

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

**KİMYON (*Cuminum cyminum*) VE KARABAŞ KEKİĞİ (*Thymbra spicata*)
BİTKİ UÇUCU YAĞLARININ İNSAN LENFOSİT HÜCRELERİNDE
MİKRONÜKLEUS ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Dilek IRMAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süleyman GÜL**

**HAZİRAN-2014
KARS**

**Bu tez çalışması 2013-FEF-90 numaralı proje ile KAÜ Bilimsel Araştırmalar
Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.**

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

**KİMYON (*Cuminum cyminum*) VE KARABAŞ KEKİĞİ (*Thymbra spicata*)
BİTKİ UÇUCU YAĞLARININ İNSAN LENFOSİT HÜCRELERİNDE
MİKRONÜKLEUS ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Dilek IRMAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süleyman GÜL**

**HAZİRAN-2014
KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Dilek IRMAK'ın Doç. Dr. Süleyman GÜL'ün danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "**Kimyon (*Cuminum Cyminum*) ve Karabaş Kekliği (*Thymbra Spicata*) Bitki Uçucu Yağlarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ..birliği.... ile kabul edilmiştir.

10 /06 /2014

Adı ve Soyadı

Başkan : Doç. Dr. Süleyman GÜL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Yüksel KIVRAK

İmza

.....
.....
.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/..../2014 gün ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

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

Tez konusunun seçiminde yardımcı olan, çalışmanın hazırlanmasında daima yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum Kafkas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi saygı değer hocam Doç. Dr. Süleyman GÜL'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışması boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Kafkas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU 'ya bitki uçucu yağlarının çıkarılmasında laboratuvar olanaklarını sağlayan KAÜ Veteriner Fak. Gıda Hijyeni Kürsüsü'ne teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca her konuda destek olan arkadaşlarım Yağmur YILDIZ, Hanife YILDIRIM ve Ebru ÇETİN'e teşekkür ederim.

Kars-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER ve TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kimyon Hakkında Genel Bilgi.....	3
2.2.Karabaş Kekiği (<i>Thymbra spicata</i>) Hakkında Genel Bilgi	4
2.3. Mikronükleus Hakkında Genel Bilgi	4
2.3.1. Mikronükleus Tekniğinin Gelişimi.....	6
2.3.2. Mikronükleus Tekniğinin Kullanım Alanları	10
2.3.2.1. İnsan Lenfositlerindeki Standart Sitokinez-Blok Mikronükleus Analizi	11
2.3.2.2. İnsan Lenfositleri İçin Kan Kültürü	11
2.3.2.3. Sitokinez-bloklu ve Sitokinez-bloksuz Hücrelerdeki Mikronükleus	
Analizi	12
2.4. Mikronükleus ve Non-disjunction'daki Kromozom Kaybını Ölçmek İçin	
Geliştirilen Moleküler Teknikler	13
2.5. Bitki Ekstratlarını Eldesi	14
2.6. Ekstraksiyon Yöntemleri.....	14
2.6.1. Çözücü Ekstraksiyonu (Solvent Extraction).....	14
2.6.2. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction-Sfe)	15
2.6.3. Mikrodalgayla Ekstraksiyonu (Microwave-Assisted Extraction).....	16
2.6.4. Sıkıştırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (pressurised solvent- extraction)	16
2.6.5. Katı-faz Mikroekstraksiyon (solid phase microextraction-spme)	17
2.7. Bitkilerde Uçucu Yağ Eldesi	17
2.8. Apoptoz	18
2.9. Nekroz	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. <i>Cuminum cyminum</i> (Kimyon).....	22

3.1.2. <i>Thymbra spicata</i> (Karabaş Kekiği).....	23
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	23
3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.2.1.1. Aseton	23
3.2.1.2. Kromozom Medyumu	24
3.2.1.3. Cytochalasin-B	24
3.2.1.4. Mitomisin C (MMC) eriyiğinin hazırlanması	25
3.2.1.5. Hipotonik Eriyik	26
3.2.1.6. Fiksatif	26
3.2.1.7. Sorenson fosfat tampon çözeltisi	26
3.2.1.8. Giemsa	27
3.2.1.9. Entellan	27
3.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	27
3.2.3 Deney Ekipmanları	28
3.2.4 Kullanılan Cihazlar	28
3.3. Ekstraksiyon	29
3.4. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların	31
3.4.1. Çalışma grubu	31
3.4.2. Kan örneklerinin alınması.....	31
3.4.3. Kültür tekniği.....	31
3.4.4. Çıkarım işlemleri	33
3.4.5. Preparat Hazırlama	34
3.4.6. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....	34
3.4.7. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması.....	34
3.5. Sitokinezi Bloke Edilmiş Binükleer Hücreleri Tanımlama Kriterleri.....	35
3.5.1. Mikronükleus Sayımı.....	36
3.5.2. Hücre Sayısı ve İstatistiksel Değerlendirme.....	37
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
6. KAYNAKLAR	54
7. ÖZGEÇMİŞ.....	66

ÖZET

Bu çalışmanın amacı *Thymbra spicata* ve *Cuminum Cyminum* uçucu yağlarının genotoksik ve sitotoksik etkilerinin insan periferik lenfosit kültüründe in-vitro olarak araştırılmasıdır. İnsan kan lenfosit hücreleri, *T.spicata* ve *C. cyminum* uçucu yağlarının 0.05µl/ml, 0.10µl/ml, 0.15µl/ml, 0.20µl/ml 'lik dozları ile 24 saat etkileşime bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin C(MMC 0,3 µg/ml) ve negatif kontrolle karşılaştırıldığında *T.spicata* ve *C. cyminum* uçucu yağlarının dozlarının mikronükleus sıklığını artırdığı gözlenmiştir. Mikronükleus frekansındaki bu artış doza bağımlı idi. *T.spicata* ve *C. cyminum* uçucu yağlarının çekirdek bölünme indeksini (NDI) ve çekirdek bölünme sitotoksosite indeksini (NDCI) önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Mikronükleus sıklığındaki artış doza bağlıdır. Sonuçlar, *T.spicata* ve *C. cyminum* uçucu yağlarının dozları ile MN sıklığı, apoptotik hücre ve nekrotik hücre sayısı arasında önemli bir bağlantının olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Thymbra spicata* ve *Cuminum Cyminum*, Mitomisin C(MMC), Lenfosit kültürü, sitokinezi engellenmiş hücrede mikronükleus testi, nekrotik hücre, apoptotik hücre, sitotoksosite.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the genotoxic and cytotoxic effects to human peripheral blood lymphocytes of essential oils of *Thymbra spicata* and *Cuminum Cyminum*. Human peripheral blood lymphocyte cells were treated with 0.05µl/ml, 0.10µl/ml, 0.15µl/ml, 0.20µl/ml concentrations of essential oils of *T.spicata* and *C. cyminum* for 24 h. A significant increase was observed for induction of micronucleus frequency in treatment of essential oils of *T.spicata* and *C. cyminum* concentrations comparing with the negative control and mitomycin C (MMC, 0.3 µg/ml) which was used as positive control. This increase in the frequency of micronuclei has been dose dependent manner. We demonstrated that the nuclear division index (NDI) and nuclear division cytotoxicity index (NDCI) were significantly influenced essential oils of *T.spicata* and *C. cyminum*. The increase in the frequency of micronuclei has been dose dependent manner. The results showed that there were significant correlation between essential oils of *T.spicata* and *C. cyminum* concentration and micronuclei frequency necrotic cells and apoptotic cells.

Key words: *Thymbra spicata* and *Cuminum Cyminum*, Mitomycin C (MMC), Lymphocyte cultures, cytokinesis-block micronucleus assay, necrotic cell, apoptotic cell, cytotoxicity.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar

μ l: Mikrolitre

ml: Mililitre

g: Gram

$^{\circ}$: Derece

< : Küçük

> : Büyük

% : Yüzde

FISH: Floresan İn Situ Hibridizasyon

ISH: İn Situ Hibridizasyon

SFE: Süperkritik sıvı ekstraksiyonu

DMSO: Dimetil sülfoksit

KCl: Potasyum Klorür

NaCl: Sodyum klorür

rpm: Devir Sayısı

Cyt-B: sitokalsin-B

CBMN: Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikronükleus

MMC: Mitomycin C

BN: Binükleer hücre

MN: Mikronükleus

Nec: Nekrotik hücre

M1: Bir nükleuslu hücre

M2: İki nükleuslu hücre

M3: Üç nükleuslu hücre

M4: Dört nükleuslu hücre

NPB: nükleoplazmik köprü

N: Toplam yaşayan hücre

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

NDI: Nuclear Division Index (Nükleer Bölünme Frekansı)

NDCI: Nuclear Division Cytotoxicity Index (Nükleer Bölünme Sitotoksite Frekansı)

WHO: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2. 1. CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) Dağılımı.....	7
Şekil 2. 2. Mikronükleus oluşumu.....	9
Şekil 2. 3. Sitotoksik ya da genotoksik ajanlara maruz kalan bir hücrenin geçirebileceği değişimler.....	20
Şekil 2. 4. Apoptozis ile Nekrozis arasındaki farklar.....	21
Şekil 4. 1. Karabaş kekiğinin değişik dozları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürlerinde MN oranları.....	44
Şekil 4. 2. Kimyonun değişik dozları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürlerinde MN oranları.....	45

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 2. 1.	Non Asbestos marka Clevenger cihazı.....	18
Resim 4. 1.	Apoptoza gitmekte olan hücre.....	38
Resim 4. 2.	B: Apoptoza uğramış bir hücre	39
Resim 4. 3.	Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücreler....	39
Resim 4. 4.	Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücreler....	40
Resim 4. 5.	Tek nükleuslu hücre (a), normal sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu hücre (b).....	40
Resim 4. 6.	Dört nükleuslu bir hücre.....	41
Resim 4. 7.	Üç nükleuslu bir hücre.....	41
Resim 4. 8.	Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve bir MN içeren hücre.....	42
Resim 4. 9.	Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve bir MN içeren hücre.....	42

ÇİZELGELER ve TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4. 1.	Kullanılan Kimyon Uçucu Yağ Dozları ile MN Oranı Arasındaki Regresyon Çizelgesi.....	46
Çizelge 4. 2.	Kullanılan Karabaş kekiği Uçucu Yağ Dozları ile MN Oranı Arasındaki Regresyon Çizelgesi.....	47
Tablo 4. 1.	Karabaş Kekiği ve Kimyonun İnsan Lenfositlerinde Mikronükleus Sıklığı, Nükleer Bölünme İndeksi, nükleer Sitotoksik Bölünme İndeksine Etkileri (Dunnett's <i>t</i> -test).....	43

1.GİRİŞ

Ülkemiz zengin florasıyla (Belirli bir bölge veya ülkede yetişen bitki çeşidi) önemli sayıda tıbbi ve aromatik bitkiyi barındırmaktadır. Bitkiler, insan yaşamının sürdürebilmesi için gerekli olan oksijen ile besinleri sağlarken sağlığı korurlar. İnsanlık tarihiyle birlikte bitkilerin tedavide kullanımları başlamıştır. Binlerce yıl önce insan, bitkilerin tedavi edici gücünü tanımış ve onlardan yararlanmıştır.

Anadolu'da halk ilaçları Halk hekimliği uygulamalarına yaygın olarak rastlanan, uzun tecrübeler sonunda günümüze kadar gelmiş uygulamalardır. Modern tıpta çoğu ilaç da bitkilerden elde edilmektedir. Ülkemizin üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği alanda yer alması, Güney Avrupa ile Güneybatı Asya florası arasında köprü olması, pek çok cins ve seksiyonun orijin ve farklılaşım merkezi olması bitkisel zenginliğinin nedenidir. Buna rağmen bu bitki zenginliğinden yeterince faydalanılamamaktadır. Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de doğal florada bulunan bitkilerin halk arasında tedavi amaçlı, gıda, çay, baharat, boya, insektisit, hayvan hastalıklarının tedavisi, reçine, zambak, uçucu sabit yağlarından faydalanma, meşrubat ve kozmetik sanayinde kullanımı uzun yıllardan beri süregelen geleneksel kültürel zenginliğimizin bir parçası olmuştur. Ancak bu olgu şehirleşmeyle paralel olarak kaybolmaya yüz tutmuştur. Bu çalışmada, geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımını ve ekonomik önemini belirlemek amaçlanmıştır[1].

Doğaya dönüşümün bir slogan haline geldiği günümüz dünyasında tıbbi ve aromatik bitkiler Türkiye'de de önemli bir yere gelmiştir. Türkiye pek çok bitkinin gen merkezi olmasının yanında, bazı endemik türlerin de bulunduğu coğrafik bölgeleri içermektedir[2].

MN, asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından ve bir ya da birkaç kromozom ya da kromatidin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan esas nükleusun dışında rastlanan küçük nükleuslardır[3].

Ayrıca multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna sebep olmaktadır[4]. MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ iplikçiklerinde ve sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır[5].

Yapılan literatür taramaları sonucu karabaş kekiği (*T. spicata*) ve kimyon (*C. cuminum*) bitkilerinin mikronükleuslar üzerine etkilerinin çalışılmadığı görülmüştür. Bu çalışma ile halk arasında yaygın olarak kullanılan karabaş kekiği ve kimyon bitkilerinin uçucu yağlarının in-vitro insan periferik lenfositlerinde mikronükleuslar üzerine etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kimyon Hakkında Genel Bilgi

Anavatanı Doğu Akdeniz ve Orta Doğu olan kimyon maydanozgiller (*Apiaceae*) familyasından, 40-60 cm boyunda, Mayıs- Haziran ayları arasında beyaz ve pembemsi renkte çiçek açan bir yıllık otsu bir bitki türüdür.

Gövdeleri dik, dallanma üst kısımlarda görülür. Yaprakları parçalı ve tüysüz iplik şeklindedir. Çiçekler beyaz veya pembe renkli şemsiye durumunda, meyvesi köşeli, oval şekilli, 4-5 mm boyundadır. Kimyon baharatı, kimyon bitkisinin olgunlaştıktan sonra toplanıp kurutulmuş tohumlarından veya bu tohumların öğütülmesiyle elde edilir. Biraz sert, keskin bir tadı vardır. Kimyon meyveleri , % 15- 25 protein, % 2. 5- 6 uçucu yağ, % 10- 23 sabit yağ, tanen, flavonoit, reçine ve zambak içerirler[6].

Kimyon, çok yaygın bulunan bir bitki türüdür. Çoğunlukla Kuzey ve Orta Avrupa'da aynı zamanda Asya ve Afrika'da da bulunmaktadır. Yabani olarak ise deniz seviyesinden yükseklerle kadar her yerde görülmektedir. Kimyon özellikle Hollanda, Almanya, İsveç ve Norveç'te yetiştirilmekte, Macaristan, Romanya, Çekoslovakya, İtalya, Avusturya, İspanya, Rusya ve küçük Asya'da da tarımı yapılmaktadır. Almanya kimyon üretimi bakımından önemli bir ülkedir. Genellikle kurak bölgeler için küçük meyveli, yağışlı bölgeler için ise büyük meyveli tipler daha uygundur[7].

Kimyon, halk arasında gaz söktürücü, süt artırıcı, periyodik kanamayı geciktirici, ishal kesici, kas ağrısını giderici (analjezik ve myorelaksan etki), romatizma tedavisi (antienflamatuvar etki), diş ağrısı (analjezik ve antienflamatuvar etki), farenjit (antienflamatuvar etki), karın ağrısı (antispazmodik etki), diüretik ve idrar yollarının tıkanıklıklarını açma (antienflamatuvar etki) gibi rahatsızlıkları tedavi edici amaçlarla kullanıldığı bildirilmektedir[8,9].

2.2.Karabaş Kekikği (*Thymbra spicata*) Hakkında Genel Bilgi

Kekik, baharat ve ilaç olarak antik çağlardan beri kullanılmakta olup yaygın olarak bilinen bir bitkidir. Thymol ve carvacrol gibi karakteristik koku veren uçucu yağ bileşenlerine sahiptir. *Origanum*, *Thymus*, *Satureja* ve *Thymbra* cinslerine ait çeşitli türler de kekik olarak kullanılmaktadır[10].

Thymbra spicata L.'nin iki varyetesi *T. spicata* var. *spicata* L. ve *T. spicata* var. *intricata* Türkiye' de doğal olarak yetişmektedir. Bunlardan *Thymbra spicata* var. *spicata*, ülkemizde, Trakya, Ege, Akdeniz sahilleri ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yaygın olarak yetişmektedir[11,12] .

Thymbra spicata var. *spicata*, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde “Zahter”, “Sater” veya “Karabaş kekik” olarak bilinmektedir. Genç sürgünleri salata, yaprak ve çiçek durumları ise baharat ve çay olarak tüketilmektedir. Karabaş kekiğinden halk arasında ağrı kesici olarak, soğuk algınlıkları, öksürük, parazit, ekzema gibi cilt hastalıklarının tedavisinde de yararlanılmaktadır. Uçucu yağının içerdiği fenoller nedeniyle bakteri ve mantarlara karşı güçlü bir antibiyotik özelliği göstermektedir bunun yanı sıra başta et ürünleri olmak üzere gıda ürünlerinde aromatan olarak, parfüm, sabun, şampuan, içki ve diş macunları, konserve, salça sosları ve sucukların yapımında da yaygın olarak kullanılmaktadır[13-16].

2.3. Mikronükleus Hakkında Genel Bilgi

MN (Mikronükleus) oluşumu ilk olarak Howell ve arkadaşları tarafından eritrositlerde gözlemlenmiştir. Jolly tarafından adlandırılmıştır ve bu nedenle Howell-Jolly cisimciği de denilmektedir. Mikronükleus, hücre bölünmesi sırasında kromozom fragmentinin ya da kromozomların serbest kalmasıyla ortamda varlığını sürdürmesidir. Sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında yer alan nükleoplazma ile sarılı nükleer materyaldir[17].

Mikronükleus oluşum nedeni esas olarak DNA hasarıdır. Organizmanın çeşitli klastojenik, mutajenik ve karsinojenik ajanlara etkisi altında kalması sonucunda DNA'da hasar

meydana gelmektedir. MN testi Toksikolojide, genetik hasar ölçümünde, diyetle, ilaç sanayide, kanser riski oluşumu şüphesinde, radyoterapide oldukça önemlidir[18].

