

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

**KİMYON (*Cuminum cyminum*) VE KARABAŞ KEKİĞİ (*Thymbra spicata*) BİTKİ
UÇUCU YAĞLARININ SCE (KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ) ÜZERİNE
ETKİLERİNİ İNSAN LENFOSİT KROMOZOMLARINDA İNCELENMESİ**

HANİFE YILDIRIM
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 SCE (KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ) ÜZERİNE
ETKİLERİNİ İNSAN LENFOSİT KROMOZOMLARINDA İNCELENMESİ**

**HANİFE YILDIRIM
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. SÜLEYMAN GÜL**

**HAZİRAN-2014
KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hanife YILDIRIM 'ın Doç. Dr. Süleyman GÜL 'ün danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "**Kimyon (*Cuminum cyminum*) Ve Karabaş Kekiği (*Thymbra spicata*) Bitki Uçucu Yağlarının SCE (Kardeş Kromatid Değişimi) Üzerine Etkilerini İnsan Lenfosit Kromozomlarında İncelenmesi**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy/..../20 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

.....
Pınar Aksoy
.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/....../20 gün ve/
..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

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

Bu tez çalışmasının her aşamasında bana bilgi ve deneyimlerinden yararlanma imkanı sunan rehberlik eden, umut ve güç veren değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Süleyman GÜL' e ve maddi-manevi tüm desteğiyle bu uzun ve yorucu çalışma sürecinde sürekli yol gösteren ve her daim yanımda olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU 'ya şükranlarımı sunmak benim için onurlu bir görevdir.

Ayrıca laboratuvar imkanlarını sunan Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Üretimi Anabilim Dalı'na ve çalışma arkadaşlarım Yağmur YILDIZ ve Dilek IRMAK' a teşekkürlerimi sunarım. Ve varlıklarıyla beni her an mutlu eden yüreği zengin aileme sonsuz minnettarlığımı dile getiririm.

KARS/2014

Hanife YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER, GRAFİKLER VE TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Cuminum cyminum</i> (Kimyon)	3
2.2. <i>Thymbra spicata</i> (Karabaş Kekiği)	4
2.3. Distilasyon.....	5
2.4. Distilasyon Yöntemleri.....	6
2.4.1. Su Distilasyonu	6
2.4.2. Buhar Distilasyonu	8
2.4.3. Su-Buhar Distilasyonu	9
2.4.4. Hidrodifüzyon.....	9
2.4.5. Mikro Distilasyon	10
2.4.6. Mikrodalga Destekli Distilasyon	10
2.4.7. Eşzamanlı Distilasyon-Ekstraksiyon	10
2.4.8. Kuru Distilasyon	11
2.4.9. Fraksiyonlu Distilasyon	11
2.5. Distilasyon Sonrası İşlemler.....	11
2.5.1. Ayırma	11
2.5.2. Süzme.....	12
2.5.3. Kurutma	12
2.6. Kromozom.....	12

2.6.1. Kromozomların Özel Yapıları	13
2.7. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)	14
2.7.1. KKD'nin Tarihçesi	14
2.7.2. KKD'nin Oluş Modelleri	15
2.8. Genotoksisite	21
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Kullanılan Test Maddeleri ve Test Maddelerinin Çözeltilerinin Hazırlanması ...	23
3.1.1. <i>Cuminum cyminum</i> (Kimyon).....	23
3.1.2. <i>Thymbra spicata</i> (Karabaş Kekiği).....	24
3.1.3. Aseton	25
3.1.4. Kromozom Medyumu (Besi Yeri).....	25
3.1.5. Kolşisin	25
3.1.6. Hipotonik Eriyik	26
3.1.7. Fiksatif	26
3.1.8. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	26
3.1.9. Sorenson Tamponu	26
3.1.10. Standart Saline Citrate (SSC) Çözeltisi	26
3.1.11. Fosfat Tampon Çözeltisi.....	27
3.1.12. Giemsa	27
3.1.13. Entellan	27
3.1.14. Mitomisin-C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503).....	27
3.2. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları	28
3.2.1. Hassas Terazî	28
3.2.2. Santrifüj	28
3.2.3. Mikroskop.....	28
3.2.4. Etüv	29

3.2.5. Deney Ekipmanları	29
3.2.6. Sarf Malzemeler.....	29
3.3. Ekstraksiyon	30
3.4. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	32
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	32
3.4.2. Preparatların Boyanması.....	33
3.4.3. Mikroskopik İnceleme	34
3.4.4. KKD ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması	34
4. BULGULAR.....	39
4.1. Kimyon (<i>C. cyminum</i>) ve Karabaş Kekik (<i>T. spicata</i>) Bitki Uçucu Yağlarının Aseton Karışımı Muamele Edilen İnsan Periferik Lenfositlerinde KKD Üzerine Etkisi	39
4.2. Karabaş Kekik (<i>T. spicata</i>) Uçucu Yağının Aseton Karışımı Muamele Edilen İnsan Periferik Lenfositlerinde KKD Üzerine Etkisi.....	45
4.3. Kimyon (<i>C. cyminum</i>) Uçucu Yağının Aseton Karışımı Muamele Edilen İnsan Periferik Lenfositlerinde KKD Üzerine Etkisi	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
6. KAYNAKLAR	57
7. ÖZGEÇMİŞ.....	67

ÖZET

Bu çalışmanın amacı *T.spicata* ve *C.cyminum* bitki uçucu yağlarının insan periferel lenfosit kültüründe *in vitro* olarak araştırılmasıdır. İnsan kan lenfosit hücreleri, *T.spicata* ve *C. cyminum* bitki uçucu yağlarının 0.05µl/ml, 0.10µl/ml, 0.15µl/ml ve 0.20µl/ml 'lik dozları ile 24 saat etkileşime bırakılmıştır. Bitki ekstraktları uygulanmış deneme grupları negatif kontrol ve pozitif kontrol olarak kullanılmış olan Mitomisin-C (MMC) ile kıyaslandığında, uygulanan ekstrakt dozlarının kardeş kromatid değişim oranında artışa yol açtığı belirlenmiştir. Karabaş Kekik ($r = -0.94$) ve Kimyon ($r = -0.95$) uçucu yağları, çözücü ve kontrolle karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda replikasyon indeksini düşürmüştür ve replikasyon indeksiyle doz arasında negatif bir korelasyon vardır.

Anahtar Kelimeler: *T.spicata*, *C. cyminum*, lenfosit kültürü, kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi.

ABSTRACT

The aim of this study was to research the essential oils of *T.spicata* and *C. cyminum* on Sister Chromatid Exchange rate in human periferal lymphocyte culture *in vitro*. Human peripheral blood lymphocyte cells were treated with 0.05µl/ml, 0.10µl/ml, 0.15µl/ml and 0.20µl/ml concentrations of essential oils of *T.spicata* and *C. cyminum* for 24 hours. A significant increase was observed for induction of Sister Chromatid Exchange rate in all treatments that are compared with the negative control and Mitomycin-C (MMC) which was used as positive control. Essential oils of *T. spicata* ($r=-0.94$) and *C. cyminum* ($r=-0.95$) decreased the replication index (RI) in all the concentrations when compared with control and solvent control and there was a negative correlation between dose and replication index.

