
3	1000	3	0.3
4	1000	5	0.5
5	1000	4	0.4
6	1000	3	0.3
7	1000	2	0.2
8	1000	4	0.4
9	1000	4	0.4
10	1000	3	0.3
Grup Ortalaması		3.5	0.35

Tablo 4.2 250 mg/kg Kimyon uçucu yağı uygulanan 1. Deney grubu MN test sonuçları

Örnek	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE Oranı (%)
1	1000	4	0.4
2	1000	3	0.3
3	1000	4	0.4
4	1000	4	0.4
5	1000	4	0.4
6	1000	6	0.6
7	1000	4	0.4
8	1000	4	0.4
9	1000	4	0.4
10	1000	3	0.3
Grup Ortalaması		4	0.4

Tablo 4.3 500 mg/kg Kimyon Uçucu Yağı Uygulanan 2. Deney Grubu MN Test Sonuçları

Örnek	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE Oranı (%)
1	1000	12	1.2
2	1000	14	1.4
3	1000	10	1
4	1000	12	1.2
5	1000	11	1.1
6	1000	13	1.3
7	1000	12	1.2
8	1000	14	1.4
9	1000	10	1
10	1000	12	1.2
Grup Ortalaması		12	1.2

Tablo 4.4 1000 mg/kg Kimyon uçucu yağı uygulanan 3. Deney grubu MN test sonuçları

Örnek	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE Oranı (%)
1	1000	26	2.6
2	1000	24	2.4
3	1000	28	2.8
4	1000	26	2.6
5	1000	23	2.3
6	1000	29	2.9
7	1000	25	2.5
8	1000	28	2.8
9	1000	25	2.5
10	1000	26	2.6
Grup Ortalaması		26	2.6

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüm dünyadaki insanlar, hastalıkları tedavi edici özelliklerinden dolayı bitkileri sıklıkla kullanmaktadırlar. Kullanılan bu bitkiler geçmişten günümüze kadar bazı bilgilerin kalmasıyla insanların hiçbir şekilde doktorlara danışmadan kullandıkları bilinmektedir. Bu bitkiler sadece tedavi amaçlı olmayıp, insanlar tarafından gıda olarak da tüketilebilmektedirler. Bu bitkilerin faydalarının yanında, kullanılacak olan dozun ayarlanamaması sonucunda yüksek miktarda tüketildiği takdirde çeşitli genotoksik etkiler bırakabileceği yapılan çalışmalarda görülmektedir. Kompleks hidrokarbonların bir karışımı olan bitki uçucu yağları terpenlerden oluşmaktadır. Bitki uçucu yağları, temizlik ürünlerine koku maddesi, gıda ve içecek katkı maddesi olarak ayrıca kozmetikte sıklıkla kullanılmaktadır. Bu uçucu yağların toksisitesi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Uçucu yağlar ile ilgili genellikle antimikrobiyal etkiler çalışılmıştır. Antimikrobiyal özellik dışında kanserojenik, mutajenik, teratojenik etkilerinde bulunduğu yapılan birçok çalışmayla ortaya konmuştur[1].

Yapılan bazı çalışmalarda in-vivo yöntem kullanılarak çeşitli bitki ekstraktlarının zararlı etkileri tespit edilmiştir.

Rodrigues Alves A. ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada geleneksel tıpta kullanılan *Rubus İmperialis* bitki uçucu yapının genotoksik etkisini MN testi ile araştırmışlardır. Gruplara ayırdıkları farelere üç farklı doz (50, 250,500 mg/kg.) vücut ağırlıklarına göre intraperitoneal yolla vermişlerdir. Maddeleri verdikten sonra fare kemik iliğini alarak MN testini uygulamışlardır. PCE ile NCE sayarak (PCE/NCE oranı) hesaplayarak değerlendirmişler. Sonuç olarak yüksek doz uygulanan farelerde mikronükleus sıklığında artış olduğu görülürken, düşük dozlarda herhangi bir artış meydana gelmediğini saptamışlardır[91].