DNA hasar oranının in vivo ve in vitro olarak belirlenmesinde, pratik ve en ekonomik tekniklerden biri haline gelmiştir[17-21].

MN tekniği, kemik iliğinde, yanak mukoza hücresinde ve insan periferik kan lenfositlerinde, kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Tekniğin basit ve kısa zamanda sonuç vermesi, DNA harabiyeti konusunda güvenilir olması tekniğe önem kazandırmıştır[19-21].

Kromozom kırılmaları, DNA'daki çift iplik yapının tekrar tamir edilememesi sonucu oluşabilir[18-22]. Kromozomların hatalı ayrılışı (non-disjunction) ve kromozom kaybı, kanserde ve yaşlanmada çok önemlidir ve metafaz safhasından önce iğ ipliklerinde, sentromerde ya da kromozom yapısında oluşan bozukluklarla ortaya çıkabilir[20-24].

Klasik olarak yapılan sitogenetik tekniklerde, metafaz evresindeki kromozomlara bakılarak ve anormallikler sayılarak kromozomlara bakılmaktadır[21-25]. Bu detaylı bir analiz yapılmasını sağlar ancak metafazdaki daha kompleks anormalliklerin birer birer sayılmasının yetersizlikleri vardır. Kromozom anomalilerinin tespit edilmesinde daha basit yeni yöntemler geliştirilmiştir. Schmid [22-26] ve Heddle [23-27] birbirinden bağımsız in-vivo kromozom anomalilerini tespit etmek için alternatif ve daha basit bir yöntem ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemle, kemik iliği gibi bölünen hücrelerde, hematologlar tarafından Howell-Jolly cisimleri olarak bilinen, mikronükleusların (MNi) ölçümü denir. Periferik kan ve kemik iliğinde bulunan eritrositlerde ve Mikronükleus (MN) testi, in-vivo sitogenetik analizidir ve Genetik Toksikoloji de kullanılır.

Bugün, pek çok kanserin spesifik kromozom düzensizlikleriyle bağlantısı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kanserli olgularda mikronükleus testi yapılmaktadır[28-30]. Elde edilen sonuçlara göre MN testi, kanser tedavisinde kullanılabilen bir test haline gelmiştir.

MN testinin geniş bir araştırma ortamı bulunduğu diğer bir alanda yaşlanmadır. Yaş artışıyla anöploid sıklığı arasında yakın bir ilişki vardır. Yaşam içerisinde bireyin maruz kaldığı çevresel ajanların etkisiyle kromozomların normal bölünmediği belirlenmiştir. Her

hücrede mitoz bölünmede iğ iplikçiklerinde katalizör görevi yapan enzimlerde dejenerasyon oluşmakta ve mitotik aktivite yaş ilerledikçe yavaşlamaktadır[31-35].

Cyt-B'nin (Cytochalasin-B) hücre bölünmesini sitokinez evresinde durdurması özelliği temel alınarak CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) analizleri, tanımlanmıştır[18-20]. Cyt-B ekstratı, Helmin dematiodeumdan elde edilmiştir. Cyt-B hücre bölünmesini aktin filamentlerin ucuna bağlanarak, aktinin polimerize olmasını önler sitokinez evresinde aktin filamentlerini etkileyerek durdurur[33-37] .

Maluf ve arkadaşları, CBMN yöntemini kullanarak, Fanconi anemili ve Down sendromlu hastalarda MN frekanslarının yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Maling hastalıklar için yüksek riske sahip Down sendromlu bireyler hücrelerin çeşitli mutajen, radyasyon, virüs ve kimyasallara karşı fazlaca hassas olduğu için periferik kanlarında MN frekansının yükseldiğini saptamışlardır[38].

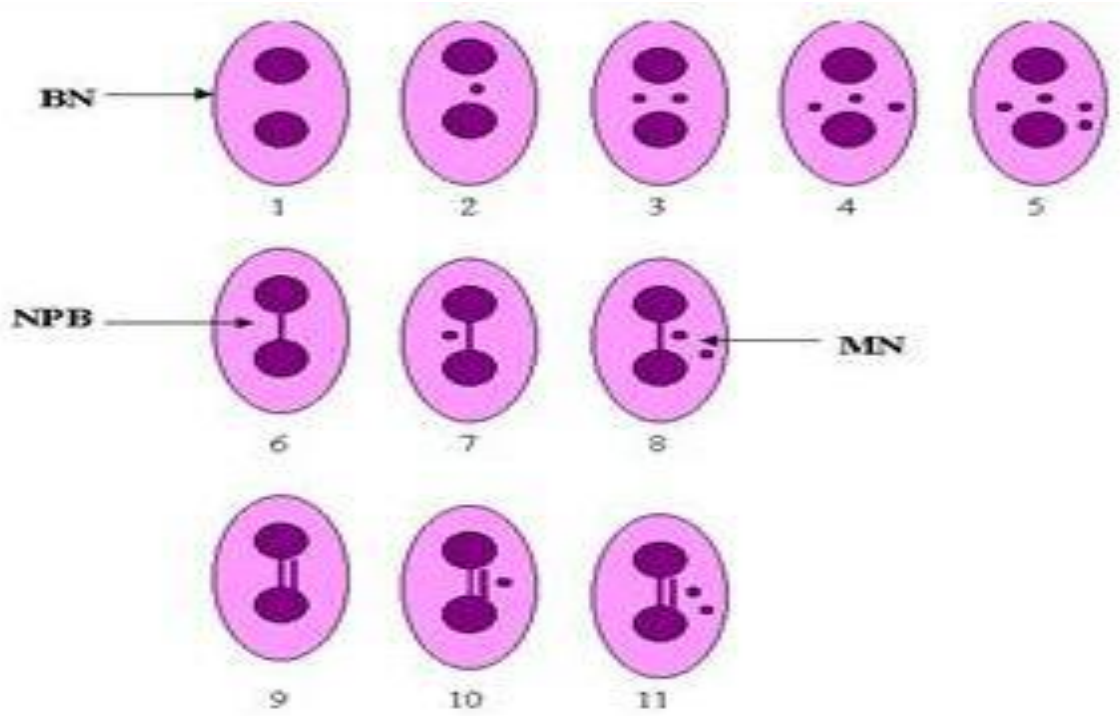
2.3.1. Mikronükleus Tekniğinin Gelişimi

İnsan lenfositlerinin sitokinezinde görülen mikronükleus için detaylı hesaplama yöntemleri Washington'da Genotoxicity International Work Shop'la tüm dünyaya bildirilmiştir. Buna göre, CBMN analizlerinde önce hücre tipleri belirlenmeli, bu hücreler, mononükleus, binükleus, multinükleus, hücre tipinde ya da apoptotik veya nekrotik hücre tipinde olabilirler. Mononükleuslu hücrelerin sitoplazmaları küçük, nükleusları büyüktür. Binükleuslu hücreler eş büyüklükteki iki hücre tipindedir ve nükleoplazmik köprüyle (NPB) birlikte olabilir. Nükleuslar temas halinde veya üst üste olabilir. Multinükleuslu hücreler farklı büyüklükteki üçlü veya dörtlü hücre formundadır ve birden fazla MN içerebilir[21].

Sitokinezde bloke edilmiş hücreler CBMN frekansı için hesaplanırken aşağıdaki özellikleriyle karakterizedir:

- MN sayımları BN'(BiNükleus) da yapılmalıdır.

- MN'ların çapı ana nükleus yarıçapının 1/16 ile 1/3 arasındaki değerlerde olmalıdır.
- MN'ın alanı ana nükleusun alanının 1/256 ile 1/9'u arasında olmalıdır.
- MN'lar ana nükleusa bağlı olmamalıdır.
- MN'ların çoğu nükleusların arasındadır ama aynı zamanda hücrelerin kutuplarında da olabilir.
- MN'ların yapıları küçük nükleuslara benzer. Fakat kabarcıklar, noktalar MN olarak kabul edilmemektedir[21].



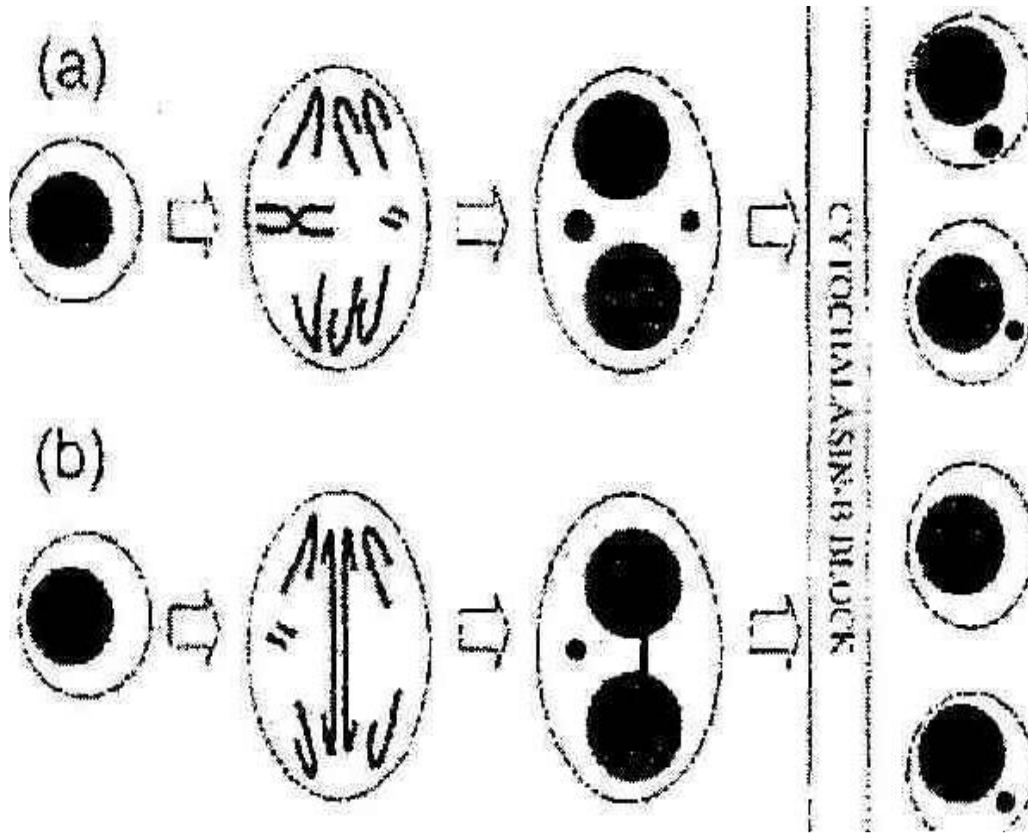
Şekil 2. 1: CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) Dağılımı;

1. Binukleuslu hücre,
2. Bir MN 'lu BN hücre,
3. İki MN 'lu BN hücre,
4. Üç MN 'lu BN hücre,
5. Dört MN 'lu BN hücre,

6. NPB'li BN hücre,
7. Bir nükleoplazmik köprü ve bir MN 'lu BN hücre,
8. Bir nükleoplazmik köprü ve iki MN 'lu BN hücre,
9. İki nükleoplazmik köprü,
10. İki nükleoplazmik köprü ve bir MN 'lu BN hücre,
11. İki nükleoplazmik köprü ve iki MN'lu BN hücre

Not: Fenech M. : The in Micronucleus Technique'den modifiye edilerek alınmıştır[21].

MN'lar, sentromeri olmayan kromozom kırıklarını içeren bölünen hücrelerde ve mitoz sırasında kutuplara gidemeyen tüm kromozomlarda görülmektedir. Telofazda, geri kalan kromozomlar ve kromozom parçalarının etrafında nükleer bir zar oluşur ve oluşan bu yapı hücrenin ana çekirdeğinden daha küçük olduğundan "mikronükleus (MN)" olarak tanımlanır. Bundan dolayı, MN'lar hem kromozom kaybının hem de kromozom kırılmasının uygun ve güvenilir şekilde ölçümünü sağlar. MN'lar çekirdek bölünmesi bittikten sonra meydana geldiğinden, MN'lar hücre döngüsünün binükleer (iki çekirdekli, BN) safhasında ölçülmektedir. Bazen binükleer hücreler ile nükleuslar arasında nükleoplazmik köprülere rastlanır. Bunlar disentrik kromozomlar olabilmektedir. DNA oluşan köprü sonucunda İki sentromer hücrenin karşı kutbuna çekilmekte ve etrafı nükleer zarla çevrelenmektedir (Sekil 2). Sonuç olarak bir hücre popülasyonunda mitoz geçiren hücreleri ve bölünmeyen hücreleri ayırt etmek için bir yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir[39-40].



Şekil 2. 2: Mikronükleus oluşumu. (a) Mikronükleuslar, anafazda geri kalan kromozomlar ve asentrik kromozom parçalarından orjin alır. (b) Sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu ve asentrik kromozom parçasından eş zamanlı olarak mikronükleusun oluşumu. Sitokalazin-B (Cyt-B), binükleer evrede hücre bölünmesini bloke eder[24, 25].

MN tekniği, ekfoliyatif hücrelerde 1982 yılında ilk defa Stich ve arkadaşları [41] tarafından yapılmıştır. Bu teknik ağız, burun, bronş ve ürotelyal ekfoliyatif hücrelerde kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerlendirmekte kullanılmıştır[42,43]. Hızla çoğalabilen bu epitelyal dokular çevreleriyle sürekli temas halindedir. Epitelin yüzeysel tabakasını oluşturan ekfoliyatif hücreler kolaylıkla elde edilebilmekte, genotoksik hasarıda kolaylıkla görülebilmektedir. Böylece bu hücreler ait oldukları dokularda meydana gelen morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve kanseri gösterebildiklerinden bir biyomarker olarak değerlendirilebilmekte ve karsinogenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir[43-45]. Ekfoliyatif hücrelerde uygulanan MN tekniğinde Faelgen-

Fast Green boyama yöntemi kullanılmaktadır. Hücrenin çekirdeği parlak pembe, sitoplazması ise açık yeşil boyanmaktadır. MN araştırmalarında in situ hibridizasyon (ISH) tekniği, ilk kez kromozomların sentromerini tanımlamak için Norppa ve arkadaşları [46] tarafından yapılmıştır; bu çalışmada kullanılan proplar, 1989 yılında Meyne ve arkadaşları [47] tarafından hazırlanmış insan kromozomlarının her biriyle hibridize olabilen sentromere spesifik oligonükleotidlerdir. Daha sonra, floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile MN oluşturan kromozomların her birinin kimliğini belirleyebilecek teknolojik gelişmeler sağlanmıştır[48].

2.3.2. Mikronükleus Tekniğinin Kullanım Alanları

Mavournin ve arkadaşları [49] ABD evre Koruma Grubunun Gen-toks Programı dâhilinde 1990 yılına kadar kimyasalların canlılar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için yapılan tüm MN test sonuçlarını toplayarak, değerlendirmeye aldılar. Memelilerin kan ve kemik iliğinde in vivo çalışılmış olan 414 bileşiğin sadece 220'sinin kriterlere uygun test edilebildiğini tespit ettiler. Uygun test edilen kimyasallar arasında karsinojenlerin oranı % 91 olarak saptandı; fakat negatif testlerin azlığı ciddi bir eksiklik olarak bildirildi. Ayrıca bu çalışmalarda esas alınan ve yıllar önce Schmid [50] tarafından tanımlanan MN test protokolünün modifikasyonuna ihtiyaç duyulduğu ve daha fazla çalışmanın gerekli olduğuna dikkat çekildi. Fiziksel ajanların etkileri deneysel MN alışmaları yanında, 13 Eylül 1987' de Goiânia'da (Brezilya) meydana gelen radyolojik kaza sonucu genetik materyalde oluşturduğu hasarı belirlemek içinde kullanıldı. MN sıklığında iyonizan radyasyonun dozuna bağlı çok anlamlı bir artış saptandı ve MN testinin biyolojik dozimetre olarak kullanılması önerildi. Ayrıca Goiânia kazasına maruz kalan insanlardaki sitogenetik değişiklikler iyonizan radyasyon ile yaş ve hayat tarzı (alkol tüketimi, sigara kullanımı) gibi faktörlerin etkisi birlikte değerlendirildi[51]. Daha sonra bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar iyonizan radyasyonun ve mikro dalga ışınların klastojenik etkisini açığa çıkardı ve mikro dalga ışınların, anöploid uyarıcı bazı kimyasalların, karakteristik mutajen özelliklerine de sahip olduğu bulundu[34, 52-55]. Yeni doğan bebeklerde ve 18-25 yaş grubu bireylerde yapılan iki ayrı çalışmada [56,57] MN

frekansının erkek ve dişi cinsiyete bağılı olmadan farklılık göstermediği saptanmıştır. Ancak yaşlılarda yapılan bir diğer çalışmada [48] kadınlarda MN sıklığının yaşlanma ile artış gösterdiği anlaşıldı; ayrıca FISH tekniği ile MN oluşturan kromozomların kimliği belirlenerek; yaşlı kadınlarda X kromozomlarının otozomal kromozomlardan daha sık olarak MN oluşumuna katıldığı gösterildi. X kromozom kaybı, aynı zamanda monozomik hücrelerde karyotip analizleriyle de doğrulanmıştır. Sonuç olarak; sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen MN testi, organizmayı etkileyen çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir.

2.3.2.1. İnsan Lenfositlerindeki Standart Sitokinez-Blok Mikronükleus Analizi

Bu yöntem, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan CytochalasinB (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, ilk nükleus bölünmesini tamamlamış, ancak sitokinezi gerçekleştirememiş binükleuslu (BN) hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir[28]. İnsan hücrelerinde 'mikronükleus indeksi genetik toksikoloji araştırılmasında kullanılan standart sitogenetik testlerden biri haline gelmiştir[58]. Cyt-B, ilk mitotik bölünmeden önce eklenmelidir ve Cyt-B ile sitokinez gerçekleşmeden BN hücreler oluşmaktadır[59].