Key words: *T.spicata*, *C. cyminum*, lymphocyte culture, sister kromatid exchange, replication index.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	: Mikrolitre
μ g	: Mikrogram
DMSO	: Dimetil sülfoksit
Rpm	: Devir Sayısı
Mm	: Milimetre
Cm	: Santimetre
Ml	: Mililitre
KCl	: Potasyumklorür
BrdU	: 5'-Bromo-2'-deoxyuridine
μ g	: Mikrogram
μ l	: Mikrolitre
SCE	: Sister Chromatid Exchange
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
UV	: Ultra Viyole
SSC	: Standart Saline Citrate
NaCl	: Sodyumklorür
Lt	: Litre
mg	: Miligram
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
gr	: Gram
dk	: Dakika

SCD	: Sister Chromatid Differentiation
W	: Wolt
nm	: Nanometre
pH	: Power of Hydrogen
RI	: Replikasyon Indeksi
PI	: Proliferasyon Indeksi
M1	: 1. Mitozdaki hücre sayısı
M2	: 2. Mitozdaki hücre sayısı
M3	: 3. Mitozdaki hücre sayısı
dT	: Deoxytimidin
dU	: Deoxyuridin
Br	: Brom

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Clevenger apareyi	7
Şekil 2.2. Genel KKD oluş mekanizması: Tetraploid hücrelerde (4n) çift KKD oluşmaktadır	16
Şekil 2.3. Replikasyon Bypass Modeli'ne göre KKD oluş mekanizması: tek KKD meydana gelen tetraploid hücreler (4n)	19
Şekil 2.4. Holiday modeline göre KKD oluş mekanizması	20
Şekil 3.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi	35
Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdU) ve Deoxyuridin (dU) 'in kimyasal yapıları.	36
Şekil 3.3. BrdU'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması	38
Resim 4.1. KKD'nn görüldüğü M2 evresindeki metafaz plağı.	41
Resim 4.2. M1 evresindeki metafaz plağı	47
Resim 4.3. M2 evresindeki metafaz plağı.	47
Resim 4.4. M3 evresindeki metafaz plağı.	48

ÇİZELGELER, GRAFİKLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Farklı dozlarda Kimyon ve Karabaş Kekik Uçucu Yağlarının Aseton karışımı ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı	40
Çizelge 4.1. Farklı dozlarda Kimyon Ekstraktlarının Aseton karışımı ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı.	42
Grafik 4.1. Kimyon doz ve SCE arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0.94$). ...	43
Çizelge 4.2. Farklı dozlarda Kekik Ekstraktlarının Aseton karışımı ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı. .	44
Grafik 4.2. Kekik doz ve SCE arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0.99$).	45
Tablo 4.2. Kontrol ve Karabaş Kekik Uçucu Yağ Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi (%).	46
Çizelge 4.3. Kontrol ve Kekik Ekstrakt Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeks Oranları.	48
Grafik 4.3. Kekik doz ve RI arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r=-0.94$).	49
Tablo 4.3. Kontrol ve Kimyon Ekstrakt Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi (%).	50
Çizelge 4.4. Kontrol ve Kimyon Ekstrakt Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeks Oranları.	51
Grafik 4.4. Kimyon doz ve RI arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r=-0.95$). ..	52

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun varoluşundan beri tabiatta bulunan çoğu bitkiler hastalıkların tedavisinde iyileştirici rol üstlenmiştir. Aynı zamanda, insanlar bazı bitkileri yiyecek, çay ve baharat olarak da kullanmışlardır. Nesiller boyu deneme-yanılma yolu ile bazı bitkilerin hastalıkları iyileştirmede faydalı olduğu tıbbi yönden kanıtlanmasına rağmen ve aynı zamanda bazılarının da insan sağlığına zarar verici etkilere sahip olabileceği öğrenilmiştir [1].

Tıbbi bitkilerden biri olan *Thymbra spicata* (Karabaş Kekiği) türü, Akdeniz’de yaygın olarak yetişen, yaklaşık 50 cm boyunda, tüylü, mor çiçekli, çalı görünümünde yaygın ve bilinen bir bitkidir. *Thymbra spicata* Isparta ve yöresinde karabaş otu ve Orta Doğu ülkelerinde zahter adıyla tanınır. Çayı veya yağı mide ağrılarında analjezik etki için kullanılmakta olup ayrıca antiseptik, antiparaziter ve kan dolaşımına olan etkilerinden yararlanılmıştır. *Thymbra spicata* yağının safra asitlerini artırıcı etkisi olduğu da bilinmektedir. Uçucu ve kokulu bileşiklere sahip olan bu bitkinin en önemli uçucu yağ bileşikleri thymol ve karvakrol’dur [2-4].

Tıbbi bitki olarak kullanılan bir diğer bitki ise; Kimyon (*Cuminum cyminum*), maydanozgiller (Apiaceae) familyasından Mayıs-Haziran ayları arasında, 40-60 cm boyunda, beyaz ve pembemsi renkli çiçekleri açan, tek yıllık otsu bir bitki türüdür. Anavatanı Orta Doğu ve Doğu Akdeniz’dir. Gövdeleri üstte dallanır ve diktir. Yaprakları tüysüz ve iplik gibi parçalıdır. Çiçekler 3-5 saplı şemsiye durumunda toplanmışlardır. Çiçekler pembe veya beyaz renklidir. Meyvesi 4-5 mm boyunda, köşeli, oval şekillidir. Meyveleri Temmuzda olgunlaşır. Özel kokuludur ve meyveleri

sabit ve uçucu yağ, tanen ve reçine taşımaktadır. Ayrıca Kuzey Afrika, Orta Doğu, Batı Çin, Hindistan ve Meksika mutfağında çok kullanılan bir baharattır [5].

Her iki bitkinin de tedavi amaçlı kullanılmasıyla birlikte; insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması da oldukça önemlidir. Bir kimyasal maddenin kısa süreli genotoksisite testleri ile böyle bir etkisinin olup olmadığı belirlenebilmektedir. Kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin genotoksik veya anti-genotoksik olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan metodlar; Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) [6] Kromozom Aberasyonu (KA) (Chromosome Aberration=CA) [7-9] ve Mikronükleus (MN) [10,11] testleridir.

Genotoksisite testlerinden biri olan KKD (Kardeş Kromatid Değişimi), DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimi olarak tanımlanmaktadır [12,13]. İnsan ve hayvanların, mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalarak, hücrelerinde KKD frekansının arttığı ve tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır [14-16]. Deneysel çalışmalarda indikatör test olarak kullanılan KKD, insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntemdir [17].

Bu çalışma ile kimyon (*C. cyminum*) ve karabaş kekiği (*T. spicata*) bitki uçucu yağlarının KKD (Kardeş Kromatid Değişimi) üzerine etkilerini insan lenfosit kromozomlarında incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Cuminum cyminum* (Kimyon)

Maydanozgiller (Apiaceae) familyasından, Mayıs-Haziran ayları arasında beyaz ve pembemsi renkli çiçekleri açan, 40-60 cm boyunda ve bir yıllık otsu bir bitki türüdür. Anavatanı Doğu Akdeniz ve Orta Doğu'dur. Gövdeleri dik, üstte dallanır. Yaprakları iplik gibi parçalı ve tüsüzdür. Çiçekler şemsiye durumunda toplanmışlardır. Çiçekler beyaz veya pembe renklidir. Meyvesi köşeli, oval şekilli, 4-5 mm boyundadır. Kimyon baharatı, kimyon bitkisinin olgunlaştıktan sonra toplanıp kurutulan tohumlarından ya da bu tohumların öğütülmesinden elde edilir. Keskin, acı ve biraz sert bir tadı vardır. Kimyon meyveleri, % 2.5-6 uçucu yağ, % 10- 23 sabit yağ, % 15-25 protein, tanen, flavonoid, reçine ve zatk içerir [18].

Kimyon, çok yaygın bulunan bir bitkidir. Özellikle Kuzey ve Orta Avrupa'da aynı zamanda Asya ve Afrika'da da bulunmaktadır. Yabani olarak deniz seviyesinden yükseklerle kadar her yerde rastlanmaktadır. Kimyon özellikle Hollanda, Almanya, İsveç ve Norveç'te yetiştirilmektedir. Aynı zamanda Macaristan, Romanya, Çekoslovakya, İtalya, Avusturya, İspanya, Rusya ve Küçük Asya'da da tarımı yapılmaktadır. Ancak üretim bakımından en önemli ülke Almanya'dır. Hollanda'da yetiştirilen kimyon açık renkli ve daha büyük meyvelidir. Genellikle kurak bölgeler için küçük meyveliler, yağışlı bölgeler için büyük meyveli tipler daha uygundur [19].

Cuminum cyminum'un kök, gövde, yaprak ve çiçeklerinde onların uçucu yağlarının, toplam fenolik, flavonoid ve tanen içeriğinin, bireysel fenolik bileşikler ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır [20, 21]. Onun antimikrobiyal, anti-karsinojenik ve sitotoksik etkiye sahip olduğu da yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir [20, 22]. Ayrıca; kimyon, halk tıbbında gaz söktürücü, süt artırıcı, periyodik kanamayı geciktirici, ishal kesici, kas ağrısı 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 amaçlarla kullanıldığı bildirilmektedir [23, 24].