Vinod ve arkadaşlarının bu çalışmadaki amaçları *Azadirachta indica* bitki ekstraktının fareler üzerinde oluşabilecek genotoksik etkilerini Ames *Salmonella* ve Mikronükleus testi ile tespit etmeyi amaçlamışlardır. *Salmonella* testini uygularken 8 farklı suşlardan Aroclor-1254 uyarılmış sıçan karaciğer homojenatı (S9) varlığında ve MN sıklığında gözlem yapmışlardır. Bitki ekstraktları farelere verildikten sonra yapılan *Salmonella*

testinde *Salmonella Typhimurium* suşlarında bir artış tespit etmişlerdir. Yine bu bitki ekstraktının etkisinin tespiti için farelerin kemik iliği alınarak MN testi yapılmıştır. Bulgularda MN sayısında artış tespit edilmiştir. Sonuç olarak *Salmonella* ve MN testi sonucunda *A.indica* bitki ekstraktının genotoksik etki oluşturduğunu tespit edilmiştir[92]

Grover P. ve arkadaşları yapmış olduğu bu çalışmada, gelecekte böcek ilacı olarak kullanılması için araştırılan *Annona Squamosa* (AS) bitkisinin genotoksik etkisinin olup olmadığını MN testi, Comet testi ve kromozomal sapma testlerini kullanarak araştırmışlardır. Çalışmayı in-vivo olarak 75,150 ve 300 mg/kg. doz aralığında farelere vererek değerlendirmişlerdir. Buldukları bulgulara göre Comet testi göç aralığında ve MN testi sonucu hasarlı mikronükleus artışında önemli derecede bir artış olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak ilerde böcek öldürücü olarak kullanılmak istenen AS bitkisinin genotoksik hasar oluşturabileceğini açıklamışlardır[93].

Tolentino F. Ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada halk arasında bazı hastalıkların tedavisinden kullanılan *Rosaceae* familyasına ait *Rubus Niveus Thunb* (RNT) bitkisinin canlılar üzerinde DNA hasarı olup olmadığını MN testi ile araştırmışlardır. Çalışmalarını fareler üzerinde in-vivo olarak, 500, 1000, ve 2000mg/kg doz aralıklarını vücut ağırlıklarına göre vererek çalışmalarını uygulamışlardır. MN testi uygulayarak oluşan DNA hasarını tespit etmeyi amaçlamışlardır. Sonuç olarak MN testi sonucu, az uygulanan dozdaki farelerde herhangi bir mikronükleus artışı görülmezken, çok dozda uygulanan farelerde ise gözle görülecek kadar mikronükleus artışını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara bakılarak RNT bitkisinin genotoksik etki oluşturabileceğini açıklamışlardır[94].

Hwang E. ve arkadaşları yapmış oldukları bu çalışmada amaçları *Z.piperitum* uçucu yağının güven aralığını yani genotoksik hasar oluşturup oluşturmadığını araştırmışlardır. Risk aralığını değerlendirirken MN testi, Kromozomal anomali testi ve *Salmonella* testini uygulamışlardır. Farelere oral yolla *Z.piperitum* ekstraktını 2 gün boyunca 1000 mg/kg vücut ağırlıklarına göre oral yolla vermişlerdir. Sonuç olarak uygulanan bütün testlerde genotoksik hasar olduğunu gözlemlemişlerdir[95].

Bu çalışmalarla bitki ekstraktları ve bitki uçucu yağlarının zararlı etkileri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra birçok yapılan çalışmalarda ise bazı bitki ekstraktları ve uçucu

yağlarının genotoksik etkisinin olmadığı veya tedavi edici özelliği olduğu tespit edilmiştir.

Oliveira Meneguetti D. ve arkadaşları yağmış olduğu bu çalışmada Amazon ormanlarında sıklıkla bulunan ve ilaç olarak kullanılan *Maytenus Guyanensis* bitkisinin genotoksik etkisini araştırmışlardır. Çalışmada yaklaşık ağırlığı 40 gr. Olan *Mus Musculus* türünden erkek ve dişi fareler kullanmışlardır. Ekstrakt olarak verilen *M. Guyanensis* maddesi her bir fareye 10 gr. Vücut ağırlığına göre 0.1 ml. ağız yolla verilmişlerdir. Farelerden kemik iliği alarak MN testi uygulamışlar. Sonuç olarak MN sıklığında her hangi bir artış tespit etmemişlerdir[96].