2.3.2.2. İnsan Lenfositleri İçin Kan Kültürü

İnsan lenfositlerinde, CBMN analizi tam kan kültürü kullanarak da yapılabilir. 0.4-0,5 ml tam kan, L glutamin, fetal kalf serum, antibiyotik ve PHA ile desteklenmiş 4,5 ml kültür ortamına eklenir. Cyt-B, PHA stimulasyondan sonra 44. saatte ortama eklenir. Binükleer hücrelerinin biriktiği Cyt-B' nin en uygun konsantrasyonu, tam kan kültüründe 6 µg/ml'

dir[59]. Binükleer lenfositler, Cyt-B eklendikten 28 saat sonra, 0.075 M KCl ile muamele edilerek kırmızı kan hücreleri parçalanır, lama aktarmadan ve boyanmadan önce metanol: asetik asit ile fikse edilir (smear hücrelerinde lamlar kuruduktan sonra fikse işlemi yapılır). Alternatif olarak, Ficoll gradienti kullanılarak tam kan kültüründen binükleer lenfositleri izole etmek mümkündür. İzole edilen hücreler daha sonra sitosantrifugasyon ile lamlara transfer edilir. Daha sonra hücreler fikse edilir ve boyanır.

2.3.2.3. Sitokinez-bloklü ve Sitokinez-bloksuz Hücrelerdeki Mikronükleus Analizi

Binükleer hücreleri elde etmek için kullanılan Cyt-B'nin, MN oluşumunda bazı karışıklıklara sebep olduğu ile ilgili tartışmalar vardır[60]. Normal hücrelerle yapılan çalışmalarda Cyt-B'nin MN'ları indüklediği veya sitokinezde hücreleri bloke etmek için kullanılan dozlardaki binükleer hücrelerde MN frekansı ile Cyt-B'nin etkisinin doza bağlı olmadığı gösterilmiştir[28, 61-63]. Son bir çalışmada sitokinez-bloke edilen binükleer hücrelerde iğ ipliği zehirleri tarafından indüklenen MN oluşumunun beklenenden daha az olduğu öne sürülmüştür, çünkü kutuplar arası mesafenin kısılması geri kalan kromozom parçaları ya da tam kromozomların nükleusa geri katılma olasılığını artırabilir. Fakat bu CBMN analizinin etkinliğini azaltmaz[64]. Hücre bölünme kinetiğinin yetersiz kontrollerinden dolayı yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak ve Cyt-B'nin olası etkisini en aza indirmek için Cyt-B kullanmadan in vitro MN analiziyle ilgili araştırmalara ilgi artmıştır. Normal hücrelerde CBMN analiziyle elde edilen hatalı bir pozitif sonucun kanıtı olmamasına karşın, zaten Cyt-B kullanılan insan lenfosit kültürlerindeki MN indüksiyonu ile ilgili MN analizi için yeterli kanıt vardır[28, 29, 65]. Yine de; Cyt-B'li veya Cyt-B'siz karşılaştırmalı son MN çalışmaları, eğer iyi büyüyen hücreler kullanılırsa kültür ve çekirdek bölünme koşulları en iyi seviyede olursa, güçlü klastojenler test edildiği zaman Cyt-B'li ve Cyt-B'siz MN analizleri arasındaki sonuçlarını karşılaştırmanın mümkün olduğunu göstermiştir[66,67]. MN oluşumunun matematiksel modeli, 1. BN hücrelerdeki MN sayımı mikronükleus frekansının belirlenmesinde güvenilir bir yoldur ve 2. sitokinez-blok olmadan yapılan kültürlerdeki mononükleer (tek çekirdekli) hücrelerde MN sayımı, test edilen kimyasal çekirdek

bölünmesini inhibe ettiğinde veya kültür koşulları optimal sayıda hücre bölünmesine izin vermediğinde yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkarabilir[68]. Sonuç olarak, Cyt-B'siz kültürlerdeki mononükleer hücrelerdeki mikronükleusların sayılmasıyla elde edilen mikronükleus frekansı sonuçları, yanlış negatif sonuçlardan dolayı CBMN analizi kullanılarak doğrulanmalıdır.

2.4. Mikronükleus ve Non-disjunction'daki Kromozom Kaybını Ölçmek İçin Geliştirilen Moleküler Teknikler

CBMN analizinde, MN'ların tam kromozomlardan mı yoksa asentrik parçalardan mı köken aldığını ayırt etmek, sentromerik DNA propları ya da kinetokor proteinlerine (aktif kromozomların sentromerik bölgesinde toplanan) bağlanan antibadiler kullanarak mümkündür. İnsan hücrelerinde veya diğer hücre tiplerinde kromozom büyüklükleri heterojen olduğundan ve küçük bir MN ya büyük bir kromozomun parçasını ya da küçük bir kromozomun tümünü içerebildiğinden, MN büyüklüğü bu ayırım için kullanılamaz. Kullanım açısından anti-kinetokor antibadi yöntemi en basit ve ucuz bir tekniktir[69], ancak bu yaklaşımla tek olan kromozomlar arasında ayırım yapılamaz ve inaktif sentromerler üzerinde kinetokorların olmamasından dolayı kromozom kaybı belirlenemeyebilir[70]. Sentromerik bölgeleri tanımlamak için kullanılan in situ hibridizasyon (ISH) yöntemi çok pahalı ve zahmetlidir, ancak daha spesifiktir. Örneğin, tek kromozomlar için sentromerik proplar kullanılabilir, bu proplar BN hücrelerde non-disjunctional(ayrılmama) olayların(yavru nükleuslarda homolog kromozomların eşit dağılmaması gibi) belirlenmesine olanak sağlar[71].

Geleneksel sitogenetik yöntemlerden birisi de Fenech ve Marleyn tarafından 1985 yılında tanımlanan MN yöntemidir. MN, hücre sitoplazması içinde ana nükleusların yanında, ana nükleusla aynı şekil, yapı ve boyanma özelliği gösteren küçük küresel bir yapılardır. MN met preparatların hazırlanması ve sonuçların değerlendirilmesi CA ve SCE yöntemlerine göre daha hızlı ve kolaydır. Bu yöntemde kültürde bir kez bölünme geçirmiş olan

hücrelerde sitokalsin kullanılarak sitokinez bloke edilmektedir. Hazırlanan preparatlarda binukleat hücrelerde MN frekansı saptanmaktadır[72,73].

2.5. Bitki Ekstratlarını Eldesi

Kurutulmuş bitkilerden, özel ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak, ayrıştırma (osmoz) işlemlerinin gerçekleştirilmesi sonucunda elde edilen, ilaç hammaddesi olarak da kullanılan bitki özlerine (etken maddelere) “ bitki ekstraktı” denir.

2.6. Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon işlemi geleneksel ve yeni yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılır. Sokselet ekstraksiyonu ve maserasyon işlemi geleneksel yöntemle olup işlem süresi uzundur. Büyük miktarlarda çevreyi kirletici çözücüler kullanılmaktadır. Süperkritik sıvı ekstraksiyonu ise mikrodalga ekstraksiyonu ise son yıllarda geliştirilen hızlı, etkin ve modern yöntemler arasındadır. Etkin bir ekstraksiyon için sıcaklık önemli bir faktör olup uçucu ve yarı uçucu bileşiklerin oluştuğu sıcaklık değerleri sırası ile 40-60 °C ve 80-100 °C arasındadır. Sıcaklığın artması artefak oluşumuna neden olur[74].

2.6.1. Çözücü Ekstraksiyonu (Solvent Extraction)

Geleneksel ekstraksiyon yöntemi olup bitki materyali, direkt olarak oda sıcaklığında çözücünün içerisine batırılabilceği gibi bir sokselet içerisinde organik çözücü ile kaynatılabilir. Ekstraksiyon sonunda, organik çözücü destilasyon yöntemi ile ortamdan

uzaklaştırılarak geri kazanılmaktadır. Kalan yağsı kısım içerisinde ise uçucu bileşikler vardır. Bu yöntemin buhar destilasyonuna göre avantajı, ekstraksiyon sırasında düşük sıcaklık kullanılmasıdır. Genellikle sıcaklık, sokselet cihazında 600 °C'den azdır daldırma yönteminde ise 5-25 °C arasındadır. Düşük sıcaklık, elde edilen uçucu yağın buhar destilasyonuna göre daha doğal bir içerik oluşturmasını sağlar. Çözücü ekstraksiyon işleminin iki dezavantajı vardır. Bunlardan ilki ekstraksiyon sonrası yoğunlaştırma işlemi sırasında molekül ağırlığı düşük uçucu bileşiklerin kaybolması ve artifakların oluşması ikincisi ise ekstraksiyon işlemi sonrasında geri kalan çözücüdür. Bu problem ekonomik açıdan ve çevre kirliliği (toksik özellikleri) bakımından önemlidir. Saf ve kaliteli çözücüler pahalıdır ve yüksek miktarlarda kullanıldığı zaman maddi bir yük getirmektedir[75].

2.6.2. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction-Sfe)

Doğal ürünlerin organik çözücülerle muamele edilmesi gerek çevresel gerekse sağlık açısından son yıllarda pek istenmeyen bir olgu haline gelmiştir. Bu noktada daha az çözücü harcayan, ekstraksiyon süresi daha kısa olan ve normal koşullarda yüksek sıcaklıkta çözünen bileşikleri ayrıştırma özelliği ile süperkritik sıvı ekstraksiyonuna olan ilgi giderek artmaktadır[76].

Süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE), bir çözücü ekstraksiyonudur. Organik çözücülerin yerine kullanılan, süperkritik sıvı özelliği gösteren maddeler çözücü olarak kullanılmaktadır. Sıvı çözücülerin sahip olduğu çözme gücü birçok maddeyi çözerken aynı zamanda gazlara yakın difüzyon katsayısı özelliği de çözünen maddeyi hızlı bir şekilde yayar[75].

2.6.3. Mikrodalgayla Ekstraksiyonu (Microwave-Assisted Extraction)

İkinci dünya savaşından beri kullanılan mikrodalga teknolojisinin, analitik laboratuvarında kullanımı 1970'lerin sonunda başlamıştır. Mikrodalgalar 0,3- 300 GHz aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır. Genellikle doğal ürünlerde 2,5- 75 GHz'de ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga enerjisinin etkisi büyük oranda çözücünün içeriğine, bitki materyaline ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlıdır. Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir. Sıcaklık ve basıncı kontrol edilebilen kapalı bir kap içerisinde yapılan en yaygın sistem olan kapalı sistem ekstraksiyonudur. Diğer yöntem ise atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin avantajı, ekstraksiyon süresinin ve kullanılan çözücü miktarının büyük oranda az olmasıdır. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle bitkilerdeki polifenoller ve lignanlar ayrıştırılabilmektedir[76-78].

2.6.4. Sıkıştırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (pressurised solvent- extraction)

Klasik ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Ekstraksiyon süresi, çözücü tüketimi, verim ve tekrarlanabilirlik gibi avantajları vardır. Yöntemin etkisini artırmak için yüksek basınç ve sıcaklıkta organik çözücüler kullanılmaktadır. Sıcaklığın artırılması, ekstraksiyonun kinetiğini hızlandırır ve yükseltilebilir basınç çözücüyü sıvı halde tutarak güvenli ve hızlı bir ekstraksiyon sağlar. Ayrıca yüksek basınç, çözücünün deney materyalinin iç kısımlarına kadar nüfuz etmesini sağlamaktadır. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu da (accelerated solvent extraction- ASE) bu yöntemin bir şeklidir. Bu yöntemde, çelik bir kap içerisine yerleştirilen katı ya da yarı-katı örneğin çözücü ile bir fırın içerisinde 50-200 °C arasında değişen sıcaklıklarda ısıtılır ve ısıtma sırasında fırına 500-3000 psi değerleri arasında basınç uygulanır. Ekstraksiyonun 5-10. dakikalarında ortama yeni çözücü pompalanır, örneğin ve kabın yıkanması sağlanır. Sistem içerisindeki bütün çözücü genellikle nitrojen gazı kullanılarak bir şişe içerisinde toplanır[77].

2.6.5. Katı-faz Mikroekstraksiyon (solid phase microextraction-spme)

Analitik yöntemler örnek toplama, örnek hazırlama, ayrıştırma, tespit ve sonuçların yorumlanmasını içerir. Yapılan çalışmalar analiz süresinin % 80'nin örnek toplama ve hazırlamaya harcadığını gösterir. Bu aşamalarda hata yapılırsa bütün bir çalışmanın çöpe atılması anlamına gelir[79].

2.7. Bitkilerde Uçucu Yağ Eldesi

Bitkisel uçucu yağlar bitkide özel salgı hücreleri ve dokularında tutulurlar. Bunların kullanılması için buldukları bu hücre ve dokulardan çıkartılmaları gerekmektedir. Bitkide buldukları kısmın doğal yapısına bağlı olarak uçucu yağların birçok kimyasal ve fiziksel elde edilme yöntemleri vardır. Bitkilerdeki uçucu yağların elde edilme şekli; kaliteyi ve miktarı etkileyen önemli faktördür.

Uçucu yağ elde etmede uygulanan yöntemler 4 grupta toplanır.

1. Destilasyon yöntemi
2. Mekanik yöntem (Presleme Yoluyla Uçucu Yağ Elde Edilmesi)
3. Anfloranj yöntemi (Ekstraksiyon Yoluyla Uçucu Yağ Elde Edilmesi)
4. Tüketme yöntemi (Çözücüyle Ekstraksiyon)



Resim 2.1: Non Asbestos marka Clevenger cihazı

Bitkisel uçucu yağ elde etmede kullanılan en uygun yöntem su-buhar destilasyon yöntemidir. Bu yöntemde, su ile bitkisel materyal elek şeklinde delikli plakalarla birbirinden ayrılır bitkisel materyal ile suyun doğrudan teması kesilmiştir. Bitki özlerine buhar basıncının uygulanarak bitki özlerinin parçalanması sağlanır. Bu esnada ortaya çıkan uçucu özellikteki esans yağlar ve su buharı, buhar kapağının ortasından çıkan bir boruyla soğuk su dolu bir havuzdan geçirilerek yoğunlaştırılır. Toplama kabında su ile esans yağlar birikir. Bu iki bileşiğin yoğunluk farkı nedeniyle düşük yoğunluktaki esans yağlar su üzerinden toplanır. Alt kısımdaki su ise aromatik su olarak kullanılır[80] .

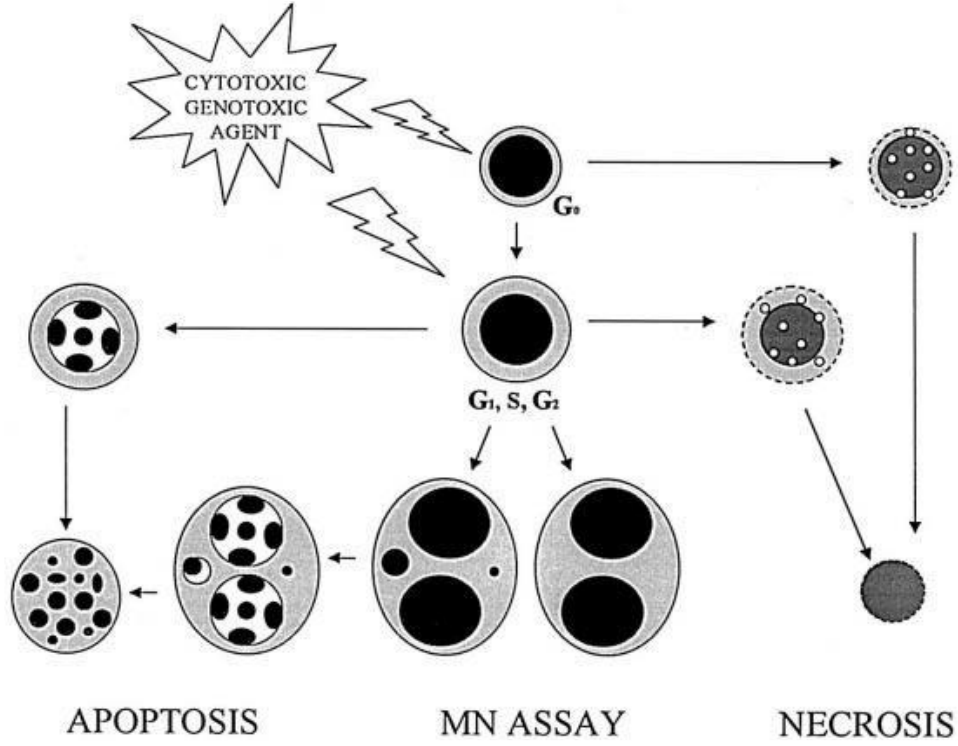
2.8. Apoptoz

Hücresinin programlı ölüm şekli için eski bir Yunan terimi olan apoptoz tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Kelime anlamı yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesidir. Bugün de bu terimin kullanımı uygun olup fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü anlatır. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisini programlanmış bir mekanizma ile ölümünü kontrol eden aktif bir işlemdir. Kısaca

hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olan aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar yoluyla gerçekleşen hücresele lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive olan hücresele intihar programının apoptoza sebep olduğu söylenebilir[81-83]. Fizyolojik olarak apoptoz ise, normal gelişim esnasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi sırasında spesifik hücrelerin kaybının nedenlerindedir. Kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu apoptotik hücre sayısı belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur[81]. Bu da; apoptoz oranının azalması hücre sayısını artırır, apoptoz oranı artması ise hücre sayısını azaltır ve istenmeyen doku tahribatını meydana getirir[82].

Hücresele çoğalma ve apoptozis gibi hücre ölüm işlemleri arasındaki sıkı dengeyle doku yaşamı, sürdürülür. Temelinde genetik mekanizma olan apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulmuş bir hücre intihar mekanizmasıdır. Apoptozis morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Başlıca morfolojik değişimler hücre küçülmesi, nuklear kromatinin yoğunlaşması, nukleusun fragmentasyonu ve DNA'nın internukleozomal alandan ayrılmasıdır. Genomik DNA'nın (deoksiribonükleik asit) internukleozomal fragmentasyonu ise son zamanlarda apoptozisin en belirgin biyokimyasal işareti olarak düşünülmektedir. Tüm bu özelliklerin meydana gelmesi enerjiye bağımlıdır. Bu sebeple apoptozis enerjiye bağımlı işlemlerle hücreyi ölüme sürükler. Caspase ailesi proteazları, BCL-2 ailesi proteinleri ve p53 gen ürünü apoptozisin düzenlenmesinde önemli rol oynar.

Apoptoz; üyelerin oluşumunda, erkek fetüslerde müller kanalının tahribatı sırasında ve el ve ayak parmak taslakları arasındaki ara dokunun ortadan kalkmasında, omuriliğin şekillenmesinde, iltihapta nötrofil ölümünün gerçekleşmesinde, farklılaşmış dokuların olgunlaşmasında ve menstrual siklus gibi birçok olayda görülür[82].