Kimyon (*Cuminum cyminum*) sistematığı 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*

2.2. *Thymbra spicata* (Karabaş Kekığı)

Thymbra spicata L. Labiatae familyasından olup genellikle 1000 m'ye kadar olan yüksekliklerde, kalkerli, taşlı ve kurak yerlerde doğal olarak yetişmektedir. Çok yıllık dipten dallanan bu bitkinin dalları iki sıra halinde tüylüdür. Bitkinin yaprakları genç devresinde ortasından uzunlamasına bükük, kenarları düz ve üstü tüylüdür. Çiçekleri sık başak şeklinde olup, başak eksenine alt kısımdan sapsız bağlanmışlardır. Brakteler mor renkli, basık yumurtaya benzer ve belirgin şekilde 1-1.5 mm uzunluğunda tüylüdür. Kaliks 4-6 mm uzunluğunda, borumsu, dorsal yönden basık ve ortası iki dudaklıdır. Meyveleri pembe veya mor renkte ve çiçeğin boru kısmında belirgin şekilde en azından 13 damar bulunmaktadır. Şekil olarak taç yaprakları iki dudaklı, düz tüplü, üst dudak ileri doğru genişlemiş alt dudak üç lopludur. Bazen pembe veya pembemsi açık mor renkli 2-16 mm uzunluğunda olan taç yapraklar esasen mor renklidir. Çiçek 4 stamenli ve meyve yumurtamsıdır [25].

Bir Doğu Akdeniz bitkisi olan *Thymbra spicata* Anadolu, Yunanistan, Ege Adaları, Batı Suriye ve Kuzey Irak'ta doğal olarak yetişmektedir. Yurdumuzda Tekirdağ, Çanakkale,

İstanbul, Bursa, Sakarya, Zonguldak, Amasya, Tokat, İzmir, Adana, Aydın, Antalya, Gaziantep ve Mardin yörelerinde doğal olarak bulunabilmektedir [26].

Karabaş Kekikği (*Thymbra spicata*) sistematiki aşağıda verilmiştir.

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

2.3. Distilasyon

Tarihi M.Ö. 3000 yıllarına kadar uzanan distilasyon, Hindistan Harappa'da kullanılan toprak imbik (damıtma) ilk olarak kabul edilmektedir. Sıvı ve buhar arasındaki madde dağılımına dayanan distilasyon; sıvı karışımındaki maddelerin ayrılması için yaygın olarak kullanılan bir metottur. Bu sebeple distilasyon uçucu ve yarı uçucu organik maddelerin saflaştırılmasında kullanılan seçeneklerden ilkidir [27].

Distilasyon esasen; karışım içerisindeki uçucu bileşenlerin uçuculuklarına göre birbirlerinden veya uçucu olmayanlardan ayrılmasını amaçlamaktadır. Her biri farklı buhar basıncına sahip sıvı karışımındaki maddeler; bu farklılıklarından dolayı birbirlerinden ayrılabilirler. Başka bir deyişle, doygun buhar basıncındaki maddelerin sıcaklıkla olan değişimleri distilasyon tekniği kullanılarak birbirinden ayrılabilir. Karışım içindeki bileşenleri ayırmanın temeli, homojen bir fazdan

diğerine maddenin geçişi olgusudur. Burada kullanılan metotlar yoğunluk veya parça büyüklüğünden ziyade buhar basınçları ve çözünlüklerindeki farklılara dayanarak, mekanik olarak ayırma işlemindekinin zıttıdır [27].

2.4. Distilasyon Yöntemleri

Uçucu bileşenlerin bitkisel materyalden alınması amacıyla uygulanan başlıca distilasyon yöntemlerini şu şekilde sıralayabiliriz:

- Su distilasyonu
- Buhar distilasyonu
- Su-Buhar distilasyonu
- Hidrodifüzyon
- Mikro distilasyon
- Mikrodalga destekli distilasyon
- Eşzamanlı distilasyon-ekstraksiyon
- Kuru distilasyon
- Fraksiyonlu distilasyon [27].

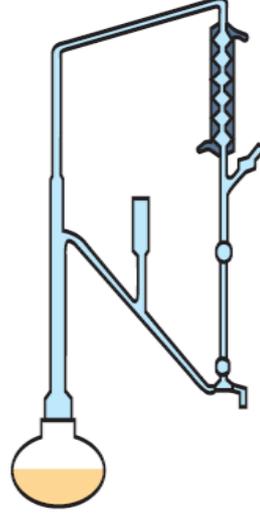
2.4.1. Su Distilasyonu

Su distilasyonunda temel işlem materyalin su içerisinde ısıtılarak uçucu bileşenlerinin buharlaştırılması ve ardından da soğutularak yoğunlaşmasını sağlamaktır. Yağ suda çözünmediğinden dolayı ortaya çıkan faz ayrımı elde edilen yağın yoğunluğunun sudan hafif veya ağır olmasına göre suyun üzerinde veya altında birikmesine sebebiyet verir. Şekil 2.1’de laboratuvar ölçekli çalışmalar için kullanılan bir su distilasyon apareyi (Clevenger) gösterilmektedir [27].

Materyal su distilasyonunda doğrudan su ile temas halindedir ve kap içerisinde materyali örtecek miktarda su bulunmalıdır. Çünkü ısı etkisiyle materyal yanarak bozunma ürünleri oluşumuna sebebiyet verir. Kazandaki su kaybını önlemek amacıyla, distilasyon işlemi süresince distilattaki yağ sudan ayrıldıktan sonra yağla doymuş suyun bir boru yardımı ile tekrar distilasyon kazanına gönderilmelidir. Bu teknik kohobasyon (cohobation) olarak isimlendirilir. Bu işlemle beraber kazan suyunda azalma olmaz ve kazandaki su, suda çözünen maddelerce doymuş olduğundan yağ verimi de artabilir [27].

Su distilasyonunun diğer bir farkı ise materyalin karıştırılarak çökme ve topaklaşma oluşumunun engellenmesinin gerekliliğidir [27].

Clevenger apareyi



Şekil 2.1. Clevenger apareyi [27].

Uçucu yağların su distilasyonu ile elde edilmesi genel olarak diğer yöntemlerle kıyasla elde edilen yağlar daha koyu renkli ve daha farklı kokuya sahip olabilirler. Su distilasyon yönteminin bazı dezavantajlarını şöyle sıralayabiliriz:

- Yağda mevcut olan ester yapısındaki bileşikler kolaylıkla hidroliz olur.
- Aldehitler ve asitlik monoterpenler polimerize olmaya yatkındır.
- Oksijenli bileşikler (fenoller) kısmen suda çözünerek suya geçerler ve tamamen alınmaları mümkün değildir.
- Su distilasyon kazanları genellikle çok büyük değildir ve bu yüzden aynı miktar materyal için daha fazla işçilik gerektirir.
- Büyük miktarda ısıl işleme alınan her distilasyon çalışması için enerji tüketimi diğer yöntemlerle kıyasla daha fazladır.

Özetlediğimiz dezavantajların yanında su distilasyonunun en temel avantajı ise; buhar distilasyonu uygulamalarında materyal topaklaşması, penetrasyon özelliğinin birbirine yapışması sonucu zayıflaması veya ortadan kalkması ile kütle geçişinin durması olayının gözlenmemesidir. Uygulamaya en belirgin örnek ise Türkiye'deki gül yağı üretimidir [27].

2.4.2. Buhar Distilasyonu

Uçucu organik maddeleri su buharı kullanarak ayırma işlemi buhar distilasyonunun temelidir. Diğer distilasyon tekniklerine alternatif olarak ısıya karşı hassas olan maddelerin saflaştırılması ve madde hazırlanmasında kullanılabilir. Kaynama noktaları ne olursa olsun çoğu maddeler saf suyun kaynama noktasının altındaki sıcaklıkta distile olabilmektedir. Genellikle kesikli bir işlemle iyi dondurulmuş bitki materyali içinden sürekli şekilde su buharı geçirilmesiyle buhar distilasyonu gerçekleştirilir [27].

Uçucu maddelerin buhar fazındaki konsantrasyonu, su buharı karışımındaki basınçları yani kısmi buhar basınçlarıyla ilişkilidir. Maddenin tek başına toplam basınca ulaşmasında buharın oluşturduğu basınç büyük katkı sağlar ve beklenen basınçtan daha küçük basınçta buharlaşma imkanı sağlar [27].