Şekeroğlu Z. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada birçok hastalığın tedavisinde kullanılan *Viscum Albüm* bitkisinin, Metotreksat (MTX) uygulanan farelerde oluşan genotoksik bozuklukları, *Viscum Albüm* bitki ekstarktının önleyici etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. VAE bitki ekstarktını 10 gün boyunca 250 mg/kg. vücut ağırlıklarına göre uygulamışlardır. MTX uygulanan farelerde oluşan bozuklukları, bu uygulanan VAE ekstarktının hasarları önleyici etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir[97].

Souza Marques E. ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, Bolivya halkının tıbbi olarak kullandığı, gastrit, romatizma ve inflamasyon tedavisinde kullanılan *Garcinia achachairu Rusby* (GAE) bitkisinin genotoksik etkisi olup olmadığını tespit etme amaçlı çalışmışlardır. Bu çalışmada in-vivo yöntemi ile Comet deneyi ve MN testini kullanmışlardır. Yapılış olarak GAE bitki ekstarktını 500, 1000, 2000 doz aralığında farelere oral yol ile vermişlerdir. Comet testini lökosit hücreler üzerinde, MN testini ise kemik iliği hücrelerinden aldıkları örneklerle incelemişlerdir. Çalışma sonunda Comet testi sonuçlarında lökosit hücrelerde ve MN testi sonucu oluşan PCE/NCE oranında herhangi bir soruna rastlamamışlardır. Sonuç olarak GAE bitkisinin herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir[98].

Mengs U. Ve arkadaşları yapmış oldukları bu çalışmada, daha önce Ames testi ile çalışılıp herhangi bir zararı olmadığı tespit edilen *Senna* özü bitkisinin, güvenilirliği açısından MN testini uygulayarak araştırmışlardır. Çalışmayı yaparken in-vivo yöntem ile farelere 2000 mg/kg *Senna* ekstarktını oral yol ile vermişlerdir. Madde verilen farelerden alınan kemik iliği örneklerini MN testi ile incelemişlerdir. Sonuç olarak

Ames testinde olduğu gibi MN testinde de, *Senna* özünün herhangi bir genotoksik etkisine rastlanmamıştır[99].

Li N. Ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmayı, halk arasında kozmetik ürün olarak kullanılan *Manolya* kabuğu ekstresinin (MKE) canlı üzerinde herhangi bir genotoksik etki oluşturup oluşturmadığının tespiti amacıyla yapmışlardır. Bu çalışmayı in-vitro bakteriyel mutasyon testi ve in-vivo mikronükleus testi olarak çalışmışlardır. Testler sonucu farelere uygulanan MKE özü sonucu *Salmonella* suşlarında ve mikronükleus sayısında herhangi bir değişime rastlanmamışlardır. Sonuç olarak yapılan MN ve bakteriyel testler sonucu MKE ekstraktının herhangi bir genotoksik hasara yol açmadığını açıklamışlardır[100].

Bitki ekstraktları ve uçucu yağları ile in-vivo yöntem kullanılarak yapılan çalışmaların yanı sıra, in-vitro yöntem kullanarak yapılmış bazı çalışmalarda mevcuttur.

Irmak D. *Thymbra spicata* ve *Cuminum Cyminum* uçucu yağlarının insan periferik lenfosit kültüründe in-vitro yöntem ile genotoksik etkilerini incelemek amacıyla yapmış olduğu çalışmada, *Thymbra spicata* ve *Cuminum Cyminum* bitkilerinden elde ettiği ekstraktları belirli bir doz miktarı aralıklarında uygulamıştır. Aynı zamanda pozitif kontrol grubuna MMC maddesi vererek mikronükleus oluşumunu sağlamıştır. Çalışmasını incelerken diğer gruplara vermiş olduğu gruplarda az miktardan çok miktara doğru uygulanan ekstraktlarda doz miktarına göre mikronükleus artış miktarını tespit etmiştir. Bulduğu sonuçları karşılaştırarak dozun miktarı arttıkça mikronükleus miktarında da artış tespit etmiştir[101].