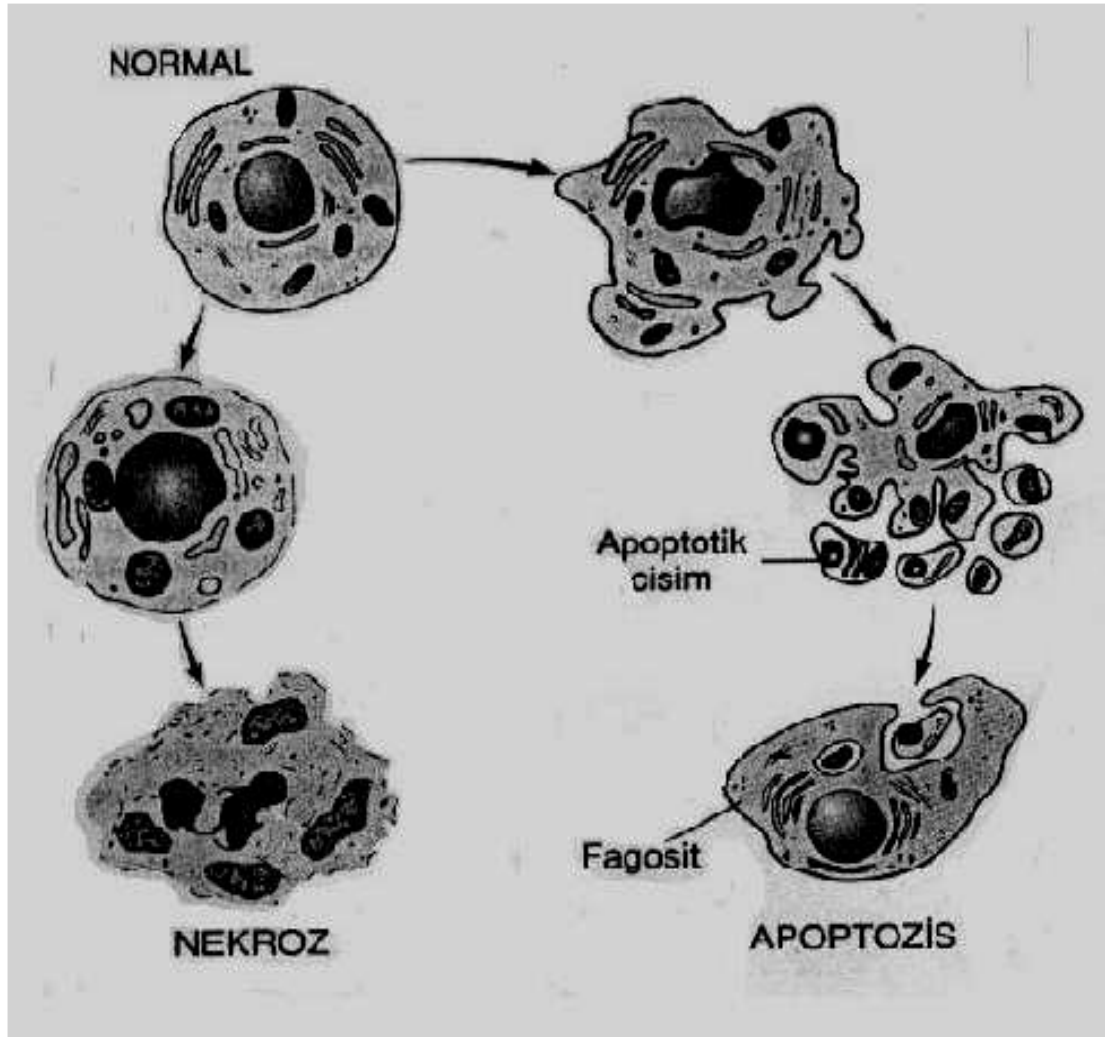
Şekil 2. 3: Sitotoksik ya da genotoksik ajanlara maruz kalan bir hücrenin geçirebileceği değişimler[83].

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hüresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapı 'zeiosis' olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır[84].

2.9. Nekroz

Nekroz, bir veya daha fazla sayıda hücrenin, dokunun ya da organın geri dönüşmez şekilde hasar görmesi sonucu görülen patolojik ölümdür. Örneğin bir yanık durumunda aşırı ısıya maruz kalan vücut parçası nekroza uğrayıp cansız doku haline gelebilir. Diğer sebepler; yaralanma, enfeksiyon, kanser, enfarktüs, zehirlenme ve enflamasyon olabilir.

Nekroz; iskemi, toksik maddelerin aşırı konsantrasyonu, hipertermi, viral enfeksiyon ve hipertermi gibi nedenlerle ortaya çıkabilir. Nekroz hücre zarının bütünlüğünün bozulması, kromatinin dağılması, hücre şişmesi, organelerin bozulması, büyük hücresel vakuollerin oluşumu ile karakterize olan bir oluşumdur. Nekroz apoptozdan, hücre gruplarını etkilemesi ve inflamasyon oluşumu yönleri ile ayrılır[83,85-88].



Şekil 2. 4: Apoptozis ile Nekrozis arasındaki farklar[89].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

*Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 29.06.2011/ 06 sayılı izni ile çalışma onayı alındı.

Bu çalışmada test maddesi olarak karabaş kekiği ve kimyon uçucu yağları, materyal olarak da sigara içmeyen, rutin ilaç kullanmayan yaşları birbirine yakın (22-25) sağlıklı 10 erkek ve 10 bayandan alınan periferik kan kullanıldı.

3.1.1. *Cuminum cyminum* (Kimyon)

Kimyon (*Cuminum cyminum*) sistematigi aşağıda verilmiştir.

Kingdom : Plantae (bitkiler)

Subkingdom : Tracheobionta (damarlı bitkiler)

Division : Magnoliophyta (kapalı tohumlular)

Class : Magnoliopsida (iki çenekliler)

Subclass : Asteridae

Order : Apiales

Family : Apiaceae (maydanozgiller)

Genus : Cuminum

Species : *Cuminum cyminum*

3.1.2. *Thymbra spicata* (Karabaş Kekiği)

Karabaş Kekiği (*Thymbra spicata*) sistematığı aşağıda verilmiştir.

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Subclass : Asteridae
Order : Lamiales
Family : Lamiaceae
Genus : *Thymbra*
Species : *Thymbra spicata* L.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.2.1.1. Aseton

Ketonlar sınıfının ilk üyesi olup dimetil ketondur. Asetonun kapalı formülü C_3H_6O , kaynama noktası ise $56^\circ C$ 'dir. Keskin kokuya sahiptir[90]. Karabaş kekiği ve kimyon bitki uçucu yağlarını çözmek için Merck marka aseton kullanılmıştır. 5 ml besiyerine eklenecek olan aseton miktarı %1 olarak hesaplanmıştır.

3.2.1.2. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Biochrom firmasına ait olan Chromosome Medium B hücre kültürü olarak kullanılmıştır. Aşağıdaki maddeler Chromosome Medium B'nin her litresinde bulunmaktadır:

Non essential Amino Acids.....	850 ml
Fetal Calf Serum	150 ml
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin M.....	2.5 mg

Bu medyum steril kültür tüplerine 5 ml paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır.

3.2.1.3. Cytochalasin-B

CBMN analizinde, bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerde, sitokalazin-B (Cyt-B) kullanılarak sitokinez bloke edilir ve bu hücreler binükleer hücreler olarak tanımlanırlar. Cyt-B, sitokinez esnasında kardeş nükleuslar arasındaki sitoplazmayı daraltan ve mikrofilament halkanın oluşumu için gerekli olan aktin polimerizasyonun bir inhibitörüdür[91]. Kültür tüplerine 48. saatte 6 µg/ml eklenerek kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Sitokalasin B

Molekül ağırlığı: 479,61 g/mol

Safılık düzeyi: \geq %98

CAS No: 14930-96-2

Kapalı formülü: C₂₉H₃₇NO₅

3.2.1.4. Mitomisin C (MMC) eriyiğinin hazırlanması

2 mg mitomisin-C bulunan ortama 2 ml steril bidistile su ilave edilerek MMC eritilmiştir. Sonra bu eriyikten 5 ml'lik kültür ortamına ilave edilerek MMC ile hücreler 24 saat muamele edilmiştir. Mitomisin C (MMC) (Sigma) bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan, Mitomisin C (MMC) mavi-menekşe renkte, kristal şeklinde ve suda çözünebilen bir maddedir. Suda çözünen (pH=6-9) eriyik, ışıktan korunduğu ve 5°C altındaki buzdolabı koşullarında saklandığında yedi gün özelliğini korumaktadır. Mitomisin C 2 mg ve 10 mg'lık şişelerde toz şeklinde bulunur. MMC geniş spektrumlu bir sitostatik (hücre bölünmesini durduran), antinoplastik (urların büyümesini önleyen) ve ajandır[92]. Mitomisin C(MMC)'nin kullanım alanları Mitomisin C (MMC), antineoplastik ilaçlar grubuna dâhildir. Bu grupta cyclophosphamide, daunamycin, mitomycin C, streptozotocin ve uracil mustard gibi ilaçlar bulunmaktadır.

Mitomisin C (MMC) çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan alkilleyici bir ajandır.

MMC'nin kullanıldığı kanser türleri ise;

- Mide kanseri
- Anüs ve kalın barsak kanserleri
- Göğüs kanseri
- Küçük hücreli akciğer kanseri
- Baş ve boyun kanserleri
- Küçük mesane papillomalan
- Pankreas kanseri
- Rahim kanseridir[92].

3.2.1.5. Hipotonik Eriyik

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

3.2.1.6. Fiksatif

Preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif, 1 kısım glasiyal asetik asit'in 3 kısım metanolün (1/3: glasiyal asetik asit/metil alkol) karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Fiksatif her zaman taze olarak kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1.7. Sorenson fosfat tampon çözeltisi

KH_2PO_4 çözeltisinden 60 ml. ve Na_2HPO_4 çözeltisinden 30 ml. alınarak şaleye konulur ve üzerine 10 ml. giemsa boyası eklemek suretiyle %10 luk giemsa-sorenson fosfat tampon çözeltisi hazırlanmış olur. Sorenson fosfat tampon çözeltisi çeşitli pH değerlerine ayarlanabilir, bu işlem için her iki çözeltinin değişik miktarları kullanılarak pH istenilen değere ayarlanır[93].

3.2.1.8. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış, %5'lik boya eriyiği kullanılmıştır.

3.2.1.9. Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, Cat. No. 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanılmıştır.

3.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

1. Heparin(Roche)
2. Giemsa (Merck, 5400512)
3. KH₂PO₄ (merck, 9021622)
4. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
5. Metanol (Merck, 502K05275408)
6. Entellan® (Merck, 640171987)
7. İmmersiyon yağı® (Merck, 09403569)
8. KCL (Merck, 340TA611835)
9. Alkol(Merck)
10. Distile su
11. Tüplük
12. Çeşitli cam malzemeler
13. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
14. Enjektör
15. Çeşitli ebatlarda puarlar
16. Pasteur pipeti

17. Lam
18. Lamel

3.2.3 Deney Ekipmanları

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

3.2.4 Kullanılan Cihazlar

1.Hassas Terazı

Kimyasalların tartılmasında 0,0001 gr hassasiyetindeki özel cam paravanlı PRECİSA XB 220 A marka terazi kullanıldı.

2.Santrifüj

Çalışmalarda 8 tüp kapasiteli 5000 rpm devir hızına yükselebilen 15 dk kadar ayarlanabilen ELEKTRO-MAG marka santrifüj kullanılmıştır.

3.Mikroskop

İmmersiyon objektifi ve koordinat cetveli olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır.

3.3. Ekstraksiyon

Kullanılan Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş Kekik (*Thymbra spicata*) bitkileri gölgede kurutuldu. Daha sonra yaprak ve tohum kısımları ayrıldı. NON ASBESTOS marka Clevenger cihazı ekstraktları çıkarmak için kullanılmıştır. 40 gr bitki için 400 ml distile su ilave edilerek 3 saatte uçucu yağ çıkarıldı. Yeterli miktarda uçucu yağ elde edilene kadar ekstrasyon işlemi tekrar edildi. Elde edilen uçucu yağdan 100 µl alınarak 900 µl asetonla karıştırıldı. Sonuç olarak 1 kısım yağ 9 kısım aseton karıştırılmış oldu[94].

Sırasıyla her iki bitki için dört ayrı doz uygulandı ve her doz şu hesaplamalar doğrultusunda 5 ml'lik besiyerimize eklendi:

1. 2.5 µl Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş Kekik (*Thymbra spicata*) için doz:

0.05 µl/ml uçucu yağ eldesi için 5 ml besiyerine $0.05 \mu\text{l/ml} \times 5 \text{ ml} = 0.25 \mu\text{l}$ uçucu yağ ihtiyacı vardır. Bu doz besiyerine şu şekilde ilave edildi,

1000 µl stok çözeltide (100 µl uçucu yağ+900 µl aseton) 100 µl uçucu yağ bulunuyorsa

X µl 0.25 µl uçucu yağ bulunur

X = 2.5 µl sonucu bulunur

Elde edilen değere göre stoktan 2.5 µl alınarak 5 ml besiyerimize eklendi.

2. 5 µl Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş Kekik (*Thymbra spicata*) için doz:

0.10 µl/ml uçucu yağ eldesi için 5 ml besiyerine $0.10 \mu\text{l/ml} \times 5 \text{ ml} = 0.5 \mu\text{l}$ uçucu yağ ihtiyacı vardır. Bu doz besiyerine şu şekilde ilave edildi,

1000 µl stok çözeltide (100 µl uçucu yağ+900 µl aseton) 100 µl uçucu yağ bulunuyorsa

X µl 0.5 µl uçucu yağ bulunur

X = 5 µl sonucu elde edilir.

Elde edilen değere göre stoktan 5 µl alınarak 5 ml besiyerimize eklendi.

3. 7.5 µl Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş Kekik (*Thymbra spicata*) dozu:

0.15 µl/ml uçucu yağ için 5 ml besiyerine $0.15 \mu\text{l/ml} \times 5 \text{ ml} = 0.75 \mu\text{l}$ uçucu yağa ihtiyaç vardır. Bu doz besiyerine şu şekilde ilave edildi,

1000 µl stok çözeltide (100 µl uçucu yağ+900 µl aseton) 100 µl uçucu yağ bulunuyorsa

X µl 0.75 µl uçucu yağ bulunur

X = 7.5 µl sonucu elde edilir.

Elde edilen değere göre stoktan 7.5 µl alınarak 5 ml besiyerimize eklendi.

4. 10 µl Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş Kekik (*Thymbra spicata*) için doz:

0.20 µl/ml uçucu yağ için 5 ml besiyerine $0.20 \mu\text{l/ml} \times 5 \text{ ml} = 1.0 \mu\text{l}$ uçucu yağa ihtiyaç vardır. Bu doz besiyerine şu şekilde ilave edildi,

1000 µl stok çözeltide (100 µl uçucu yağ+900 µl aseton) 100 µl uçucu yağ bulunuyorsa

X µl 1.0 µl uçucu yağ bulunur

X = 10 µl sonucu elde edilir.

Elde edilen değere göre stoktan 10 µl alınarak 5 ml besiyerimize eklendi.

3.4. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1. Çalışma grubu

Sigara içmeyen, 22-25 yaşlarında sağlıklı, 10 erkek ve 10 bayan toplam 20 üniversite öğrencilerinden periferik kan örnekleri alınmıştır.

3.4.2. Kan örneklerinin alınması

Kontrol kişilerden, 5 ml'lik steril ve 0.1-0.2 cc heparin içeren enjektörler kullanılarak periferik kan örnekleri alındı. Daha sonra kan örneklerinin bekletilmeden kültür ortamlarına ekimi yapıldı.

3.4.3. Kültür tekniği

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 5 ml medyum içeren kültür tüplerine steril ortamda, alınan kan örneklerinin 3-4 damlası dışarı atıldıktan sonra 12 damla (~0.4ml) kan ilave edildi. Tüplerin üzerine kontrol kişilerinin adı yazıldı ve her bir kişi için 2 tüpe ekim yapıldı. Kültür süresinin bitimine 24 saat kala Kimyon ve Karabaş Kekiği uçucu yağları mikronükleus üzerine etkisini incelemek için son olarak kültür tüplerine ilave edildi. Tüpler hafifçe karıştırılarak 37 °C'lik etüvde 48. saatte Cyt-B eklemek koşuluyla 72 saat kültüre edildi.

Negatif Kontrol Grubu:

Negatif kontrol grubu olarak tutuldu. Hazırlanan deney tüplerine besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde ilave edildi. Kontrol grubumuza herhangi madde eklenmedi. Her iki deney grubumuz için yapıldı. 72 saat inkübasyona bırakıldı.

Pozitif Kontrol Grubu:

Hazırlanan deney tüplerine Mitomisin-C (MMC) 0,3 µg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde ilave edildi kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 saat kala MMC eklendi. Her iki deney grubumuz için ayrı yapıldı.

Çözücü Kontrol Grubu(Aseton):

Hazırlanan deney tüplerine çözücü kontrolü için asetondan 2.5 µl/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde ilave edildi. Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 saat kala aseton eklendi. Her iki deney grubumuz için ayrı olarak yapıldı.

Grup 1. Hazırlanan deney tüplerine kekik ve kimyon uçucu yağları için oluşturulan ayrı iki stoktan 0.05 µl/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde ilave edildi. Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 saat kala bitki uçucu yağları eklendi.

Grup 2. Hazırlanan deney tüplerine kekik ve kimyon uçucu yağları için oluşturulan ayrı iki stoktan 0.10 µl/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde ilave edildi. Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 saat kala bitki uçucu yağları eklendi.

Grup 3. Hazırlanan deney tüplerine kekik ve kimyon uçucu yağları için oluşturulan ayrı iki stoktan 0.15 µl/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde ilave edildi. Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 saat kala bitki uçucu yağları eklendi.

Grup 4. Hazırlanan deney tüplerine kekik ve kimyon uçucu yağları için oluşturulan ayrı iki stoktan 0.20 µl/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde ilave edildi. Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 saat kala bitki uçucu yağları eklendi.