Distile elde edilen maddelerin su buharı sıcaklığının üzerindeki sıcaklığa çıkılmaması sebebiyle bu teknik uygun bir distilasyon tekniği olarak kabul edilmektedir. Soğutucudan geçen su buharı ve uçucu yağ işlem sonunda birlikte sıvılaşır. Uçucu yağın yoğunluğu sudan hafif olduğu için toplama kabında genellikle suyun üzerinde biriktiği görülür ve sudan ağır olan yağlar dibe çökerek ayrılmaktadırlar. Fakat, faz ayrımı yok ise distilatın suyla karışmayan bir organik çözücü ile ekstre edilmesi gerekmektedir [27].

Buhar Distilasyonunda Başlıca Dikkat Edilmesi Gereken Maddeler:

- Buhar distilasyonunda katı maddelerin çok sıkı şekilde doldurulmasına dikkat edilir.
- Distilasyon esnasında tüm materyalin buhar ile teması sağlanmalıdır.
- Buhar/madde oranı tespiti iyi yapılmalıdır.
- Buharın verilişindeki hız dikkatle ayarlanmalıdır.
- Bir buhar dağıtıcısı ile buhar materyale verilmeli ve buhar tek bir noktadan verilmemelidir.
- Buharı fazla vererek içeride fazla basınç oluşturulmamalıdır.

- Soğuk olan cam malzemeye doğrudan aşırı miktarda buhar verilmemeli ve cam malzemelerle çalışırken dikkatli olunmalıdır.
- Eğer buhar ayrı bir kap içerisinde elde ediliyorsa buhar transferi uygun bağlantılarla gerçekleştirilmelidir [27].

2.4.3. Su-Buhar Distilasyonu

Distilasyon işlemi su-buhar distilasyonunda, delikli tepsi üzerinde bulunan bitkisel materyal içinden alt bölmede kaynayan suyun buharlarının geçirilmesiyle gerçekleştirilir. Kurulum maliyeti su distilasyonunda olduğu gibi düşük olup işletimi kolaydır. Bu nedenle köy-tipi distilasyonlarda bu teknikten faydalanılır [27].

Su distilasyonuna göre su-buhar distilasyonunun avantajları şunlardır;

- Yağ verimi oldukça iyidir.
- Hidroliz ürünleri yağda daha az bulunur.
- Oksijenli bileşikler yağda daha fazladır.
- Tekrarlanabilir ürünler yağ kalitesi açısından elde edilir.
- Enerji verimliliği oldukça yüksek ve hızlı bir prosestir [27].

2.4.4. Hidrodifüzyon

Buhar materyalin bulunduğu kazana alttan değil üstten girer ve difüzyon olayı ozmotik basınç prensibiyle gerçekleşir. Genel olarak bilinen buhar distilasyonu uygulamasının aksine, materyalin bulunduğu kazana buhar alttan değil üstten girer. Ozmotik basınç prensibiyle difüzyon olayı gerçekleşir. Kazan içindeki delikli bir tepsi üzerine materyal yüklenir. Kazan içerisine düşük basınçlı buhar tepeden verilir. Delikli tepsinin altında bulunan soğutucudan çıkan yağ ve su alttaki ayırıcıda yoğunluk farkıyla ayrılır. Genel olarak Hidrodifüzyon özellikleri şunlardır:

- Kullanımı oldukça kolaydır.
- İyi parçalara ayrılmış materyallere kolayca uygulanmaktadır
- Islak buhar düşük basınçta kullanılır.
- Genel olarak bilinen buhar distilasyonundan daha yüksek verim elde edilebilmektedir.
- Distilasyon süresinin kısa olması nedeniyle zaman ve enerji ekonomisi sağlar.
- Açığa çıkan yağ ticari olarak kabul edilen yağlardandır.

- İşçilik yoğun ve kapasitesi düşüktür.
- Kondanse su akımı beraberinde lipit, klorofil, yağ asitleri, kumarinler vb. bazı uçucu olmayan bileşikleri de beraberinde getirdiği için yağ kompozisyonu değişime uğramaktadır. Bu yöntem elde edilen yağın saf olmaması nedeniyle çok fazla kullanım alanı bulamamıştır [27].

2.4.5. Mikro Distilasyon

Az miktardaki bitkisel materyalin çok az zamanda distilasyonu için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemle 1 gr'dan daha az maddelerin distilasyonu yapılabilmektedir.

Bu amaç doğrultusunda kullanılan başlıca mikro-distilasyon sistemleri;

- Mikrodistilasyon sistemi
- Kısa mesafeli (Short Path) distilasyon
- Hickman distilasyon başlığı
- Likens-Nickerson eşzamanlı distilasyon ve ekstraksiyon apareyi
- Mikro ölçek "Döner kuşaklı" distilasyon sistemi [27].

2.4.6. Mikrodalga Destekli Distilasyon

Mikrodalga enerjisi, kontrollü kullanıldığı zaman ısıtma işlemi kullanımını için uygun olabilir. Bu tip yöntemlerde en önemli konu kullanılan sıvının ve materyalin mikrodalga enerjisini alabilmesidir. Öncelikle su olmak üzere polar veya iyonik çözeltiler mikrodalga enerjisini alabilir ancak apolar çözücüler mikrodalga enerjisini alamaz ve bu nedenle enerji transferi gerçekleşmez [27].

Esas itibariyle mikrodalga destekli distilasyon su distilasyonu ile benzerdir. Materyal ve su mikrodalga enerji kullanılarak ısıtılır ve böylece ısıtma işlemleri mikrodalga ile sağlanmış olur [27].

2.4.7. Eşzamanlı Distilasyon-Ekstraksiyon

Bitkisel materyal distile edildiğinde yağ sudan ayrılmaz ve bu teknikte distilat bir organik çözücü içinden geçirilerek uçucu kimyasalların organik çözücü içinden geçirilerek uçucu kimyasalların organik çözücüde tutunmaları sağlanmaktadır. Likens-Nickerson apareyi bu uygulamanın mikro ölçekte gerçekleştirildiği bir sistemdir. Sudan

ağır veya hafif olmasına göre ekstraksiyon amacıyla kullanılan organik çözücü iki farklı dizayna sahiptir [27].

2.4.8. Kuru Distilasyon

Genel olarak kullanılmayan bu yöntem, oleorezinli odunlardan katran elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla odun parçaları kapalı bir sistemde üstten ısıtılarak bünyesindeki uçucu maddelerin aŐađıya akması sağlanmaktadır. Isıtma işlemi esnasında birçok madde ısı etkisiyle bozulur ve son ürün piroliz ürünleri içerir. Bir müddet bekletilen üründe altta katran, ortada su, üstte ise uçucu yağ içeren yağlı bir kısım gözlenir [27].

2.4.9. Fraksiyonlu Distilasyon

Karışımındaki maddelerin kaynama noktaları birbirine yaklaŐtıka ayırımları da bir o kadar güçleŐmektedir. Bu tür maddelerin ayırımları basit distilasyon sistemleriyle mümkün olmamakla birlikte ayırım için bu işlemin sürekli tekrar edilmesi gerekmektedir. Bu uygulama buhar fazı ile sıvı fazın çoğu kez dengeye getirilmesine imkn veren basamaklardan oluşmaktadır. Fraksiyonlu distilasyon buna olanak veren bir ayırım sistemidir [27].

2.5. Distilasyon Sonrası İŞlemler

Distilasyon sonrası bazı işlemler gerçekleştirilir ki bu iŐlemlerin ilki, elde edilen uçucu yağın sudan ayrılmasıdır. Ayrılan yağın varsa taşıdığı katı parçacıklar ve sudan arındırılması işlemleri de distilasyon sonrası işlemler arasında bulunmaktadır. Bu işlemleri sırasıyla açıklayalım [27].

2.5.1. Ayırma

Distilasyon sonunda açığa çıkan uçucu yağın sudan ayrılması işlemi oldukça önemlidir. Bu amaçla kullanılmakta olan ayırma kaplarına “florentin kabı” denilmektedir. Yağın sudan ayrılması işlemi yoğunluk farkı ile gerçekleŐmektedir. Yağın sudan hafif ya da ağır olmasına göre kullanılan florentin kabı farklı tasarlanabilir. Uçucu yağların çoğu sudan hafif olduklarından dolayı florentin kapları genellikle sudan hafif yağlar için tasarlanmaktadır [27].