Gül ve ark., *Urtica dioica L.*, bitki uçucu yağını in-vitro yöntem metodunu kullanarak insan lenfosit hücrelerinde genotoksik hasar oluşturup oluşturmadığını araştırmışlardır. Bu uygulamayı yaparken CA ve MN test sistemin kullanmışlardır. Dört farklı doz uygulayarak doz oranlarına göre etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda en küçük doz miktarı uygulanan grup hariç diğer doz uygulanan gruplarda kromozomal aberasyon tespit edilirken, mitotik indekste azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca uygulanan tüm doz aralıklarında MN sayısında artış olduğunu saptamışlardır[102].

Geleneksel olarak halk arasında gerek tıbbi gerekse baharat olarak kullanılan kimyon bitkisinin ekstrakt ve uçucu yağının genotoksik etki gösterdiği söylenebilir. Çeşitli

çalışmalarla belirlenen genotoksik etkinin kullanılan kimyonun yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Kullanılan bitki ekstrakt ve uçucu yağlarının ortaya çıkardığı genotoksik etkinin tam anlamıyla belirlenebilmesi için bu bitki bileşenlerinin yapısındaki kimyasalların izole edilmesi gerekmektedir. Ekstrakt ve uçucu yağ içerisindeki kimyasal bileşenlerin ayrı ayrı sitogenetik analizlerden geçirilerek tespit edilmesi konunun anlaşılmasına fayda sağlayacaktır. Halk arasında gerek tıbbi amaçlı gerekse de tüketime yönelik kullanımlarda kullanım miktarı bilinçli olarak belirlenmelidir.

Sonuç olarak; tıbbi ilaç ve baharat olarak tüketilen kimyon bitkisinin uçucu yağının fare kemik iliği hücrelerinde 250 mg/kg, 500 mg/kg ve 1000 mg/kg dozlarında verilerek mikronükleus sıklığı tespit edildi. Farelere verilen kimyon uçucu yağının doz miktarı arttıkça mikronükleus sayısında da bir artış gözlemlendi. 250 mg/kg kimyon uçucu yağı verilen farelerde ortalama olarak 4 adet mikronükleus gözlenirken, 500 mg/kg verilen farelerde 12 adet 1000 mg/kg verilen farelerde 26 adet mikronükleus sayıldı. Kimyon uçucu yağı uygulamasının farelerde mikronükleus sayıları üzerine etkileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde negatif kontrole göre 250 mg/kg, 500 mg/kg ve 1000 mg/kg dozunda kimyon uçucu yağının mikronükleus sayılarını istatistiksel olarak önemli oranda artırdığı tespit edildi ($p < 0.001$). Kimyon uçucu yağı uygulanan gruplar kendi arasında kıyaslandığında ise doz artışına bağlı olarak mikronükleus sayılarının artış gösterdiği saptandı.

6. KAYNAKLAR

- [1]. Baytop, T., “Therapy with Medicinal Plants in Turkey Past and Present” , 2nd edition, ISBN:975-420-021-1 Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1999.)
- [2]. Farnsworth, N.R.,et al., The Bulletin of WHO., s63, s9865-s9871 (1985)
- [3]. Başaran, A. A., 2012. ‘Ülkemizde bitkisel ilaçlar ve ürünlerde yasal durum’. Türk eczacılar Birliği Yayını / Meslek içi Sürekli Eğitim Dergisi, Sayı: 27-28, 22-26.)
- [4]. Bayram, E., Kırıcı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ., ‘Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Üretimini Arttırılması Olanakları’. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-I, 437-456, Ankara, Ocak 2010.)
- [5]. İlçim vd, 1998. ‘Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması’ , Tr.J. of Biology, Sayı:22, 119-125.)
- [6]. Zeybek, N., Zeybek, V., “Kapalı Tohumlu Bitkiler Sistematığı”, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 2. Baskı, İzmir, 1994- Peter, K.V., “Hanbook of herbs and spices”, ISBN: 0 8493-1217-5, Published in North and South America by CRC Press, USA, 2000.
- [7]. Millard, L.G., “Contact sensitivity to toothpaste”, Br. Med. J., 1(5854), s.676, (1973).
- [8]. M. Shah et al. “Contact allergy in patients with oral symptoms: A study of 47 patients” Am. J. Contact Derm., s07, 146-151, (1996).
- [9]. Güley, M., Vural, N., “Toksikoloji Laboratuvar Kitabı”, ISBN: 975-482-289-1, Ankara Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 1975)
- [10]. Kramer, P.J., “Genetic Toxicology”, J Pharm Pharmacol; s50, 395-405, (1998).
- [11]. Jena et al. “Genotoxicity Testing, a Regulatory Requirement For drug Discovery and Development Impact of ICH Guidelines” Indian J. of Pharmacol., s34, 86-99, (2002).