3.4.4. Çıkarım işlemleri

Umegaki ve arkadaşlarının MN elde etmek için çalışmasında kullanılan Balasem ve Ali yöntemine göre çıkarım işlemleri yapıldı[95,96].

1. 72 saat inkübasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
2. Dipte 0,6- 0,7 ml kalıncaya kadar üstteki supernatantlar atıldı.
3. Daha sonra hücrelere laboratuvar ısısında beklemiş, olan % 0,4'lük hipotonik solüsyonundan 6 ml eklenerek 15 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.
4. Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 10 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.
5. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glasiyal asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 10 dakika 1200 rpm'de santrifüj yapıldı.
6. Süpernatantların tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 ml ilave edilip, 10 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

3.4.5. Preparat Hazırlama

Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti ile lamlara yakın mesafeden(1-2 cm yukarıdan) 3-4 damla damlatıldı ve preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı preparatlar hazırlandı ve lamlara ayrı ayrı numaralar verildi.

3.4.6. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Kuruyan preparatlar yeni hazırlanmış olan % 5'lik giemsada 10 dakika boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Preparatlar kuruduktan sonra kanada balsamı (entellan) damlatılarak lamelle kapatıldı[97].

3.4.7. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

En iyi görüntü 1000X'lik büyütmede sağlandı. Her bir duplike kültürden alınan lamalar için bir skor elde edilmelidir. Her bir preparat aşağıdaki bilgiler çerçevesinde incelendi.

1. MN'ların sayısı,1000 BN hücrede sayılmalıdır ve 1000 BN hücre başına MN frekansı hesaplanmalıdır. BN hücrede MN'ların sayılmasında kullanılan kriterler detaylı bir şekilde aşağıda açıklanmıştır.
2. Sıfır, bir veya daha fazla MN içeren BN hücre dağılımı; tek bir BN hücrede MN sayısı normalde sağlıklı bireylerin lenfositlerinde 0 ila 3 arasında değişmektedir ancak maruz kalınan genotoksine ve yaşa bağlı olarak 3'den fazla olabilir.
3. Mikronükleuslu BN hücrelerinin frekansı, en azından 1000 BN hücrede bulunmalıdır.
4. 1000 BN hücresinde nükleoplazmik köprü frekansı hesaplanmalıdır.

5. 500 hücre başına tek çekirdekli (mononükleer), iki çekirdekli (binükleer), üç çekirdekli (trinükleer) ve dört çekirdekli (tetranükleer) hücrelerin oranı hesaplanmalıdır. Bu bilgiye dayanarak çekirdek bölünme indeksi oluşturulabilir.

6. Canlı ya da apoptoz veya nekrozdan dolayı ölen hücrelerin sayısı, aynı preparat üzerinde 500 hücre başına tek-, iki- ve çok- çekirdekli hücreler sayılırken sayılabilir. Hücreler sayılırken, hücre tanımlanamadığında skorlanan hücrelere dâhil edilmez[93,98,99].

3.5. Sitokinezi Bloke Edilmiş Binükleer Hücreleri Tanımlama Kriterleri

MN frekansı değerlendirilecek olan sitokinezi bloke edilmiş hücreler aşağıdaki kriterleri içermek zorundadır.

1. Hücreler binükleer (iki çekirdekli) olmalıdır.
2. Binükleer hücredeki iki çekirdeğin boyutu yaklaşık olarak aynı olmalı ve yoğun boyanmalıdır.
3. Binükleer hücredeki iki çekirdek nükleoplazmik bir köprü ile bağlanabilir. Bu nükleoplazmik köprü çekirdek çapının 1/4' ünden büyük olmamalıdır.
4. Binükleer hücredeki iki çekirdek birbirine temas edebilir, ancak ideal olarak birbirinin üzerine çıkmamış olmalıdır. İki çekirdeği üst üste çıkmış olan bir hücre eğer her bir çekirdeğin çekirdek sınırları ayırt edilebiliyorsa sayılmalıdır.
5. Binükleer hücrenin sitoplazmik sınırı ya da zar yapısı bozulmamış olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazmik sınırından açıkça ayırt edilebilmelidir[21] .

3.5.1. Mikronükleus Sayımı

Sayılan çekirdeklerin tekrar sayılmaması için ışık mikroskopunda 400X büyütmede sitoplazması dağılmayıp sınırları belli olan çekirdekler belirlendi ve bunlar sayıldı. Kontrol kişiler için duplike olarak yapılan kültürlerden hazırlanan preparatlarda 2000 BN hücre sayıldı ve mikronükleuslar kaydedildi. Aynı zamanda, her bir kişi için, 500 mononükleer (tek çekirdekli) hücre başına binükleer (iki çekirdekli), trinükleer (üç çekirdekli) ve tetranükleer (dört çekirdekli) hücrelerin sayısı da kaydedildi ve çekirdek bölünme indeksi (NDI) hesaplandı. Apoptotik ve nekrotik hücreler ışık mikroskopunda çekirdeğin yapısına bakılarak belirlendi. Apoptotik hücrelerde hücre zarının yapısı kısmen bozulmuş, nükleus küçük parçalara ayrılmıştır. Nekrotik hücrelerde ise solgun bir çekirdek yapısı vardır, içinde vakuoller doludur ve sitoplazmasının yapısı da bozulmuştur.

$$\text{NDI: } [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$$

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

Ap: Apoptotik hücre

Nec: Nekrotik hücre

M1: Bir nükleuslu hücre,

M2 : İki nükleuslu hücre,

M3: Üç nükleuslu hücre,

M4: Dört nükleuslu hücre,

N: Toplam yaşayan hücre,

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

NDI: Nuclear Division Index (Nükleer Bölünme Frekansı)

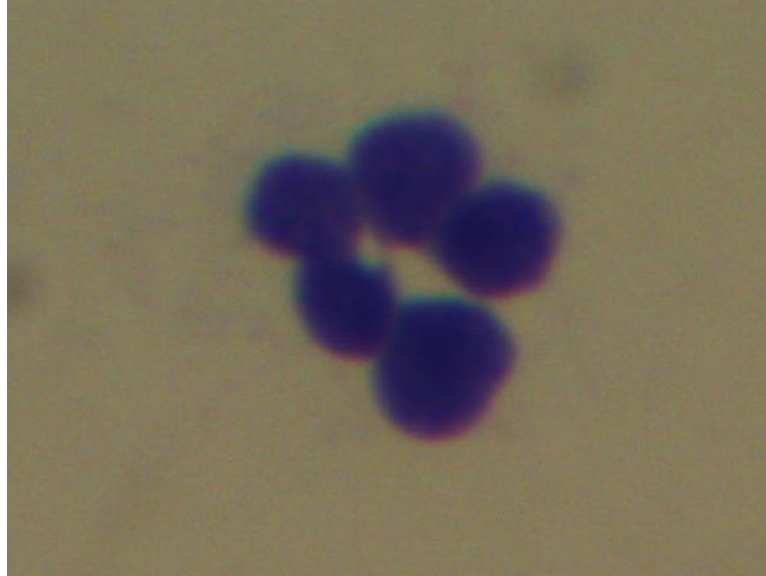
NDCI: Nuclear Division Cytotoxicity Index (Nükleer Bölünme Sitotoksite Frekansı)[17,100].

3.5.2. Hücree Sayısı ve İstatistiksel Değerlendirme

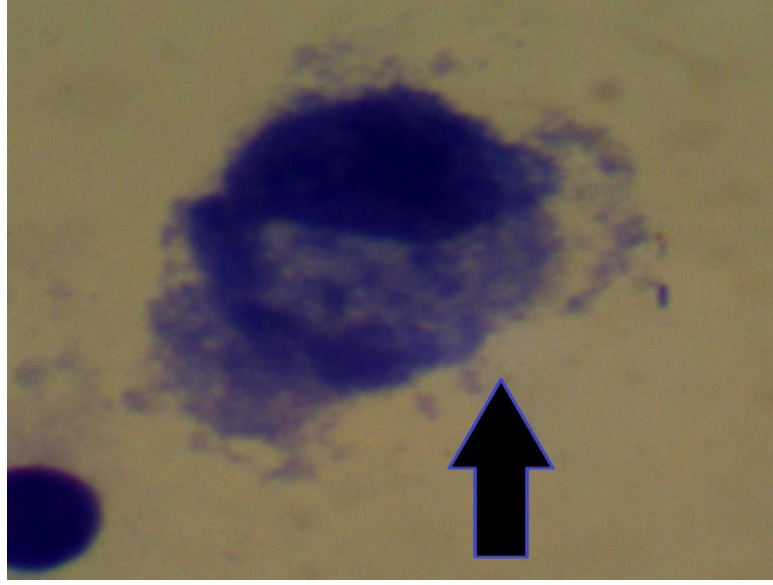
İstatistiksel analiz “GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego California USA)” programıyla yapılmış ve kültürde bulunan hücrelerdeki mikronükleus sıklığındaki artış Dunnett’s *t*-test ile hesaplanmıştır[94].

4. BULGULAR

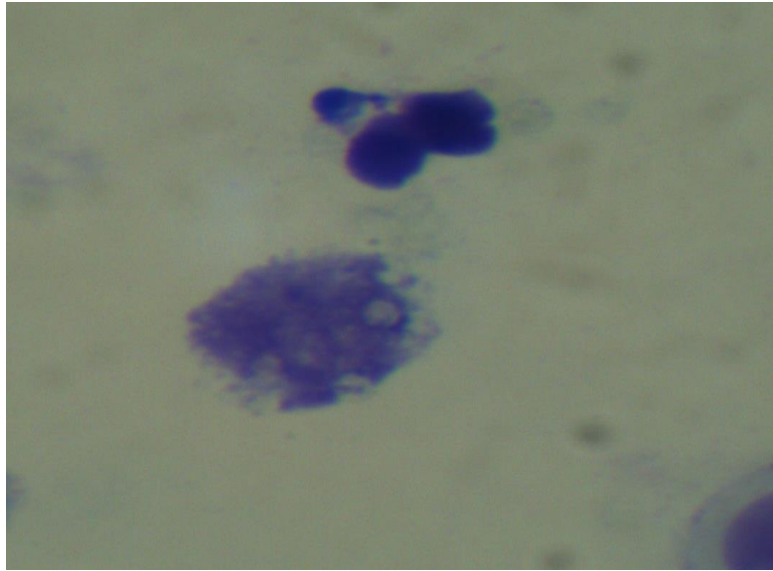
Kekik ve kimyon uçucu yağlarının insan periferik lenfositlerine 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 µl/ml dozlarının 24 saat muamelesi sonucu oluşan MNBN'ler Resim 4.8, Resim 4.9 da, Karabaş Kekiği ve Kimyonun insan lenfositlerinde mikronükleus sıklığı, nükleer bölünme indeksi, nükleer sitotoksik bölünme indeksine etkileri Tablo 4.1 de verilmiştir. Karabaş kekiği ve kimyonun 4 farklı dozu (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 µl/ml) insan periferik kanının kullanıldığı lenfosit kültürüne 48. saatte eklenmiştir. Sitokinez olayı sitokalsin-B eklenerek engellenip ve mikronükleus sıklığı, hücre ölümü (apoptoz ve nekroz) incelenmiştir. Kimyon ve Karabaş kekiğinin değişik dozları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürlerinde MN oranları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 'de gösterilmiştir. Karabaş kekiği tüm dozları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 0.05 ve 0.10 değerleri önemsiz ($p>0.05$) diğer dozlar ve pozitif kontrol önemli bulunmuştur ($p<0.01$)*. Kimyonun tüm dozları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 0.05, 0.10, 0.15 değerleri önemsiz ($p>0.05$) diğer dozlar ve pozitif kontrol önemli bulunmuştur ($p<0.01$)*. Tüm dozlarda kontrollere göre hücre ölümünü istatistiksel olarak artırmış ve bölünme indeksini düşürmüştür. Çekirdek bölünme indeksi hücrelerde bulunan çekirdek sayısına göre hesaplanmıştır ve Tablo 4.1 'de verilmiştir.



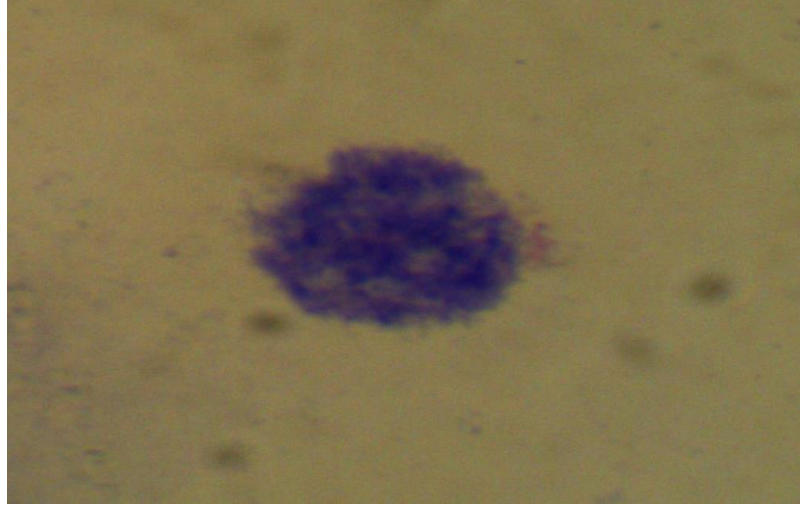
Resim 4.1 : Apoptozu gitmekte olan hücre (x1000)



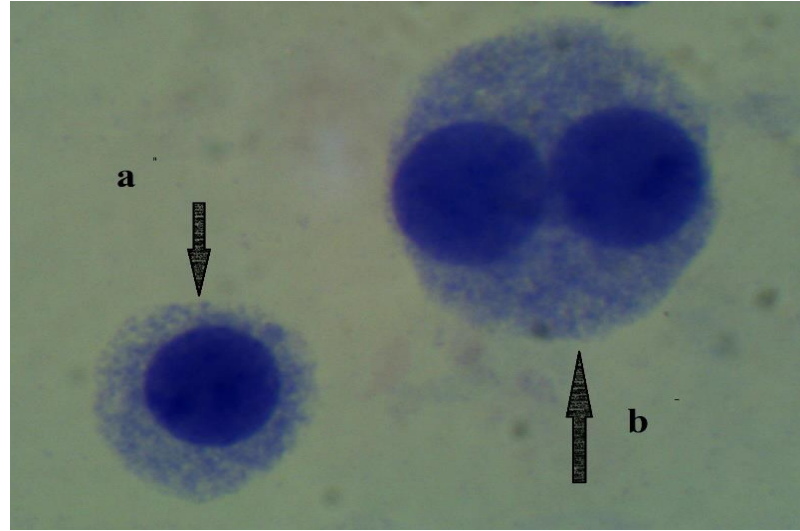
Resim 4. 2: Apoptoza uğramış bir hücre (x1000)



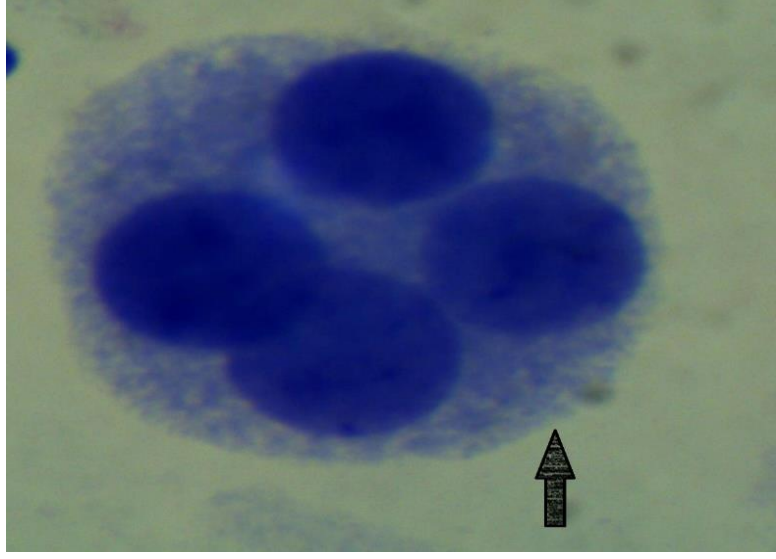
Resim 4. 3: Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre (x1000)



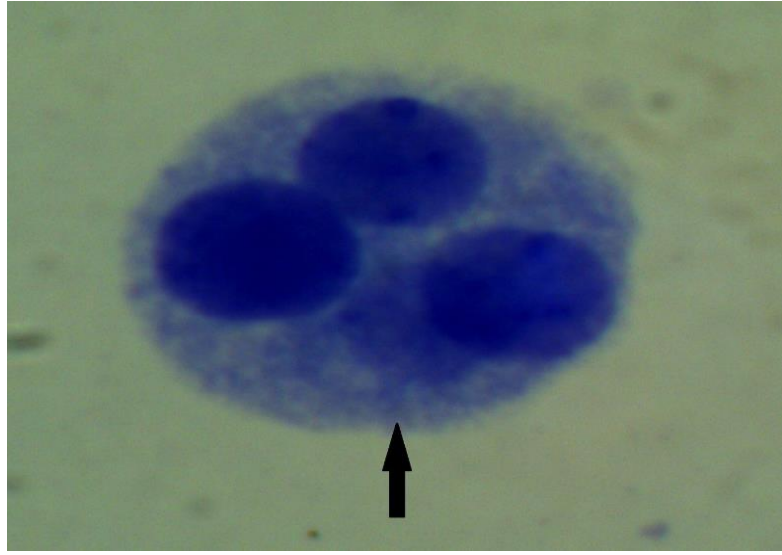
Resim 4. 4: Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre (x1000)



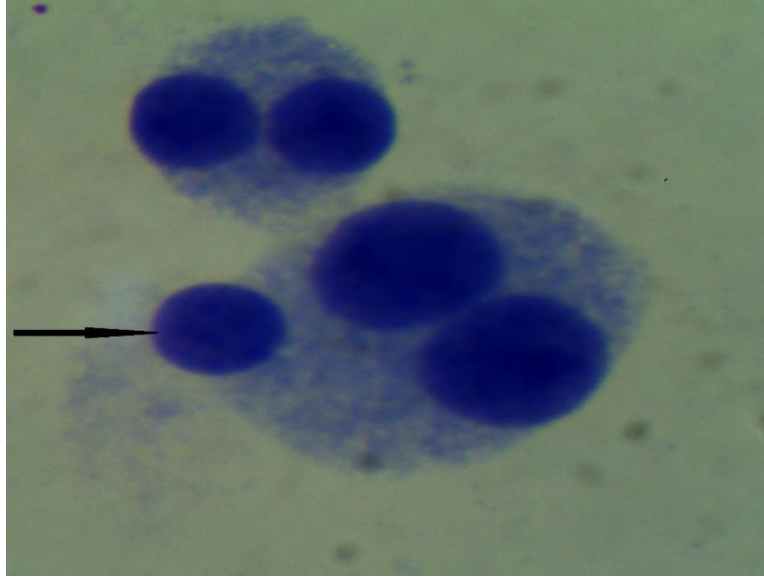
Resim 4. 5: Tek nükleuslu hücre (a), normal sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu hücre(b) (x1000)