2.5.2. Süzme

Eğer açığa çıkan uçucu yağ içinde çalışılan materyalden gelen katı parçacıklar kalmışsa uygun filtre ortamından süzülerek taşıdığı parçacıklardan ayrıştırılır. Bu işlemler laboratuvarda süzgeç kağıdı yardımıyla yapılırken, endüstride çeşitli filtreler kullanılarak gerçekleştirilmektedir [27].

2.5.3. Kurutma

Ayırma ve süzme işleminin bitmesinin ardından yağ az bir miktar bile olsa su taşıyabilmektedir. Böylece yağın özelliğine bağlı olarak bulanıklık da meydana gelebilir ve bu durumda yapılacak işlem yağın kurutulması olarak isimlendirilen kalan nem ve suyundan arındırılmasıdır. Laboratuvarda az miktar örnekle çalışılan yağın kurutulması işlemi susuz sodyum sülfat ile muamele edilerek yapılırken endüstriyel uygulamalarda mekanik olarak gerçekleştirilmektedir. Narenciye esanslarının sudan ayrılmasında bu sebeple yüksek devirli santrifüjler kullanılmaktadır [27].

2.6. Kromozom

Yunanca *chromo* (renk) ve *soma* (vücut) kelimelerinden türetilmiş kromozom terimi 1888'de ilk kez Waldeyer tarafından kullanılmıştır [28]. Genetik mekanizmaların yapılarını sağlayan kromozomlar DNA'nın doğru bir şekilde replikasyonuna ve transkripsiyonuna izin verir. Kromozomların sentromer, telomer ve kromatin paketlenmesi gibi yapısal özellikleri çok iyi muhafaza edilmiştir. Mitozun metafaz evresinde DNA; kısa, çubuk şeklindeki mitotik kromozomlar halinde sıkıştırılır, interfaz evresinde ise kromozomlar interfaz nükleusunda sıkılaşmamış halde yani kromatin iplikler şeklindedir [29].

Kromozomlar nükleus içerisinde sentromerlerinin bulunduğu yere göre; asentrik (sentromersiz), metasentrik (sentromer orta noktada), akrosentrik (sentromer uca yakın), submetasentrik (sentromer kollardan birine yakın), telosentrik (sentromer uçlardan birine çok yakın), disentrik (iki sentromerli), polisentrik (ikiden fazla sentromerli), izosentrik (kromozomun iki kolu birbirinin aynısı) ve satellitli (uzun kol, kısa kol, ikincil yapı ve satellite sahip) kromozom olarak farklı şekillerde adlandırılmaktadırlar [30].

2.6.1. Kromozomların Özel Yapıları

Mikroskopta incelenen kromozomlar üzerinde üç bölge tanımlanmıştır: telomerler, sentromer ve nükleolar organize edici bölgeler.

2.6.1.1. Sentromer

Nesilden nesile, hücreden hücreye genetik bilginin doğru şekilde iletilmesi için gerekli ökaryotik kromozomlarda bulunan sentromer özelleşmiş bir yapıdır. Nükleus bölünmesi gibi birçok temel işlevde önemli role sahiptir.

Sentromerler, anafaz evresi süresince kardeş kromatid birleşimi ile mitotik ve mayotik iğ iplikçiklerinin bağlanması görevini üstlenirler. Sentromerler, mayoz I'de homolog kromozomların ayrılmasında, mitoz ve mayoz II'de kardeş kromatidlerin ayrılmasında ve anafaz teşvik kompleksi ('anaphase promoting complex') aracılığı ile hücre döngüsünün kontrolünde önemli rolü vardır [31, 32].

2.6.1.2. Telomer

Kromozomların uçlarında bulunan tekrarlı diziler telomer olarak adlandırılır. R bantlama uygulamasında süre uzatıldığı zaman, T bantları olarak bilinen bantların oluştuğu ve telomerik bölgelerin özgün olarak boyandığı görülmüştür [33]. Telomerler kromozom uçlarında koruyucu bir başlık oluştururlar ve bu başlık sayesinde disentrik kromozom oluşumu ve subtelomerik bölgelerdeki genetik bilgi kaybı önlenmektedir. Genellikle bitkilerdeki telomerik dizi TTTAGGG şeklindedir [29].

2.6.1.3. NOR ("Nucleolus Organizing Region") -Nükleolar Organize Edici Bölge

Satellit içeren kromozomlar metafaz plağında incelenirken, ikinci bir daralma bölgesi sentromerden sonra gözlenir ve bu bölge NOR olarak isimlendirilir. nükleus içindeki en belirgin yapı interfazdaki nükleolustur.

18S-5.8S-26S rRNA genlerini onların transkriptlerini ve transkripsiyonu olmayan bölgeleri içeren 45S rDNA bölgelerine NOR karşılık gelir. NOR'lardaki rRNA genlerinin sayısı değişkenlik gösterir ve Mendelyen tarzda kalıtılırlar. Aynı zamanda NOR'ların miktarı ve pozisyonu, türler arasında da değişiklik gösterir [33-35].

2.7. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)

2.7.1. KKD'nin Tarihçesi

Çevredeki atıkların etkisini araştırmak için Taylor ve arkadaşları tarafından 1957 yılında KKD testi geliştirilip, kısa süreli mutajenite ve karsinojenite testleri arasında en hassas ve yaygın olarak en fazla kabul edilen yöntem haline gelmiştir [36]. İnsan hücrelerinin kullanıldığı testlerden DNA hasarını araştırmada en sık başvurulan Sister Chromatid Exchange (SCE) ve Microgel Electrophoresis (MGE) olarak da bilinen Comet Assay yöntemidir. KKD analiz yöntemi; homolog kromozomlarının gen lokusları arasındaki, DNA replikasyon ürünlerinin değişimini test etmekte olup, duyarlı ve hızla işleyen, kırılma ve yeniden birleşmeyle sonlanan sitogenetik bir analizdir [37-39].

Bir kromozomun iki kromatidinde, DNA'ki homolog bölgelerde oluşan kırılma ve yeniden birleşme olaylarının sonuçları SCE olarak isimlendirilir [40]. Timidin varlığında otoradyografik yöntem kullanılarak DNA replikasyonu geçiren hücrelerin işaretlenmesi, "Gümüş Tane Modeli" olarak adlandırılmaktadır [40, 41].

En az iki replikasyon siklusu KKD'nin oluşumu için gereklidir. Bir primidin analogu olan BrdU, Hoechst 33258 florochrom floresans boyası ile baskılanmaktadır. Replikasyon siklusunda her bir kromozomun bir uzun bir kısa kolunda BrdU görülmektedir. Her kromatid tek iplik şeklinde BrdU'lu timin taşır. İlk mitozda değişiklik gözlenmezken ikinci mitozda her bir kromatid iki ayrı hücrede yer almaktadır. BrdU bu yer değişimini sağlamaktadır. DNA sentezi süresince bu olay BrdU varlığında devam eder ve olay sonucunda kromatid ikili durumdan tekli duruma geçer ve kromatid siyah renkli görülür [42].

In vitro çalışmalar sonucunda insektisitlerin, prokaryot ve ökaryot hücrelere genotoksik etkisi olduğu bilinmektedir. İnsektisitler, akut zehirlenme yapmalarının yanı sıra genotoksik olarak da etkili olmaktadır. Organofosfatlı ve karbamatlı insektisitler tarım veya halk sağlığı alanında kullanılabilirler. Bilhassa insan lenfosit hücreleri ile yapılan çalışmalarda, kromozomların kardeş kromatidleri arasında simetrik segment değişimine neden olduğu gözlenmiştir. İnsektisitler gibi insanda oluşan

KKD'ye, kimyasal maddeler, radyasyon ve virüsler de neden olabilmektedir. Son yıllarda nükleer denemeler sırasında oluşan atıklar, sanayi atıkları ve zirai mücadele ilaçlarının çevreye verilmesi sonucu, bu atıklar insanlarda genetik değişikliklere neden olmakta ve çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır [36, 43, 44].