- [12]. Demirel S, Zamani A. MN tekniği ve kullanım alanları. Genel Tıp Dergisi, 2002; 12(3): 123-7
- [13]. Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, RaczekZwierzycka K, Swierniak A. Micronucleus assay *in vivo* provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. Int J Radiat Biol, 2001; 77: 631-6.
- [14]. Schmid W. The micronucleus test. Mutat Res, 1975; 31: 9-15.)
- [15]. Von Ledebur MM, Schmid W. The micronucleus test: Methodological aspects. Mutat Res, 1973; 19: 109-17.
- [16]. Högstedt B, Karlsson A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. Mutat Res, 1985; 156: 229-32.)
- [17]. Baytop, A., “Farmasötik Botanik”, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Dilek Matbaası Yayınları, 3158, İstanbul, 1983.
- [18]. Pamuk, A., “Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi”, Pamuk Yayıncılık ve Matbaacılık, İstanbul, 1998.)
- [19]. Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürses BŞ, Alvur M.: The comparison of mikro FADU and comet methods in DNA damage analysis. Türk Klinik Biyokimya Derg, 97-103,2004.)
- [20]. Doğan A.: Toksikoloji. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Kars, 2012.
- [21]. Klug WS, Cummings MR.: Concepts of Genetic. Genetik Kavramlar, 6 th Edition, Çeviri Editörü Prof. Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye, 2002.)
- [22]. W.N. Choy, “Genetic toxicology and cancer risk assessment”, *Marcel Dekker*, New York, 29-187, (2001),.
- [23]. N. Vural, “Toksikoloji”, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 115 129, (2005).
- [24]. E. Zeiger, “History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal”, *Environ Mol Mutagen*, 44: 363-71, (2004).

- [25]. R. Mateuca, N. Lombaert, P.V. Aka, I. Decordier, M. Kirsch-Volder, “Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring”, *Biochimie*, 88: 1515-31, (2006)
- [26]. R.J. Preston, W. Au, M.A. Bender, J.G. Brewen, A.V. Carrano, J.A. Heddle, A.F. McFee, S. Wolff, J.S. Wassom, “Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA’s Gene-Tox Program”, *Mutat Res*, 87: 143–88, (1981)
- [27]. K. Mortelmans, S.D. Rupa, “Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists”, *Adv Appl Microbiol*, 56: 379-401, (2004)
- [28]. E. Zeiger, “Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: Premises, promises, and performance”, *Regul Toxicol Pharmacol*, 28: 85-95, (1998)
- [29]. R.J. Albertini, D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hugmar, K. Hemminki, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E.G. Suhaker, R. Tice, M.D. Waters, A. Aitio, “IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans”. *Mutat Res*, 463: 11-172, (2000)
- [30]. E. Zeiger, J.K. Haseman, M.D. Shelby, B.H. Margolin, R.W. Tennant, “Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals”, *Environ Mol Mutagen*, 1: 1–14, (1990)
- [31]. A. Olaharski, R. Sotelo, G. Solorza-Luna, M.E. Gonsebatt, P. Guzman, A. Mohar, D.A. Eastmond, “Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis”, *Carcinogenesis*, 27: 3317-43, (2006).
- [32]. J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki, B.N. Ames, “Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals”, *Proc Nat Acad Sci*, 72: 5135-39, (1975)
- [33]. K. Mortelmans, E. Zeiger, “The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay”, *Mutat Res*, 455: 29-60, (2000).
- [34]. D.R. Maron, B.N. Ames, “Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test”, *Mutat Res*, 113: 173-215,(1983).