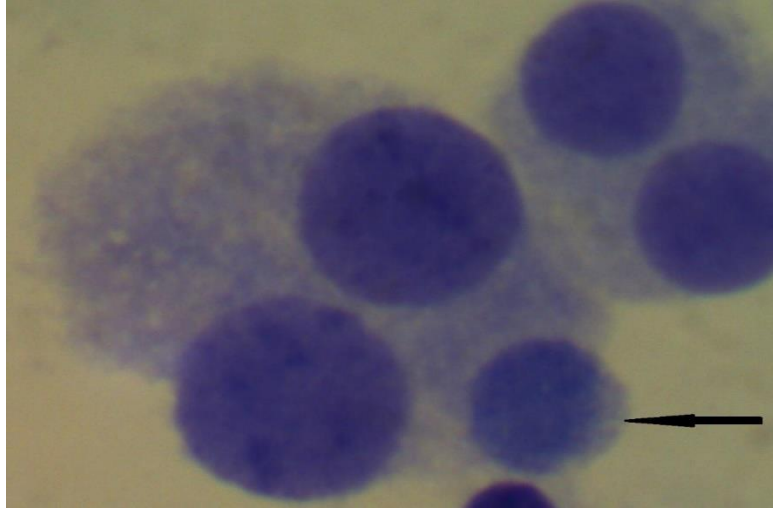
Resim 4. 6: 4 Nükleuslu bir hücre (x1000)



Resim 4. 7: Üç nükleuslu bir hücre (x1000)



Resim 4. 8: Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve bir mikronükleus içeren hücre (x1000)



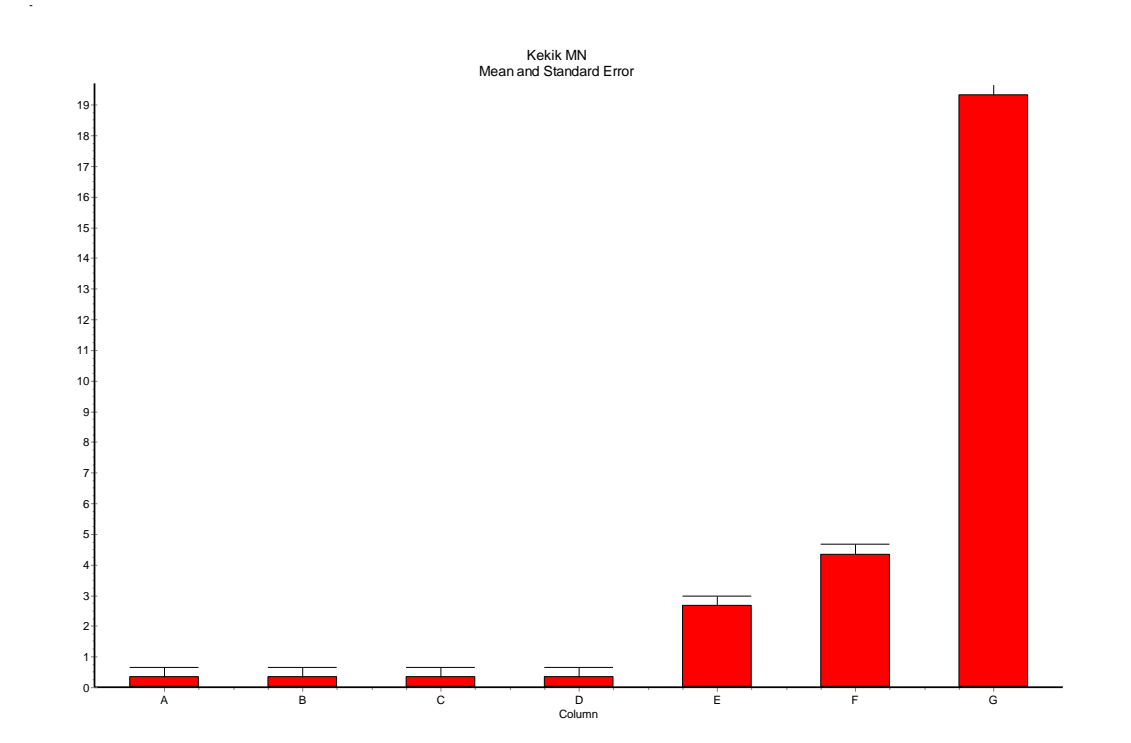
Resim 4. 9: Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve bir mikronükleus içeren hücre (x1000)

Tablo 4. 1: Karabaş Kekiği ve Kimyonun İnsan Lenfositlerinde Mikronükleus Sıklığı, Nükleer Bölünme İndeksi, nükleer Sitotoksik Bölünme İndeksine Etkileri

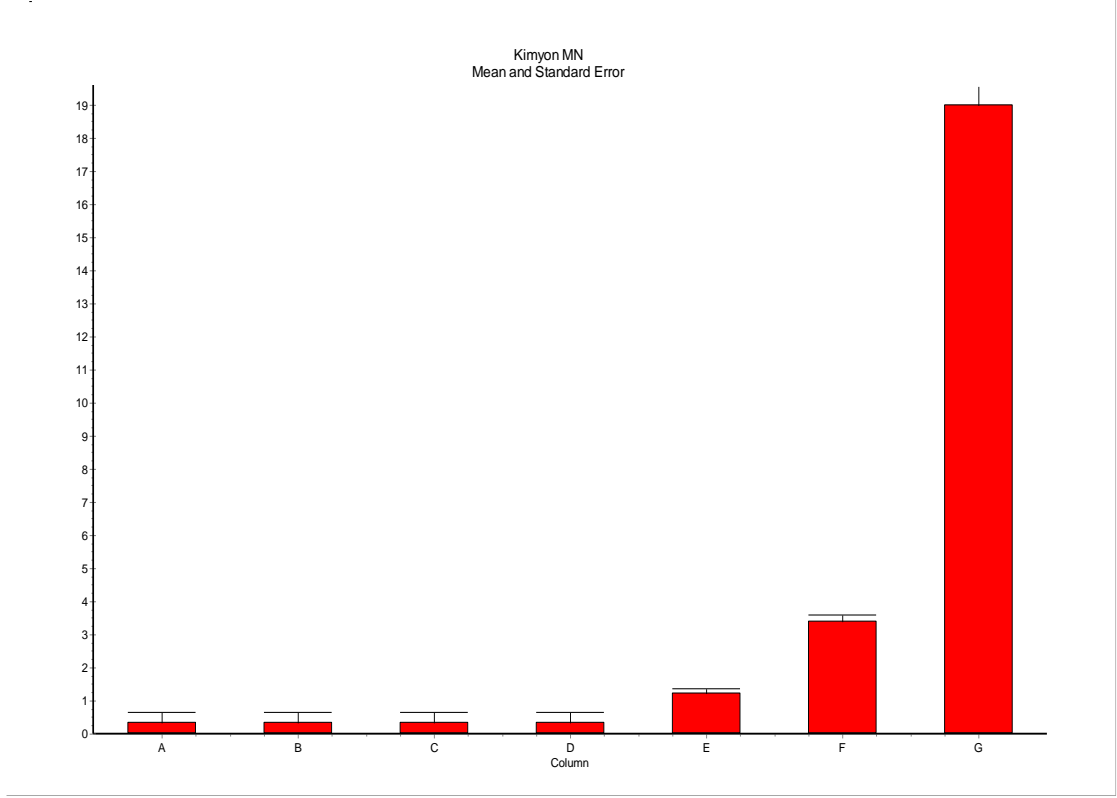
Test maddesi	Uygulama		Sayılan Hücre sayısı	1	2	3	4	NDI ± SH	N	A	NSDI± SH
	SÜRE (s)	Doz µg/ml									
Negatif kontrol	–	–	2000	765	957	88	190	1.851 ±0.33	0	0	1.851±0.24
PK(MMC)	24	0.3	2000	1186	690	64	60	1.499±0.90	25	22	1.487±1.15
Çözücü kontrol		2.5	2000	990	718	120	145	1.683 ±0.35	15	12	1.665±0.28
Kekik (µl/ml)	24	0,05	2000	1152	560	153	135	1.635±0.38	15	10	1.627±0.45
		0,10	2000	1194	522	176	108	1.599±0.25	23	15	1.587±0.52
		0,15	2000	1213	510	180	95	1.576 ±0.35	18	20	1.565±0.37
		0,20	2000	1252	480	168	96	1.555 ±0.32	30	22	1.536±0.38
Kimyon (µl/ml)	24	0,05	2000	1152	530	210	108	1.637 ±0.24	17	15	1.626±0.28
		0,10	2000	1153	509	233	105	1.645 ±0.45	21	18	1.632±0.29
		0,15	2000	1279	425	197	98	1.538 ±0.29	18	20	1.528±0.33
		0,20	2000	1310	421	175	91	1.520 ±0.32	37	21	1.505±0.46

Karabaş kekiği ve kimyonun 4 farklı dozu (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 µl/ml) insan periferel kanının kullanıldığı lenfosit kültürüne 48. saatte eklenmiştir. Sitokinez olayı sitokalsin-B eklenerek engellenip ve mikronükleus sıklığı, hücre ölümü (apoptoz ve nekroz) incelenmiştir. Karabaş kekiği tüm dozları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 0.05 ve 0.10 değerleri önemsiz ($p>0.05$) diğer dozlar ve pozitif kontrol önemli bulunmuştur ($p<0.01$)* (Dunnett's *t*-test).

Kimyonun tüm dozları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 0.05, 0.10, 0.15 değerleri önemsiz ($p>0.05$) diğer dozlar ve pozitif kontrol önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Tüm dozlarda kontrollere göre hücre ölümünü istatistiksel olarak artırmış ve bölünme indeksini düşürmüştür. Çekirdek bölünme indeksi hücrelerde bulunan çekirdek sayısına göre hesaplanmıştır ve Tablo 4.1’de verilmiştir. Yani kimyon ve karabaş kekiği uçucu yağı MN oluşumunu uyarmıştır. Ancak bu artış pozitif kontrol olan MMC’deki kadar olmamıştır.

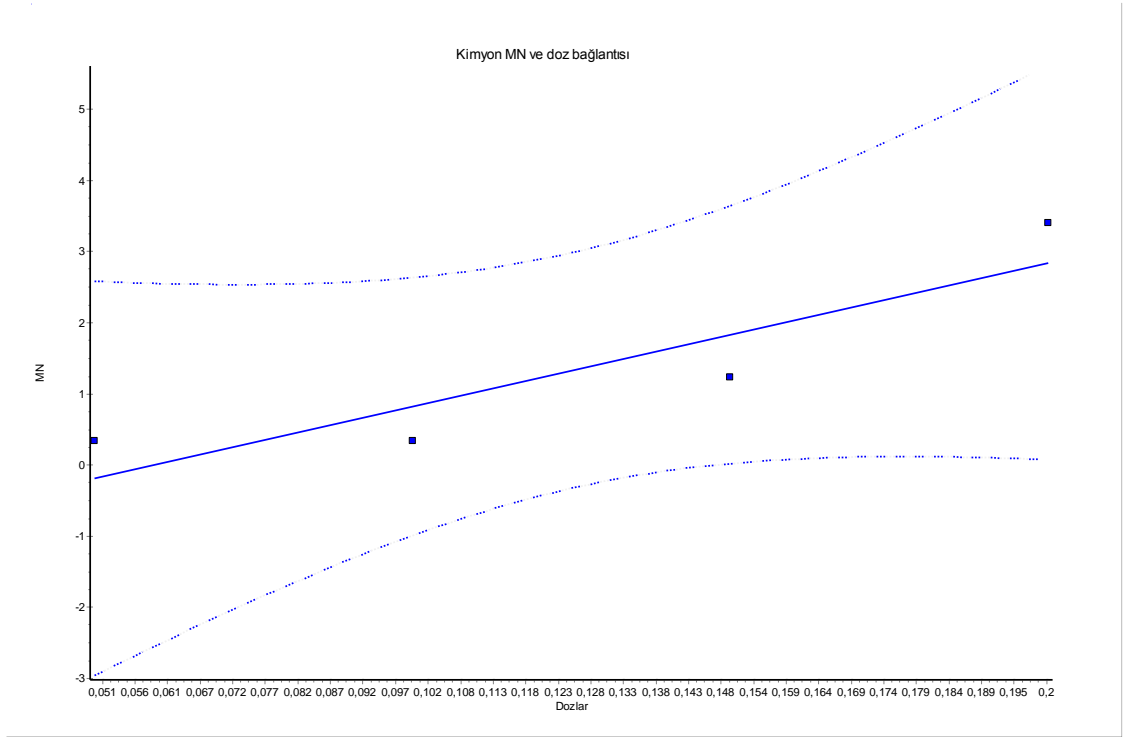


Şekil 4. 1: Karabaş kekiğinin değişik dozları (0.05 µl/ml,0.10 µl/ml,0.15 µl/ml,0.20 µl/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürlerinde MN oranları (A: Negatif kontrol, B:Çözücü Kontrol, C: 0.05 µl/ml karabaş kekiği, D: 0.10 µl/ml karabaş kekiği, E: 0.15 µl/ml karabaş kekiği, F: 0.20 µl/ml karabaş kekiği, G : Pozitif kontrol MMC)



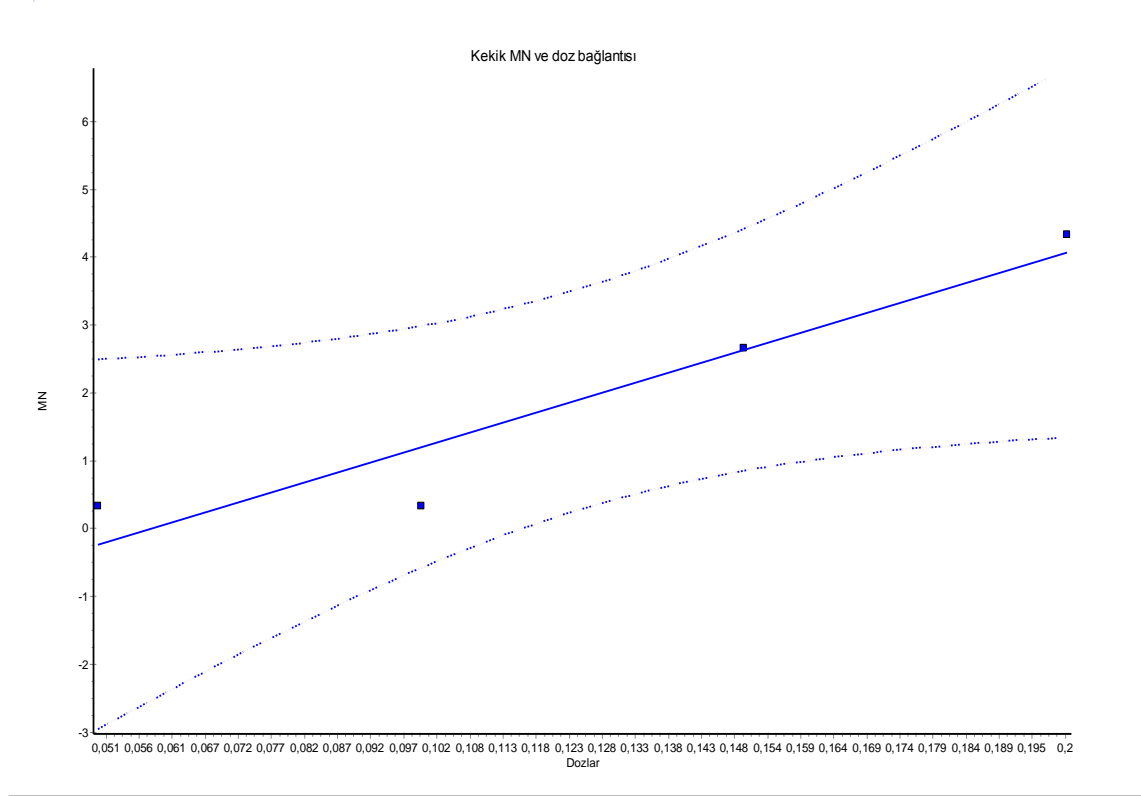
Şekil 4. 2: Kimyonun değişik dozları (0.05 μ l/ml,0.10 μ l/ml,0.15 μ l/ml,0.20 μ l/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürlerinde MN oranları(A: Negatif kontrol, B: Çözücü Kontrol, C: 0.05 μ l/ml kimyon, D: 0.10 μ l/ml kimyon, E: 0.15 μ l/ml kimyon, F: 0.20 μ l/ml kimyon, G: Pozitif kontrol MMC)

Çizelge 4. 1: Kullanılan Kimyon Uçucu Yağ Dozları ile MN Oranı Arasındaki Regresyon Çizelgesi



Kimyonun uçucu yağ dozları ile MN oranı arasında pozitif bir korelasyon vardır ($r=0,90$).

Çizelge 4. 2: Kullanılan Karabaş kekiği Uçucu Yağ Dozları ile MN Oranı Arasındaki Regresyon Çizelgesi



Karabaş kekiği uçucu yağ dozları ile MN oranı arasında pozitif bir korelasyon vardır ($r=0,94$).

Tablo ve çizelgelerden görüldüğü gibi Karabaş kekiği tüm dozları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 0.05 ve 0.10 değerleri önemsiz ($p>0.05$), diğer dozlar (0,15*,0,20*) ve pozitif kontrol (MMC*) önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Kimyonun tüm dozları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 0.05, 0.10, 0.15 değerleri önemsiz ($p>0.05$) diğer dozlar(0,20*) ve pozitif kontrol (MMC*) önemli bulunmuştur ($p<0.01$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki özütlerinin hücreler üzerinde önemli etkiler yapabildiğini Kolsişin ve Fitohemaglutinin örneklerinden biliyoruz. İncelenmesi amaçlanan Karabaş kekiği ve kimyon bitkilerinin genotoksik, anojenik (hücre bölünme mekanizmasını etkileyen ajan) ve klastojenik (kromozomları etkileyen ajan) etkilerinin ortaya konulması oldukça önemlidir.