KKD oranı; pesticide maruz kalan insanlarda, pesticide maruz kalmayan insanlara kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda, yapısal ve sayısal kromozom düzensizliklerinin de sıklıkla görüldüğü belirtilmiştir. *In vitro* çalışmalar doğrultusunda belirli kimyasal maddeler üzerine yapılan araştırmalarda, bu kimyasalların KKD artışına neden olduğu ve karışım olarak uygulandığı zaman, etkilerinde bir artış meydana geldiği gösterilmiştir [45].

İlk kez timidin (3H) varlığında KKD analiz yöntemi, otoradyografik yöntem kullanılarak, kromozomlardaki kardeş kromatidlerin farklı boyandığı gösterilmiştir [39]. Son yıllarda otoradyografik çalışmalarından ziyade, timin analogu olan BrdU kullanılması, KKD sıklığını daha kolay ve çabuk değerlendirme olanağı sağlamaktadır. Böylelikle BrdU kullanımı ve yeni boyama metodlarının geliştirilmesi ile KKD analiz yöntemi daha da önem kazanmaktadır [46].

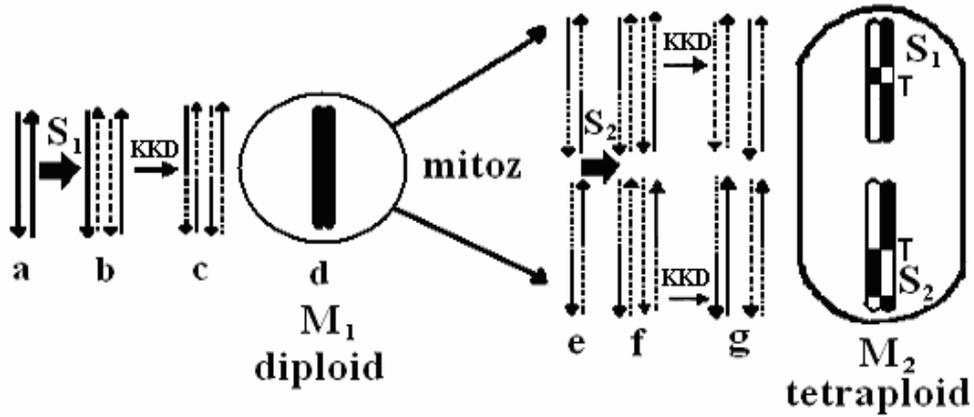
2.7.2. KKD'nin Oluş Modelleri

KKD oluş mekanizması hakkında değişik modeller ortaya atılmıştır [46]. KKD oluş mekanizmasını incelemek için tetraploid hücreler kullanılmış olup bu hücreler, ilk replikasyonun sonunda kolşisin ekleyerek iki DNA replikasyonu arasındaki bölünme durdurularak elde edilmektedir. Tetraploid hücrelerin BrdU ile iki replikasyon zamanını geçirmeleri gerekmektedir. KKD mekanizması genel olarak Şekil 2.2'de olduğu gibi açıklanabilmektedir [47].

- a) İnterfaz G1 kromozomu diploid hücre (2n) ("Düz çizgi" ile kalıp DNA gösterilmektedir).
- b) DNA sentezi S1 evresinde başlamaktadır. Yeni sentez edilen DNA'da timin yerine, ortamda bulunan BrdU geçmektedir (BrdU içeren DNA (-----) şeklinde gösterilmektedir).

- c) DNA’da kırılma ve kromatidler arasında değişimler ortaya çıkmaktadır.
- d) Mitozun ilk evresinde (M1) yeni sentezlenen kardeş kromatidlerin yalnızca birinde BrdU olmasından dolayı, FPG boyama tekniği ile koyu boyanmaktadır. Kolşisin ilave edilen M1 diploid hücrelerden (2n) tetraploid hücreler (4n) oluşturulmaktadır.
- e) İnterfaz G2 kromozomu tetraploid hücre (4n).
- f) Ortamda mevcut olan BrdU, yeni sentez edilen DNA’nın yapısına girmekte (S2 evresi) ve semikonservatif DNA sentezi başlamaktadır.
- g) DNA’da kırılmalar oluşmakta ve kromatidler arasında KKD gözlenmektedir.

M2 mitoz sonunda Tetraploid hücrelerde (4n), kardeş kromatidlerin sadece birinde meydana gelen değişim “Tek KKD” olarak söylenilmektedir. Homolog kromozomların ayrı lokuslarında “Tek KKD” nin, oluştuğu belirtilmektedir. M2 mitoz sonunda, kardeş kromatid çiftinin her ikisinde meydana gelen değişim “Çift KKD” olarak değerlendirilmekte olup, homolog kromozomların aynı lokuslarında “Çift KKD” meydana gelmektedir [47].



Şekil 2.2. Genel KKD oluş mekanizması: Tetraploid hücrelerde (4n) çift KKD oluşmaktadır [48].

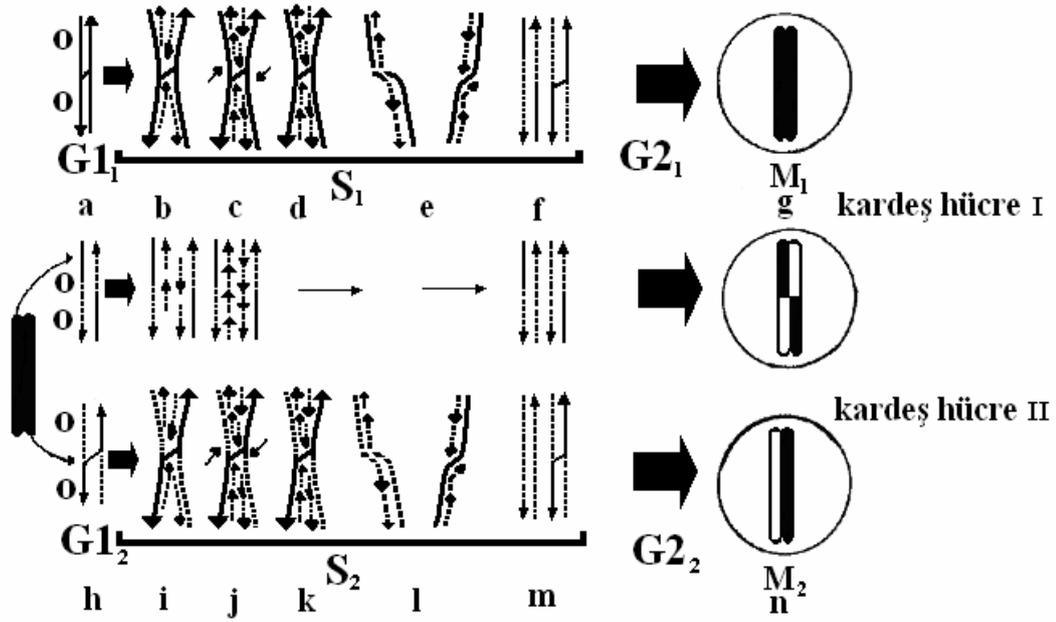
2.7.2.1. Replikasyon Bypass Modeli

“Replikasyon Bypass Modeli” KKD oluş mekanizmasını başka açıklayan bir modeldir. Bu model, KKD'nin oluş mekanizmasını DNA ile çapraz bağlanma yapabilen kimyasal ajanların meydana getirmesi olarak açıklamaktadır. “Replikasyon Bypass Modeli” şekil 2.3'te gösterilmektedir [47].