- [35]. O. Östling, K.J. Johanson, “Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochem Biophys Res Commun*, 123 (11): 291–298, (1984)
- [36]. Z.A. Şekeroğlu, V. Şekeroğlu, Z. Kolören, “The *in vitro* alkaline comet assay in genetic toxicology”, *JABS*, 5 (13): 49-54, (2011).
- [37]. V.J. McKelvey-Martin, M.H. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Meo, A. Collins, “The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review”, *Mutat Res*, 288: 47-63, (1993)
- [38]. N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, *Exp Cell Res*, 175: 184-191, (1988)
- [39]. Y. Dinçer, S. Kankaya, “DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay”, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 30 (4):1365-73, (2010)
- [40]. A. Çelik, B. Mazmanci, Y. Çamlica, Ü. Çömelekoğlu, A. Aşkın, “Evaluation of cytogenetic effects of lambda-Cyhalothrinon wistar rat bone marrow by gavage administration”, *Environ Safe*, 61: 128–133, (2005).
- [41]. D. Anderson, “Human Biomonitoring”, *Mutat Res*, 204: 353-541, (1988)---, A.V. Carrano, A.T. Natarajan, “Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques”, *Mutat Res*, 204: 379-406, (1988)
- [42]. J.R.K. Savage, “Update on target theory as applied to chromosomal aberrations”, *Env Mol Mutagen*, 22: 198-207, (1993)
- [43]. H. Norppa, S. Bonassi, I.L. Hansteen, L. Hagmar, U. Strömberg, P. Rössner, P. Boffetta, C. Lindholm, S.Gundy, J. Lazutka, A. Cebulska-Wasilewska, E. Fabianova, R.J. Sram, L.E. Kunudsen, R. Barale, A. Fucic, “Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk”, *Mutat Res*, 600 (1-2): 37-45, (2006).
- [44]. H.J. Evans, “Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests”, In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science, Amsterdam, 405–427, (1984)

- [45]. R.J. Preston, B.J. Dean, S. Galloway, H. Holden, A.F. McFee, M. Shelby, “Mammalian *in vivo* cytogenetic assays: Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells”, *Mutat Res*, 189: 157–65, (1987).
- [46]. C.E. Ford, J.L.A. Hamerton, “Colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes”, *Stain Technol*, 3: 247–51, (1956).
- [47]. (<http://antalyadogum.com/75/gebelik-ve-riskli-gebelikler/down-sendromu-ve-tarama-testleri.html>), (2015)
- [48]. (S.A. Latt, R.R. Sehrek, K.S. Loveday, C.P. Dougherty, C.F. Schuler, “Sister chromatid exchange”, *Adv Hum Genet*, 10: 267-331, (1980)
- [49]. D.M. Wilson, L.H. Thompson, “Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange”, *Mutat Res*, 616: 11–23, (2007).
- [50]. E. Sonoda, M.S. Sasaki, C. Morrison, Y. Yamaguchi-Iwai, M. Takata, S. Takeda, “Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells”, *Mol Cell Biol*, 19 (7): 5166-69, (1999)
- [51]. M. Cheng, M.K. Conner, Y. Alaria, “Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchanges in bloom’s syndrome lymphocytes”, *Cancer Res*, 71: 4508-12, (1981)).
- [52]. P.E. Perry, E.J. Thompson, “The methodology of sister chromatid exchanges”, In: Kilbey B.J., Legator M., Nichols W., Ramel C., eds. Handbook of mutagenicity test procedures, *Elsevier Science*, Amsterdam, 495–529,(1984)
- [53]. M. Topaktaş, G. Speit, “Induction of SCE and CA in human lymphocytes with prometryn”, *Tr J Biol*, 14: 69-78,(1990)---
- [54]. M. Topaktaş, E. Rencüzoğulları, “Sitogenetik”, *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, 87-91, (2010).
- [55]. Tucker JD., Eastmond DA, Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen*, 1989; 13: 34-43