Bu etkilerin ortaya çıkarılmasının; besin güvenirliliği, literatüre katkı, ileride yapılacak antimitojenik çalışmalara ve diğer çalışmalara kaynak olması, ilaç sanayisine katkı sağlaması açısından önemlidir.

Bitki ekstraktlarının kromozomlar üzerine yaptığı etki ile ilgili pek çok araştırma vardır. Bitki uçucu yağları kompleks hidrokarbonların bir karışımıdır ve genellikle terpenlerden oluşur. Bitki uçucu yağları koku ve aroma oluşturma kapasitelerine göre sınıflandırılabilir. Bitki uçucu yağları, besin ve içecek katkısı olarak, kozmetik olarak, sabun ve deterjanlara koku olarak, böcek ve sinek öldürücülere katkı olarak kullanılabilir. Pek çok ülkede bitki uçucu yağlarının kullanımı kontrol altına alınmıştır. Bu uçucu yağların akut ve kronik toksisitesi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalar genellikle antimikrobial etkileri üzerinedir. Oysa bitki özütlerinin kanserojenik, teratojenik ve mutajenik etkileri bildirilmiştir. Klasik kromozom elde edilme yöntemlerinde bile bitkisel materyal sıklıkla kullanılmaktadır. Kolsişin kar çiçeğinden (*Colchicum*) elde edilir ve iğ ipliklerini kırarak kromozomların kutuplara çekilmesini önler. Kolsişin sayesinde kromozomlar metafaz evresinde yakalanır ve incelenir. Yine insan kromozomu incelemelerinde insan kanı kullanılır. Normalde insan kan hücreleri dolaşımında bölünmez ve bölünmeyen hücrelerde kromozom incelemesi yapılamaz. *Fitohemaglutinin* fasulyeden (*Phaseolus vulgaris*) elde edilir ve bölünmeyen kan hücrelerini bir nevi kanserleştirerek bölünmeye zorlar. Bu örneklerden de görüleceği üzere bitki özütleri oldukça etkili hücre bölünme düzenleyicisi olabilirler. Bitkisel ilaçlara ve bitkilerden elde edilen hammaddelere ilginin arttığı günümüzde, özellikle bazı bitkiler kullanım alanları, miktarları ve insanlar tarafından yararlı etkilerinin onaylanması açısından diğer bitkilere oranla daha fazla öneme sahiptirler[6,13,101,102].

Eroğlu ve arkadaşları mesane kanserli doku kültürlerindeki mikronükleus üzerine propolis ve mitomisin-c'nin etkileri adlı çalışmalarında; Propolis ve mitomisin-c'nin mutagenik aktivitesinin araştırıldığı bu çalışmada propolis ve mitomisin-C'nin hücrelerdeki mikronükleus oranını arttırdığını saptamışlardır[103].

Eroğlu ve arkadaşları, *Helichrysum arenarium* türünün insan lenfosit kültürlerindeki genotoksik etkileri adlı çalışmalarında; Asteraceae familyasında yer alan *Helichrysum* Mill. cinsi genellikle “ölmez çiçek” olarak bilinir. *Helichrysum* türleri safra düzenleyici ve idrar söktürücü özelliklerinden dolayı Türkiye’de yüzyıllardan beri safra kesesi düzensizliklerinde bitkisel çay olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp. *rubicundum* (K.Koch) P.H.Davis & Kupicha, *H. arenarium* (L.) Moench subsp. *aucheri* (Boiss.) P.H.Davis & Kupicha, ve *H. arenarium* (L.) Moench subsp. *Erzincanicum* P.H.Davis & Kupicha'nın 0,01, 0,05, 0,1, 0.5 ve 1 mg/mL'lik konsantrasyonlardaki su ve metanol ekstraktları ile indüklenen insan lenfosit kültürlerindeki genotoksik etkileri değerlendirildi. *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* mitotik ve replikasyon indekslerini azaltsa da mikronükleus formasyonunu indüklediği saptamışlardır[104].

Eroğlu ve arkadaşları, Maraş otu kullanımının mikronükleus (MN) düzeyine etkisinin araştırılması adlı çalışması sonucunda; Maraş otu kullanımının; MN ve BNMN frekansını arttırdığı saptanmıştır[104]. Elde edilen sonuçlar, Khaini [105], Gudakhu [106] , kuru enfiye veya tütün-kireç karışımı [107] mava, tamol, masherî, Maraş otu [108-111] kullanıcılarında yapılan çalışma sonuçlarını destekler nitelikte olup dumansız tütün kullanımının hedef olmayan dokularda da MN frekansını arttırdığına işaret etmektedir.

Spearsman's rho korelasyon analizlerinden elde edilen sonuçlara göre MN ve BNMN düzeylerinin Maraş otu kullanım süreleri ile pozitif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda da sitogenetik markır düzeyinin dumansız tütün kullanım süresine bağlı olarak arttığı saptanmıştır[106, 107, 112].

Yıldız, endemik bir tür olan *Stachys petrokosmos* bitki ekstraktının metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan lenfositlerinde genotoksik ve anti-genotoksik etkisi adlı çalışmasında; S9mix (yaprak ekstraktının metabolik aktivatör) yokluğunda Sp (*Stachys petrokosmos*)yaprak ekstraktı tek başına KKD sayısını sadece en yüksek dozlarda

artırmış, KA'yı tüm dozlarda uyarılmış fakat MN sayısını artırmamıştır. Bununla birlikte Sp yaprak ekstraktı Mitomycin C'nin KA oluşumu üzerindeki etkisini azaltmıştır. Sp yaprak ekstraktının tek başına sadece yüksek dozlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu, yine sadece yüksek dozlarda Mitomycin C'nin sitotoksik etkisini artırdığı saptanmıştır. S9mix varlığında Sp yaprak ekstraktının genotoksik ve sitotoksik olmadığı, fakat Cyclophosphamide'in KKD ve MN oluşumu üzerindeki etkisini azaltarak anti-genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır[113].

Büyükleyla; Thymol'ün insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri adlı çalışmada; thymol'ün 25, 50, 75 ve 100 µg/ml'lik dozları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir. Thymol'ün genotoksik etkisi, mikronükleus (MN) testleriyle, sitotoksik etkisi de nükleer bölünme indeksi (NBI) nin saptanmasıyla belirlenmiştir. Bu çalışmada, thymol tüm dozlarda MN oluşumunu indüklemiştir. Thymol özellikle yüksek dozlarda ve her iki muamele süresinde NBI'ni doza bağlı bir şekilde düşürdüğünü saptanmıştır[114].

Öcal, insan periferik kan lenfositlerinde *Hypericum heterophyllum vent.* türünün mikronükleus, mitotik indeks ve replikasyon indeksi üzerine etkileri adlı çalışmada; *Hypericum* türleri binlerce yıldır Türkiye'de geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Hypericum heterophyllum*'un (koyun kıran otu) genotoksik etkilerini belirlemek için su ekstraktları ile insan lenfositleri inkübe edilmiştir. Artan ekstrakt konsantrasyonları mikronükleus oranını indüklemiştir Mikronükleus oranındaki artış, yüksek konsantrasyonlarda *Hypericum heterophyllum* türünün karsinojenik ve genotoksik olabileceğini göstermiştir. Mitotik indeks ve replikasyon indeksi değerleri de *Hypericum heterophyllum*'un artan ekstrakt konsantrasyonları ile yükselmiştir. Bu sonuçlar *Hypericum heterophyllum* türünün proliferatif özellikler ve proliferatif etkiler kadar sitotoksik özellikler ve sitotoksik etkiler gösterebileceğini işaret etmektedir. Mikronükleus ile yaş arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Ayrıca bayanların ve erkeklerin mikronükleus oranları arasında da pozitif korelasyon saptanmıştır[115].

Balıkçı, *Hypericum olympicum L.* ve *Hypericum adenotrichum Spach.* türlerinin genotoksik/antigenotoksik etkilerinin kısa süreli in vitro test yöntemleri ile araştırılması adlı çalışmada; *Hypericum adenotrichum* türünün gövde+çiçek, gövde ve çiçek

kısımları ayrı ayrı ekstraktların aynı dozlarının meydana getirdiği mikronükleus oranları değerlendirildiğinde yalnızca gövde+çiçek ekstraktının çözücü kontrole göre 250 µg/ml dozunda istatistiki olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir (p<0,05). Nükleer bölünme indeksi (NDI) sonuçlarında ise sadece gövde ekstraktının üç dozunun da NDI'yi anlamlı olarak arttırdığı sonucunu saptamıştır[116].

Kopar, S9mix varlığında ve yokluğunda *Salvia fruticosa* (Sf) bitkisinin yaprak ekstraktının insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve antijenotoksik etkileri adlı çalışmada; kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormalliği (KA), mikronükleus (MN) testleri ile araştırmıştır. Sf yaprak ekstraktının sitotoksik etkisi de mitotik indeks (MI), proliferasyon indeksi (PI) ve nükleer bölünme indeksinin (NBI) hesaplanması ile saptamıştır. Bu amaçla Sf yaprak ekstraktının farklı dozları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir. S9mix yokluğunda Sf yaprak ekstraktı KKD sayısını sadece 48 saatlik muamele süresinde artırmıştır. Tüm muamele sürelerinde ise KA sayısını arttırmış, Mitomycin C (MMC) ile beraber uygulandığında da MMC'nin etkisini sinerjik bir şekilde indüklemiş fakat en yüksek dozda KKD oluşumu üzerine MMC'nin etkisini artırmamıştır. Bu sonuçlara paralel olarak Sf yaprak ekstraktı MN sayısını da artırmış, 24 saatlik muamele süresinde MMC'nin etkisini indüklerken 48 saatlik muamele sürelerinde MMC'nin etkisini azaltmıştır. S9mix varlığında Sf yaprak ekstraktı KKD sayısını sadece muamelesiz kontrole nazaran artırmış ama Cyclophosphamide (Cyp)'nin etkisini azaltmıştır. Hâlbuki en yüksek dozda Sf yaprak ekstraktı KA sayısını ve anormal hücre yüzdesini indüklemiş fakat Cyp'nin etkisini artırmamıştır. Sf yaprak ekstraktı tek başına MN oluşumunu artırırken Cyp ile beraber kullanıldığında MN oluşumunu indüklememiştir. S9mix yokluğunda Sf yaprak ekstraktı tek başına MI'yi düşürerek sitotoksik etki yapmış fakat PI ve NBI'ni düşürmemiştir. S9mix varlığında ise sitotoksik olmadığı, yüksek dozlarda ise Cyp'nin sitotoksik etkisini artırdığı sonucunu saptamıştır[117].

Kocaman, Acetamiprid ve alpha-cypermethrin pestisidlerinin tek başına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman insan periferik lenfositlerindeki *in vitro* genotoksik etkileri adlı çalışmada; Hücreler, 25, 30, 35, 40 µg/ml Acm'le; 5, 10, 15, 20 µg/ml A-cyp'le;

tek başlarına ve bu konsantrasyonların yarısı kadar konsantrasyonlarda bir araya getirilerek karışım (Acm+A-cyp) halinde 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Bu çalışmada, Acm'in bütün süre ve dozlarda KKD'ni, KA'ni, yüksek üç dozda MN oluşumunu istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığı; mitotik indeksi (MI) ve nükleus bölünme indeksini (NBI) her iki süre ve tüm dozlarda, proliferasyon indeksini (PI) 24 saatlik muamele için 35, 40 µg/ml'de, 48 saatlik muamele için 40 µg/ml'de önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır. A-cyp'nin bütün süre ve konsantrasyonlarda KKD'yi, KA'yı ve düşük iki konsantrasyonda (15 ve 20 µg/ml A-cyp dozlarında yeterli iki nükleuslu hücre bulunamamıştır) ise MN oluşumunu önemli derecede artırdığı; tüm konsantrasyonlarda MI'i, NBI'ni ve yüksek üç konsantrasyonda PI'ni önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır. Acm+A-cyp karışım halinin ise insanlar için ya insektisidlerin tek başlarına muamele edilen kadar ya da daha fazla genotoksik olduğu sonucunu saptamıştır[118].

Ülkemizde geleneksel halk tıbbında kullanılan kimyon ve karabaş kekiği ekstraktlarının karsinojen ve genotoksik özellikler gösterdiği söylenebilir. Kimyon ve karabaş kekiği ekstraktları genotoksik etkiler gösterse de bu etkiler yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkmaktadır. Diğer taraftan kimyon ve karabaş kekiği uçucu yağlarının yapısında birçok kimyasal bulunmaktadır. Türün gösterdiği karsinojenik ve genotoksik etkilerin hangi kimyasal bileşiklerden ileri geldiğinin araştırılması da önemli bir konudur. Bir türün yapısındaki kimyasalların izole edilerek tek tek sitogenetik testlere tabi tutulması, türün sitogenetik etkilerinin içeriğindeki hangi maddeden veya maddelerden kaynaklandığına dair bilgiler verebilir. Bu özellikler düşünüldüğünde insan sağlığında kullanımlarına dikkat edilmeli, bu konuda araştırma yapılmalı, bilinçsizce kullanımları önlenmeli, kontrollü bir şekilde kullanılması gerekmektedir.

Bu çalışmada kimyon ve karabaş kekiği uçucu yağlarının dört farklı dozları (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 µl/ml) insan lenfosit hücre kültüründe çalışılmıştır.

Karabaş kekiği (*T. Spicata*) tüm dozları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 0.05 ve 0.10 değerleri önemsiz ($p>0.05$) diğer dozlar ve pozitif kontrol önemli bulunmuştur ($p<0.01$)*.

Kimyonun tüm dozları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 0.05, 0.10, 0.15 değerleri önemsiz ($p>0.05$) diğer dozlar ve pozitif kontrol önemli bulunmuştur ($p<0.01$)*

1. Karabaş kekiğinin (*T. Spicata*) farklı konsantrasyonları ile MN oranı arasında pozitif bir korelasyon ($r= 0.94$) olduğu aynı şekilde kimyonun (*C. cuminum*) farklı konsantrasyonları ile Mn oranı arasında da pozitif bir korelasyon ($r= 0.90$) olduğu,
2. Negatif kontrolde 1.851 olan NDI değerinin karabaş kekiğinin en üst dozunda 1.555'e düştüğü aynı şekilde kimyonun en üst dozunda 1.520'ye düştüğü dolayısıyla bu iki bitkinin uygulanan dozlarda hücre bölünmesini baskıladığı,
3. Bu iki bitkinin negatif kontrolle karşılaştırıldığında doza bağlı olarak MN oluşumunu, apoptoz ve nekrozu arttırdığı; saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Faydaoğlu, E. Sürücüoğlu M. S. 2011., “Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi”. Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi, 11 (1): 52 – 67.
- [2] Çelik, E. ve Çelik, G.Y., 2007. “Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri”. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 5: 1-6.
- [3] Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A. and Marcos, R. 1995. “The Suitability of the Micronucleus Assay in Human Lymphocytes as a New Biomarker of Excision Repair”. Mutat. Res. , 342: 43-59.
- [4] Topaktaş, M. ve Rencüzoğulları, E., 2010. Sitogenetik. Genişletilmiş ve Düzeltilmiş 2. Bskı, Nobel Yayınları, 176s.
- [5] Dellarco, V. L., Mavournın, K.H. and Tıce, R.R. , 1985. Aneuploidy and Health Risk Assessment: Current Status and Future Directions. Environ. Mutagen. , 7: 405-424.
- [6] Akgül A., Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Ankara: Ankara Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 1993: (15): 111-112.
- [7] Ceylan A., Tıbbi Bitkiler I. İzmir: Tarla Bitkileri Bölümü, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın, 1995: 312.
- [8] Baytop A., Farmasötik Botanik. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dilek Matbaası Yayınları. 1983: 3158.
- [9] Pamuk A., Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi. İstanbul: Pamuk Yayıncılık ve Matbaacılık, 1998: (1): 656.
- [10] Aydın, S.Y., Öztürk, Y. ve K. H. C. Baser. 1997. Kekik (*Origanum onites*) uçucu yağının kardiyovasküler sistem üzerine etkisi. XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. 22-24 Mayıs 1996 Ankara. 333-338.
- [11] Davis, P. H., 1982. *Labiatae*. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Cilt No.7. University Press Edinburg.

- [12] Tanker, M., ve İlisulu, F., 1984. Türkiye’de kekik olarak kullanılan bitkilerden *Thymbra spicata* var. *spicata*. Doğa Bilim Dergisi. 1: 8. 104-107.
- [13] Baytop, T., 1984. “Türkiye’de bitkiler ile tedavi”. İstanbul U. Yayınları. No: 3255. Eczacılık Fakültesi. No. 40. İstanbul.
- [14] Tüzün, H., 1986. “Türkiye’de tıbbi bitkilerin yetiştirme imkânları ve faydaları”. VI. Bitkisel ilaç Hammaddeleri Toplantısı. 16-19 Mayıs 1986. Ankara.
- [15] Kıvanç, M., ve A. Akgül. 1988. *Escherchia coli*’nin değişik sıcaklıklarda çoğalması üzerine farklı dozlardaki karabaş kekiğin (*Thymbra spicata* L.) engelleyici etkisi. Doğa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi. 12: 3, 248-252.
- [16] Tansı, S., 1991. “Karabaş kekik (*Thymbra spicata* L.)’de drog verimi ile ekolojik, ontogenetik ve morfogenetik varyabilitenin araştırılması”. Çukurova Üni. Fen Bilimleri Ens. Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı. Doktora Tezi. 153 s.
- [17] Fenech, M., Crott, W.J, “Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay”, *Mutat. Res*, 504: 131-136 (2002).
- [18] Fenech, M., “The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry”, *Health Phys*, 98(2): 234-243 (2010).
- [19] Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E K., Fenech, M., ”Buccal micronucleus cytome assay”, *Nat. Protoc.* 4(6) :825-837 (2009).
- [20] Wu, J., Lyons, GH., Graham, RD., Fenech, M., “The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay”, *Mutat. Res*, 24(3) :225-232 (2009).
- [21] Fenech, M., “The in micronucleus technique”, *Mutat Res*; 455: 81-95, (2000).
- [22] Savage J.R.K. “Update on target theory as applied to chromosomal aberrations”. *Env Mol Mutagen*; 22: 198-207 (1993).