- a) İnterfaz G1 kromozomu diploid hücre (2n) (kalıp DNA düz çizgi şeklinde belirtilmektedir). Kimyasal ajan, DNA ile çapraz bağlanma meydana getirmekte ve iki replikasyon orjini “O” şeklinde ifade edilmektedir.
- b) İlk S1 evresinde BrdU varlığında iki yönlü semikonservatif DNA sentezi başlamaktadır. (Yeni sentez edilen ve BrdU içeren DNA (-----) şekilde belirtilmektedir.).
- c) DNA sentezi çapraz bağlantı olan bölgede meydana gelmemekte ve sentez okazaki fragmentleri şeklinde devam etmektedir.
- d) Kromatidlerde kırılmalar çapraz bağlantı noktalarından ortaya çıkmaktadır.
- e) DNA'daki kırılma noktalarında kardeş kromatidler arasında değişim oluşmaktadır.
- f) Çift zincirli DNA yapısı, yeni sentez edilen DNA parçalarının araları tamamlanarak meydana gelir. Uzaklaştırılmaması nedeniyle bir çift kromatidin yapısına çapraz bağlanma girmektedir.
- g) Yeni sentezlenen kardeş kromatidlerin yalnızca birinde BrdU olması nedeniyle birinci mitozda (M1), FPG boyama yöntemi ile koyu boyanmaktadır.
- h) Kardeş kromatidlerin herbiri kardeş hücrelere ikinci mitozda (M2) ayrılır ve aynı zamanda kardeş kromatidlerin bir tanesi çapraz bağlanmayı içermektedir.
- i) S2 evresinde BrdU varlığında iki yönlü semikonservatif DNA sentezi başlamaktadır.
- j) Kromatid çapraz bağlantı içermeyen birinci kardeş hücrede, replikasyon başlama noktasından DNA sentezi devam etmektedir. Kromatid çapraz bağlantı ikinci kardeş hücre içermektedir. İki yönlü okazaki fragmentleri şeklinde DNA sentezi devam eder ancak DNA sentezi çapraz bağlanma bölgesinde meydana gelmemektedir.
- k) İkinci kardeş hücrede kırılmalar çapraz bağlanma noktalarından ortaya çıkar.

- l) Kromatidler arasında değişim, DNA kırılma noktalarında ortaya çıkmaktadır.
- m) Birinci ve İkinci kardeş hücrede yeni sentez edilen DNA parçalarının araları tamamlanır ve yeni kromatid yapısı meydana gelir. Çapraz bağlanma uzaklaştırılmadığı için ikinci kardeş hücrede, yeni oluşan kromatid yapısına girmektedir.
- n) FPG boyama yöntemi ile ikinci mitozdaki birinci kardeş hücrede tek DNA zincirinin BrdU içermesi koyu renkle, her iki DNA zincirinin de BrdU içermesi açık renkle boyanmasına neden olmaktadır ve KKD görülebilmektedir. “Replikasyon Bypass Modeli” ne göre ikinci kardeş hücrede, yalnızca bir DNA zinciri bulunan ve çapraz bağlanma içeren kardeş kromatidler koyu renkle boyanmaktadır. BrdU içermekte olan diğer kromatid yapısını oluşturan her iki DNA zinciri açık renkle boyanmaktadır. Bu sebeple oluşan kromozom yapısının bir tarafı koyu renk boyanmakta olup kromatid değişimi oluşmamaktadır. KKD bu modele göre yalnızca birinci kardeş hücrede görülmektedir [47].

DNA ile çapraz bağlanma yapabilen kimyasal ajanların “Tek KKD” oluş mekanizmasını “Replikasyon Bypass Modeli” açıkça ifade etmektedir. Fakat bu modelle “Çift KKD” oluş mekanizması açıklanamamaktadır [47].



Şekil 2.3. Replikasyon Bypass Modeli'ne göre KKD oluş mekanizması: tek KKD meydana gelen tetraploid hücreler ($4n$) [48].

2.7.2.2. Holiday Modeli

KKD oluş mekanizmasını ve hücrede DNA parçaları aralarındaki değişimi açıklayan bir diğer yaklaşım ise "Holiday Modeli" dir. Hücrelerin BrdU varlığında bir mitoz geçirmeleri bu modele göre yeterlidir. Holiday modeli şekil 2.4'te belirtilmiştir [37].

- Kalın çizgi (ağır) şeklinde gösterilenler birbirini tamamlayan atasal DNA zincirleridir.
- Yeni DNA sentezi BrdU varlığında yapılmaktadır ve ince çizgiyle BrdU içeren iplik gösterilmektedir.
- Kırılma olayı her bir çift zincirli DNA yapısında görülmektedir. Bu zincirler arasında crossing-over olayı meydana gelmekte ve zincirler arasında rekombinasyon ile heterodubleks yapı oluşmaktadır.
- Zincirler arasında rekombinasyon olayı tekrarlanır.

e) Dış taraftaki ağır ve hafif DNA zincirlerinde kırılmaların oluşması, rekombinant DNA moleküllerinin meydana gelmesine neden olmakta ve iki DNA molekülü birbirinden ayrılmaktadır.

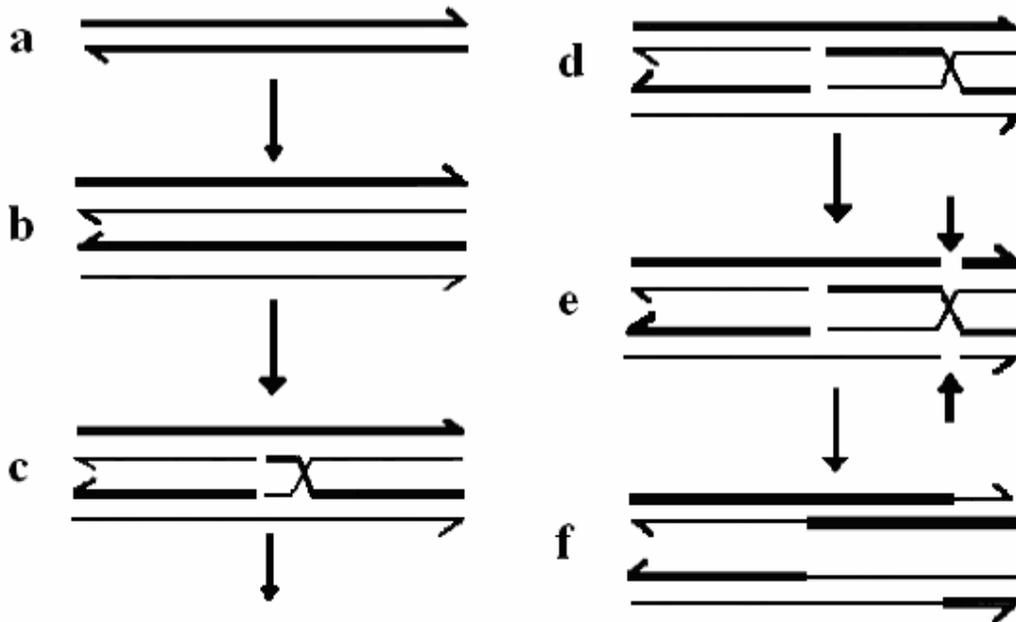
f) Oluşan rekombinant DNA molekülleri son olarak

ağır-ağır-hafif

hafif-hafif-ağır

hafif-ağır-ağır ve ağır-hafif-hafif

şeklinde heterodubleks yapılar içermektedir. Bu DNA molekülünde ağır/ağır bölge koyu renk, hafif/hafif bölge açık renk ile boyanmakta ve böylece KKD oluşumu ortaya çıkmaktadır [37].



Şekil 2.4. Holiday modeline göre KKD oluş mekanizması [48].

FPG boyama yöntemi ile Zakharov ve Egolina, açık renkte boyanan kromatidlerin, koyu boyanan kromatidlerden daha uzun olduğunu belirtmişlerdir [47]. Protein ile BrdU içeren DNA arasındaki etkileşimin farklı olması nedeniyle kromatidlerdeki bu uzunluk farkı meydana gelmektedir. Kromozomların kondensasyonunda ve spiralizasyonunda proteinler etkili olmaktadır. Kromozomların spiralizasyonunu ve kondensasyonunu zorlaştırmakta olan proteinler, BrdU içeren DNA'ya, BrdU içermeyen DNA'dan daha sıkı bağlanmaktadır. Araştırmacılar, BrdU'nun kromozomlardaki esas etkisini büyük

kromozomal yapıyı oluşturan 25 nm çapındaki liflerin paketlenmesi sırasında göstermektedir [39].

KKD analiz yöntemi ayrıca DNA tamir mekanizması bozuk ve kromozom kırıkları içeren genetik hastalıkların moleküler sitogenetik açıdan araştırılmasında da oldukça önemlidir. Bloom Sendromu, Fanconi Anemisi ve Ataksi Telenjiektazi kromozom kırıkları içeren ve DNA tamir mekanizması bozuk olan otozomal resesif hastalıklardır [49].