- [56]. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation. *Mutat Res*, 1986; 161: 193-8
- [57]. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res*, 2000; 455: 81-95
- [58]. Aardema JM, Kirsch-Volders M. The *in vitro* micronucleus assay. In Choy WN, eds. *Genetic toxicology and cancer risk assesment*. New York. Marcel Dekker, 2001; 163-86
- [59]. Choy WN. 2001. *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. New York: Marcel Dekker, 2001: 163-86
- [60]. Heddle JA, Countryman RI. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*, 1976; 41: 321-32
- [61]. Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio AM et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res*, 1997; 388(1): 85-95
- [62]. Yırtıcı Ü. Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin MN yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007
- [63]. Al-Sabti K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenicmutagenic chemicals. *Cytobios*, 1986; 47: 147-54
- [64]. Djomo JE, Ferrier V, Bekaert C. Amphibian micronucleus test *in vivo* (Jaylet Test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2000; 65: 168-74
- [65]. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activitiy. *Mutat Res*, 1990; 244: 95-103
- [66]. Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res*, 1997; 392(1-2): 19-30

- [67]. Cheng TJ, Christiani DC, Xu X, Wain JC, Wiencke JK, Kelsey KT. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat Res*, 1996; 349: 43-50
- [68]. Duffaud F, Orsiere T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R et al. Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. *Mutagenesis*, 1997; 12: 227-31
- [69]. Rothfuss A, Schutz P, Bochum S, Volm T, Eberhardt E, Kreienberg R et al. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res*, 2000; 60: 390-4
- [70]. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardemac M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M et al. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat Res*, 2003; 540: 153-63
- [71]. Rojas E, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Montero R, Rodriguez R et al. Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drug*, 1993; 4: 637-40
- [72]. Seligmann IC, Lima PD, Cardoso PC, Khayat AS, Bahia MO, Buchi DF et al. The anticancer homeopathic composite “Canova Method” is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. *Genet Mol Res*, 2003; 2(2): 223-8
- [73]. Eastmond DA, Tucker JD. Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen*, 1989; 13: 34-43
- [74]. Fenech M. The Advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res*, 1997; 392: 11-18
- [75]. Yavuz Kocaman A, Topaktaş M. In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamidrid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 2007; 48: 483-90
- [76]. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*, 2000; 455: 155-66

- [77]. Heddle J. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutat Res*, 1973; 18: 187-90
- [78]. Üstün F. Albendazol'un olası genotoksisitesi üzerine askorbik asitin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007
- [79]. Lambert IB, Singer TM, Boucher SE, Douglas GR. Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat Res*, 2005; 590: 1-280
- [80]. MacGregor TJ, Heddle AJ, Hite M, Margolin HB, Ramel C, Salamone MF et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res*, 1987; 189: 103-12
- [81]. Yener Y, Dikmenli M. Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment. *Food Chem Toxicol*, 2009; 47 (8): 2120-3
- [82]. Aksu P.: Akrilamidin *in vivo* ve *in vitro* Genotoksisitesi Üzerine Fenolik Bileşiklerden Pelargonidin ve Gallik Asidin Etkileri. Kafkas Üniv, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Kars, 2012.
- [83]. Tanker, M., Tanker, N., "Farmakognozi", Cilt II, Reman Matbaası, İstanbul, 1976].
- [84]. Ceylan, A., 1987. "Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler)", Ege Üniversitesi Yay., Sayı: 481, 188].
- [85]. Kutlular, Ö., " Bazı Adaçayı ve Kekik Türlerinin Uçucu Yağlarının Süper Isıtılmış Su ile Ekstraksiyonları ve GC-MS ile Karakterizasyonları", Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007].
- [86]. Akgül, A., 1993. "Baharat Bilimi ve Teknolojisi" Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Sayı:15, 101-104].
- [87]. Hill, A.F., "Economic Botany: A Textbook of Useful Plants Products", 2nd Ed., Mc Graw Hill Book Company, New York, 1952].
- [88]. K.H.C. Başer vd, 2012, "Türkiye'de yetiştirilen bazı okaliptüs (eucalyptus) türlerinin uçucu yağ verim ve bileşimlerinin ve üretim teknolojilerinin belirlenmesi"

Orman Bakanlığı Yayın No:084, Bülten No: 7, Orman Bakanlığı Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü, 16.