- [23] Evans, H.J., Cytogenet. : Overview. Prog Clin Biol Res; 340B: 301-323 (1990).
- [24] Guttenbach, M., Schmid, M., Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. Exp Cell Res; 211: 127-132 (1994).
- [25] Natarajan, A.T., Obe, G., Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays, in: J.A.Heddle (Ed.) , Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology, Academic Press, New York; pp. 171-213 (1982).
- [26] Schmid, W., The micronucleus test. Mutat. Res; 31: 9-15 (1975).
- [27] Heddle, JA. A., rapid in vivo test for chromosome damage. Mutat. Res; 18: 187-192 (1973).
- [28] Bolognesi, C., Filiberti, R., Neri, M., Perrone, E., Landini, E., Canessa, P.A., Simonassi, C., Cerrano, P.G., Mutti, L., Puntoni, R., "High Frequency of Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes as Index of Susceptibility to Plevral Malignant Mesothelioma", Cancer Res; 62: 5418-5419 (2002).
- [29] Rothfub, A., Schütz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W, "Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families", Cancer Res; 60: 390-394 (2000).
- [30] Smimizu, N., Shimura, T., Tanaka, T., " Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei", Mutat. Res, 448: 81-90 (2000) .
- [31] Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Volders, M.K., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Tia, C., Giorgio, D.M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P. , Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarfi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A., "Human Micronucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring

Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei” , Environmental and Molecular Mutagenesis 37: 31-45 (2001).

[32] Elhajouji, A., Tibaldi, F., Volders, K.M., ”Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human Lymphocytes” , Mutagenesis, 12:133-140 (1997).

[33] Lindholm, C., Norppa, H., Hayashi, M., Sorsa, M, “Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures” , Mutat. Res; 260: 369- 375(1991).

[34] Tawn, E.J., Whitehouse, C. A., “Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding” , Mutat. Res, 490: 171-177 (2001).

[35] Umegaki, K., Fenech, M., “Cytokinesis-block micronucleus assay in WILZ-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils” , Mutagenesis, 15: 261-269 (2000).

[36] Seoane, A.I., Dulout, F.N., “Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay” , Mutat. Res; 490: 99- 106(2001).

[37] Toksi, G., Stankovi, M., Radovanovi, S., Dragi, M., “The use of cytochalasin block (CB) micronucleus test to identify clastogenic and antiproliferative action” , Archive of Oncology, 9: 47-48 (2001).

[38] Maluf, S.W., Erdtmann, B., “Genomic instability in Down Syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis” , Cancer Genetics and Cytogenetics, 124: 71-75 (2001)

[39] Fenech, M., Morley AA. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. Cytobios; 43: 233-246 (1985).

[40] Fenech, M., Morley AA. Measurement of micronucleus method in human lymphocytes. Mutat. Res; 147: 29-36 (1985).

- [41] Stich, H. F., Stich, W., Parida, B. B., “Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers”, *Cancer Lett*, 17: 125-34 (1982).
- [42] Rosin, M. P. , Gilbert, A. M. , “Modulation of genotoxic effects in humans: Mutation and the environment”, Part E, New York, Wiley-Liss, 51-9 (1990).
- [43] Stich, H. F., Rosin. M. P., “Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and intervention”, *Cancer Lett*, 22: 241- 53(1984).
- [44] Lehucker- Michel, M. P., DiGiorgio, C., Amara Lehucke –Michel, M. P., Amara, Y. A., Laget, M., “The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: Effects of smoking”, *Mutagenesis*, 10: 329- 32(1995).
- [45] Moore, L. E., Warner, M. L., Smith, A. H. , Kalman, D., Smith, M. T., “Use of fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells”, *Envir Mol Mut*; 27: 176- 84(1996).
- [46] Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C., “Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis- blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization”, *Mutagenesis*, 8:519-25 (1993).
- [47] Meyne, J., Littlefield, L. G., Moyzis, R. K., “Labelling of human centromeres using an alphoid DNA consensus sequence: Application to the scoring of chromosome aberrations”, *Mutat. Res*; 226: 75- 9(1989).
- [48] Richard, F., Muleris, M., Dutrillaux, B., “The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females”, *Mutation Research*, 316: 1- 7(1994).
- [49] Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., Heddle, J. A., “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 Research*, 239: 29- 80(1990).
- [50] Schmid, W., “The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A., ed. *Chemical Mutagens, principles and methods for their detection*”, Vol.4, New York, Plenum pres, pp. 31-53 (1976).

- [51] Cruz, A. D., McArthur, A. G., Silva, C. C., Curado, M. P., Glickman, B. W., “Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil radiological accident)”, . *Mutat. Res*, 313: 57- 68 (1994).
- [52] Yoshida, K., Yamazaki, H., Ozeki, S., Inoue, T., Yoshioka, Y., Yoneda, M., et al. , “Mitochondrial genotype and radiationinduced mikronucleus formation in human osteosarcoma cells in vitro”, *Oncol Rep*, 3:615-9 (2001).
- [53] Oliveira, N. G., Castro, M., Rodrigues, A. S., Goncalves, I. C., Cassapo, R., Fernandes, A. P., et al., “Evaluation of the genotoxic effects of the boron neutron capture reaction in human melanoma cells using the cytokinesis block micronucleus assay”. *Mutagenesis*, 16: 369- 75 (2001).
- [54] Fucic, A., Garaj-Vrhovac, V., Skara, M., Dimitrovic, B., “X- Rays, microwaves and vinyl chloride monomer; Their clastogenic and aneugenic activity, using the micronucleus assay on human lymphocytes”, *Mutat. Res*, 282: 265- 71 (1992).
- [55] Jagetia, G. C., Jacob P. S., “The influence of vinblastine treatment on the formation of radiation-induced micronuclei in Mouse bone marrow”, *Hereditas*, 120: 51- 9 (1994).
- [56] Çora, T., Demirel, S., Acar, A., Erkul, İ., “Yenidoğan periferel kan lenfosit kültürlerinde fototerapinin uyardığı mikronukleuslar”, *S Ü Tıp Fak Derg*, 8: 345- 51 (1992).
- [57] Acar, A., Durakbaşı, H.G. , Paydak, F. , “Alüminyum sülfatın insan periferel kan lenfosit kültürlerinde mikronukleus uyarımı üzerine etkileri”, *S Ü Tıp Fak Derg*, 11:139- 44 (1995).
- [58] Fenech, M., “The in vitro micronucleus technique”, *Mutat. Res*, 455: 81- 95 (2000).
- [59] Surralles, J., Carbonell, E., Marcos, R., Degrassi, F., Antoccia, A., Tanzarella, C. A., “Collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes”, *Mutagenesis*, 7 (6): 407-410 (1992).
- [60] Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardeme, M., et al., “Report from the in vitro micronucleus assay working group”, *Environ Mol Mutagen*, 35: 167- 172 (2000).

- [61] Wakata, A., Sasaki, M. S., “Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations”, *Mutat. Res*, 190: 51- 57(1987).
- [62] Prosser, J. S., Moquet, J. E., Lloyd, D. C., Edwards, A. A., “Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes”, *Mutat. Res*, 199: 37-45 (1988).
- [63] Lindholm, C., Norpa, H., Hayashi, M., Sorsa, M., “Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin-B in human lymphocyte cultures”, *Mutat. Res.*, 260: 369-375 (1991).
- [64] Minissi, S., Gustavino, B., Degrassi, F., Tanzarella, C., Rizzoni, M., “Effect of cytochalasin-B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes”, *Mutagenesis*, 14: 43- 49 (1999).
- [65] Fenech, M., “The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method”, *Mutat. Res*, 392: 11- 18 (1997).
- [66] Kalweit, S., Utesch, D., Hude W.Vonder, Madle, S., “Chemically induced micronucleus formation in V79 cells-comparison of three different test procedures”, *Mutat. Res*, 439(2): 183-190 (1999).
- [67] Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M., Miura, K. F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K., Sofuni, T., “Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU)”, *Mutagenesis*, 14(6) : 569- 580 (1999).
- [68] Fenech, M., “Mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not scored specifically in binucleated cells or cells that have completed one nuclear division” , *Mutagenesis*, 15 (4) : 329- 336 (2000).
- [69] Vig, B. K., Swearngin, S. E., “Sequence of centromere separation: kinetochore formation in induced laggards and micronuclei”, *Mutagenesis*, 1: 464- 465 (1986).
- [70] Earnshaw, W. C., Migeon, B. R., “Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable dicentric chromosome”, *Chromosoma*, 92: 290- 296 (1985).

[71] Farooqi, Z., Darroudi, F., Natarajan, A. T., "Use of fluorescence in situ hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes" , Mutagenesis, 8: 329- 334 (1993).

[72] Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. G., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T. , Norppa, H. , Huker, D. e. g. , tice, r. , waters, m. d. , aittio, a. 2000. IARC Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. Mutat. Res., 463: 111- 172.

[73] Kirsch- Volders, M. 1997. Towards a Validation of The Micronucleus Test. Mutat. Res, 392: 1- 4.

[74] Moyler, D. A., 1993 *Extraction Of Essential Oils With Carbon Dioxide*. Flavour and Fragrance J. Vol. 8, 235- 247.

[75] Linskens, H. F., Jackson, J. F., 1997b *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 12: Essential Oils and waxes, Springer, Germany.

[76] Yamani, Y., Khajeh, M., Ghasemi, E., Mirza, M., Javidnia, K., 2007. "Comparison Of Essential Oil Compositions Of *Salvia Mirzayanii* Obtained By Supercritical Carbon dioxide Extraction And Hydrodistillation Methods". Food Chemistry, 108, 341- 346.

[77] Kaufmann, B., Christen, P., 2002." *Recent Extraction Techniques For Natural Products: Microwave- Assisted Extraction And Pressurised Solvent Extraction*". Phytochemical Analysis, 13, 105-113.

[78] Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M. and Mesnard, F., 2007. "Microwave- Assisted Extraction Of The Main Phenolic Compounds In Flaxseed". Phytochemical Analysis, 18, 275- 282.

[79] Vas, G., Vekey, K., 2004. "Solid-Phase Microextraction: A powerful Sample Preparation Tool Prior To Mass Spectrometric Analysis". J. of Mass Spectrometry, 39: 233- 254.

[80] Anonymous, 2012. Extraction of The Essential Oil of Lavender.

http://www.routes-lavande.com/about_lavender/stills.html (16.05.2012)

[81] Searle, J., Kerr, J. F., Bishop, C. J.” Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*”. 1982; 17: 229- 259.

[82] Thompson, E. B., “ Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol*”. 1994; 8: 665-73.

[83] Altunkaynak, B. Z., Özbek, E., “Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?” *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 2008: 6 (2) : 93 – 104.

[84] Tomatır, A. G., 2003: “Apoptoz; programlı hücre ölümü”. *T. Klin. J. Med. Sci. , 23*: 499- 508.

[85] Saga, K., Studies on the Pungency of Red Pepper Fruit; the Effect of Mineral Nutritiomn, Especially Phosporus Nutrition. *Bulletin of the Faculty of Agriculture. Hirosaki Üniversitesi, HORTCD. Abs. 730308706. No: 18; s. 96- 106. (1972).*

[86] Palacio, J. J. R., “Spectrophotometric Determination of *Capsaicin*”. *Journal of the Assoication of Officinal Analytical Chemists*, 60: s. 970-972.(1977)

[87] Searle, J., Kerr, J. F., Bishop, C. J., “Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance”. *Pathol Annu*. 1982; 17: 229-259.

[88] Thompson, E. B., ” Apoptosis and steroid hormones”. *Mol Endocrinol*. 1994; 8: 665-73.

[89] Erdoğan, B. B., 2003: “Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fasfasl bağımlı apoptozis”. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174.

[90] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Aseton> (Erişim tarihi: Mayıs 2014 22:35).

[91] Carter, S. B. “Effects of cytochalasins on mammalian cells”, *Nature*, 213: 261-264 (1967).

- [92] Budak Diler, S. , “Ethil metansulfonat (EMS) ve mitomisin C (MMC)’ye insan kromozomlarının hassasiyeti”, . Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, (2006).
- [93] Ulupınar, M. , Alaş, A. , "Balık Sitogenetiği ve Laboratuar Teknikleri Kitabı" I Baskı, s. 10 (2002).
- [94] Lazutka JR, Mierauskiene J, Slapsyte G, Dedonyte V. Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.) , peppermint (*Mentha x piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology* 39(5) : 485- 492 (2001) .
- [95] Umegaki, K. , İkegami, S. , Inoue, K. , et al. , “Beta – carotene prevents X – ray induction of micronuclei in human lymphocytes, *Am Clinl Nutr*, 59: 409- 412 (1994).
- [96] Balasem, A. N. and Ali, A. S. , “Establishment of dose-response relationships between doses of CS-317 7- rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood”, *Mutat Res*, 259: 133-138 (1991).
- [97] Erciyas, A., “Formik asit’in insan lenfosit kültüründe mikronükleus sıklığı üzerine etkilerinin araştırılması” Yüksek lisans tezi,
- [98] Uzun, S. Sodyum Hipoklorite Maruz Kalmış Kişilerin Lenfositlerindeki Mikronükleus Sıklığının Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, (2007).
- [99] Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M., The Relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(3) , 19-24 (1991).
- [100] Altunkaynak, B. Z., Özbek, E., Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 2008: 6 (2) : 93 – 104
- [101] Greenleaf, W.H., *Breeding Vegetable Crops* AVI Publishing Company, INC. Westport, Connecticut, Vegetable Crops Department, University of Florida, Gainesville/Florida. S.67-127.(1986).

[102] Thomas, B.V., Schreiber, A.A., Weisskopf, P.C. : Simple Method for Quantitation of Capsaicinoids in Peppers Using Capillary Gas Chromatography, J Agric Food Chem., 46, 2655-2663 (1998)

[103] Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (E.Ü.Journal of Health Sciences) 13(2) 15-20, 2004.

[104] Halil Erhan Eroğlu^{1,*}, Ergin Hamzaoğlu¹, Ahmet Aksoy², Umit Budak¹, Sevil Albayrak² ¹Department of Biology, Faculty of Science and Arts, Bozok University, 66200, Yozgat – Turkey

² Department of Biology, Faculty of Science and Arts, Erciyes University, 38039, Kayseri – Turkey Received: 11.06.2009

[105] Stich, H.F., Curtis, J. R., Parida, B. B. 1982. Application of the Micronucleus Test to

Exfoliated Cells of High Cancer Risk Groups: Tobacco Chewers. International Journal of Cancer; 30:553-559.

[106] Das, R. K., Dash, B.C., 1992. Genotoxicity of ‘Gudakhu’, a Tobacco Preparation. II. In Habitual Users. Food and Chemical Toxicology, 30:1045-1049.

[107] Trivedi, A. H., Dave, B.J., Adhvaryu, S.G. 1993. Monitoring of Smokeless Tobacco Consumers Using Cytogenetic Endpoints. Anticancer Res, 13:2245-50.

[108] Adhvaryu, S. G., Dave, B.J., Trivedi, A.H. 1991. “Cytogenetic Surveillance of Tobacco-Area Nut (Mava) Chewers, Including Patients with Oral Cancers andPremalignant Conditions”. Mutat. Res, 261:41-49.

[109] Kayal, J.J., Trivedi, A.H., Dave, B.J., Nair, J., Nair, U.J., Bhide, S.V.,Goswami, U.C., Adhvaryu, S.G.1993. Incidence of Micronuclei in OralMucosa of Users of Tobacco Products Singly or in Various Combinations. Mutagenesis, 8:31-33.

[110] Özkul, Y., Dönmez, H. Erenmemişoğlu, A., Demirtaş,H., İmamoglu, N.,1997. Induction of Micronuclei by Smokeless Tobacco on Buccal Mucosa Cells ofHabitual Users. Mutagenesis, 12:285-287.

[111] Burgaz, S., Çok, I., Uysal, B.T., Karakaya, A.E. 2000. Monitoring of Genotoxic Damage in Smokeless Tobacco (Maras Powder) Consumers Using Micronucleated Oral Cells. *Biomarkers*, 5: 219-224.

[112] Dave, B.J., Trivedi, A.H., Adhvaryu, S.G., 1991. Cytogenetic Studies Reveal Increased

Genomic Damage Among “Pan Masala” Consumers. *Mutagenesis* ; 6:159-63.

[113] Yıldız, A. M., Endemik Bir Tür Olan *Stachys Petrokosmos* Bitki Ekstraktının Metabolik Aktivatör Varlığında ve Yokluğunda İnsan Lenfositlerinde Genotoksik ve Anti-Genotoksik Etkisi

[114] Büyükleyla, M., ‘Thymol’ün insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri’. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2007 .

[115] Öcal, A. , ‘İnsan periferik kan lenfositlerinde *hypericum heterophyllum* vent. türünün mikronükleus, mitotik indeks ve replikasyon indeksi üzerine etkileri’ . Yüksek Lisans Tezi, Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Bilim Dalı, Yozgat, 2012.

[116] Balıkcı, N. , ‘*Hypericum olympicum* L. ve *Hypericum adenotrichum* Spach. türlerinin genotoksik/antigenotoksik etkilerinin kısa süreli in vitro test yöntemleri ile araştırılması’. (Yüksek Lisans Tezi), Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa, (2013).

[117] Kopar, N., ‘*Salvia fruticosa* bitki ekstraktının metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan lenfositlerinde genotoksik ve anti-genotoksik etkisi ‘. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, (2010) .

[118] Yavuz Kocaman, A., “Acetamiprid ve alpha-cypermethrin pestisidlerinin tek başına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman insan periferik lenfositlerindeki *in vitro* genotoksik etkileri”, Doktora tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı**, Adana, (2007)

7. ÖZGEÇMİŞ

Dilek IRMAK; 1983 yılında Aydın merkezde doğdu. İlköğrenimini Aydın ili Yenipazar ilçesi Merkez İlköğretim okulunda ortaokul ve lise öğrenimini Yenipazar Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında Kafkas Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu Laboratuvar Bölümünden, 2012 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2012 Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji AD. (Moleküler Biyoloji) dalında Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. Halen Yüksek Lisansına devam etmektedir.