[89]. Rasooli, I., and Mirmostafa, S.A., “Bacterial Susceptibility to and Chemical Composition of Essential Oils from *Tymus kotschyianus* and *Tymus persicus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry”, s51, s2200-s2205, (2003).

[90]. Altundağ, Ş., Aslım, B., 2005, “Kekiğin Bazı Bitki Patojeni Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi”, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050702.pdf, Cilt:03 Sayı:07, 11.

[91]. Rodrigues Alves A. Et al “Genotoxic Assessment OF *Rubus Imperialis* (Rosaceae) Extract In-Vivo And Its Potential Chemoprevention Against Cyclophosphamide-Induced DNA Damage” Journal Of Ethnopharmacology, 153, s694-s700, (2014).

[92]. Vinod V. et al “Evaluation Of Mutagenic And Antimutagenic Activities Of Neem (*Azadirachta Indica*) Seed Oil In-Vivo Mouse Bone Marrow Mikronükleus Test”, Journal Of Ethnopharmacology, 134, s 931-s 937, (2011).

[93]. Grover P. Et Al “In-Vivo Assessment Of Genotoxic Effects Of *Annona Aquamosa* Seed Extract In Rats”, Food And Chemical Toxicology, 47, s1964-s1971, (2009)

[94]. Tolentino F. Et Al “ (Rosaceae) Extract And Initial Screening Of Its Potential In-Vivo Evaluation Of The Genetic Toxicity Of *Rubus Niveus* Thunb Chemoprevention Against Doxorubicin-Induced DNA Damage”, Journal Of Ethnopharmacology 164, s89-s95, (2015)

[95]. Hwang E. Et Al “Safety Evaluation Of *Zanthoxylum Piperitum*-Derived Essential Oil By Assessing Micronucleus Abnormalities, Mutagenicity And Chromosomal Aberration” Food Research International, 42, s267-s271, (2012)

[96]. Oliveira Meneguetti D. Et al “Acute Genotoxicity Analysis In-Vivo Of The Aqueous Extract Of *Maytenus Guyanensis* Is Amazoni An Chichua”, Revista Brasileira De Farmacognosia, 25, s164-s169, (2015)

[97]. Şekeroğlu Z. et al “Effects Of *Viscum Album L.* Extract And Quercetin On Methotrexate-Induced Cyto-Genotoxicity In Mouse Bone-Marrow Cells”, Mutation Research, 746 s56-s59, (2012).

- [98]. Souza Marques E. et al “Genotoxicity Assessment Of Garcinia Achachairu Rusby (Clusiaceae) Extract İn Mammalian Cells İn-Vivo”, Journal Of Ethnopharmacology, 142, s362-s366, (2012)
- [99]. Mengs U. Et Al “No Clastogenic Activity Of A Senna Extract İn The Mouse Micronucleus Assay”, Mutation Research 444, s421, (1999)
- [100]. Li N. Et Al “Evaluation Of The İn-Vitro And İn-Vivo Genotoxicity Of Magnolia Bark Extract”, Pharmacology 49, s154, (2007)
- [101]. Irmak D., “Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş Kekiği (*Thymbra spicata*) Bitki Uçucu Yağlarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Mikronükleus Üzerine Etkilerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014.
- [102]. S.Gül vd. ‘ Chemical composition, and in-vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L.’, J.B. Environ. Contam. Tox., s88(5), 666-671, (2012).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emin Serhat ÇAKMAKÇI

Doğum Yeri : KARS

Doğum Tarihi : 24.01.1991

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kağızman Lisesi-2007

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

Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji AD.(Moleküler Biyoloji)-2016