İnsan lenfosit hücre kromozomlarında KKD değerinin Fanconi Anemisi ve Ataksi Telenjiektazi hastalarındakinden kontrol grubu olarak kullanılan sağlıklı kişilerin KKD değerinden daha farklı olmadığı gözlenmiştir. DNA tamir sisteminin Fanconi Anemisi olan kişilerde bozuk olması nedeniyle, KKD ve kromozom kırığı meydana getiren (iki fonksiyonlu) alkilleyici ajanlar hücre DNA'sını etkilemekte ve kromozom kırıkları oluşturmaktadırlar. Bu hastalığın görüldüğü kişilerde iki fonksiyonlu alkilleyici ajan olan MMC'nin lenfosit hücre kültürlerine eklenmesi sonucunda, kromozom kırıkları artmakta, fakat KKD değeri, normal KKD değerine göre çok az değişim göstermektedir. Kromozom kırıklarının artması ve KKD değerinin çok az değişkenlik göstermesi, kromozomlardaki kırılmayı ve KKD'yi meydana getiren mekanizmanın farklı olduğunu belirtmektedir [50, 51]. Normal KKD değerine göre Bloom Sendromu olan kişilerin, kromozom kırıkları ve KKD değerleri 10-13 kat daha fazla olmaktadır [52, 53]. KKD değerinin artışı Bloom Sendromlu kişilerin lenfosit hücre kültürlerine, etil metil sülfonat gibi alkilleyici ajanın eklenmesi sonucunda görülmüştür. Bu sendroma sahip hastaların hücrelerinin, Çin hamster hücreleri veya normal fibroblast hücreleri ile füzyona girmesi sonucu, yüksek KKD değerinin normal KKD değerine yaklaştığı açığa çıkmıştır. Bloom sendromlu hastaların hücrelerinde, yüksek KKD oranını normal KKD oranına düşüren kimyasal faktörlerin izolasyonu ve belirlenmesi, bu olayın açıklanmasında önemli rol oynamaktadır [53].

2.8. Genotoksisite

Canlı türünün kendine has genetik bilgisinde gen rekombinasyonundan başka etkenlerle birden bire ortaya çıkan kalıtsal varyasyonlar mutasyon olarak isimlendirilmektedir. Doğada kendiliğinden oluşan mutasyonların yanı sıra, mutajen fiziksel ve kimyasal

etkenler tarafından da meydana gelebilmektedirler. DNA molekülünde mutajenler birçok hasar oluştururlar ve bu hasarların bir kısmı özel mekanizmalar ile hücrede onarılmaya çalışılır. DNA'da meydana gelen çeşitli hasarlar, bazen hücrenin ölümden kurtulabilmesi için mecburen yanlış olarak da onarılabilir. Onarım mekanizmalarının çalışmasını kontrol eden genlerdeki mutasyon varlığında ya da yaş, hastalıklar, beslenme, ısı gibi şartların olumsuz etkileriyle DNA'da meydana gelen hasarlar onarılmadan kalabilir. Bunun sonucunda o hücre de mutasyona neden olur ve mutasyon sonucu çeşitli bozukluklar ortaya çıkar. Kanser ve hücre ölümü bu bozukluklar arasındadır. Canlılarda mutasyonlar bazen üstün bir karakterin görülmesine neden olabilir. Fakat yinede çoğunlukla canlılar için olumsuz olan özelliklerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [54, 55].

Canlıların DNA'larında oluşan hasarlar (mutasyon) *in vitro* memeli hücre gen mutasyon testi, bakteri kullanarak yapılan geri mutasyon testleri ile belirlenmektedir. *In vitro* memeli, Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Aberasyon ve Mikronukleus testi, DNA'da oluşan mutasyonun ve genotoksik etkilerin sitogenetik açıdan araştırılmasında en yaygın kullanılan yöntemlerdendir [56].

3. MATERYAL VE METOD

Materyal

Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 29.06.2011/6 sayılı izni ile çalışma onayı alındı.

Bu çalışmada, materyal olarak yaş aralıkları 20 ve 25 arasında değişen 10 bayan ve yine yaş aralıkları 20 ve 25 arasında değişen 10 erkekten alınan periferik kan, Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş Kekik (*Thymbra spicata*) bitki uçucu yağları test maddesi olarak kullanıldı. Test kontrol olarak Aseton (C₃H₆O), pozitif kontrol olarak ise Mitomisin-C (MMC) kullanıldı [57].

3.1. Kullanılan Test Maddeleri ve Test Maddelerinin Çözeltilerinin Hazırlanması

3.1.1. *Cuminum cyminum* (Kimyon)

Bu çalışmada kullanılan test maddelerinden biri olan Kimyon (*C. cyminum*), maydanozgiller (Apiaceae) familyasından Mayıs-Haziran ayları arasında, 40-60 cm boyunda, beyaz ve pembemsi renkli çiçekleri açan, bir yıllık otsu bir bitki türüdür. Anavatanı Orta Doğu ve Doğu Akdeniz'dir. Gövdeleri üstte dallanır ve diktir. Yaprakları tüysüz ve iplik gibi parçalıdır. Çiçekler 3-5 saplı şemsiye durumunda toplanmışlardır. Çiçekler pembe veya beyaz renklidir. Meyvesi 4-5 mm boyunda, köşeli, oval şekillidir. Meyveleri Temmuzda olgunlaşır. Özel kokuludur ve meyveleri sabit ve uçucu yağ, tanen ve reçine taşımaktadır. Ayrıca özellikle Kuzey Afrika, Orta Doğu, batı Çin, Hindistan ve Meksika mutfağında çok kullanılan bir baharattır [58].

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
Spesies : *Cuminum cyminum*

3.1.2. *Thymbra spicata* (Karabaş Kekiği)

Bu çalışmada kullanılan bir diğer test maddesi olan *Thymbra spicata* (Karabaş Kekiği) türü, yaklaşık 50 cm boyunda, tüylü, mor çiçekli, çalı görünümünde yaygın Akdeniz’de yaygın olarak bilinen bir bitkidir. *Thymbra spicata* Isparta ve yöresinde karabaş otu ve Orta Doğu ülkelerinde zahter adıyla tanınır. Çayı veya yağı mide ağrılarında analjezik etki için kullanılmakta olup ayrıca antiseptik, antiparaziter ve kan dolaşımına olan etkilerinden yararlanılmıştır. *Thymbra spicata* yağının safra asitlerini artırıcı etkisi olduğunda bilinmektedir. Uçucu ve kokulu bileşiklere sahiptir. Bu bitkinin en önemli uçucu yağ bileşikleri thymol ve karvakrol’dur [3, 59, 60].

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

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

3.1.3.Aseton

Aseton, ketonlar sınıfının ilk üyesi, dimetil ketondur. Kapalı formülü C_3H_6O , kaynama noktası $56\text{ }^\circ\text{C}$ 'dir [61]. Bu çalışmada Merck marka aseton kullanıldı. 5 ml besiyerine eklenecek olan aseton $2.5\ \mu\text{l/ml}$ olarak hesaplandı.

3.1.4. Kromozom Medyumu (Besi Yeri)

Bu çalışmada Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (Cat. No. F5023), hücre kültürü olarak kullanıldı. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki maddeler bulunmaktadır.

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

Bu medyum her tüpe 5 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve bu miktarlarda kullanıldı. Kültür steril olarak temin edildi.

3.1.5. Kolşisin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (Kolşisin) (Sigma) kullanıldı. Kolşisin çözeltisi steril saf su içerisinde hazırlandı ve kromozom medyumunun her ml'sinde $0.06\ \mu\text{g}$ olacak şekilde ($0.06\ \mu\text{g/ml}$) 5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edildi. Kolşisin'in bazı özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Kapalı formülü	: $C_{22}H_{25}NO_6$
Molekül ağırlığı	: 399.4
Etil asetat içeriği	: %3.4

Kloroform içeriği : < %0.1

3.1.6. Hipotonik Eriyik

% 0,5'lik KCl (Merck) alışmamızda kullanıldı. Çözelti ağzı kapalı bir cam kapta bidistile su içerisinde hazırlanarak buzdolabında (+4 °C) saklandı. Etüvde 37 °C'de ısıtılarak her çalışmadan 2 saat önce yeterli miktar alınıp kullanıldı.

3.1.7. Fiksatif

1 kısım glasiyal asetik asit, 3 kısım metanol (1/3: glasiyal asetik asit/metil alkol) karıştırılarak hazırlandı. Kullanılmadan 2 saat önce buzdolabında saklandı. Her preparat için yeni fiksatif hazırlandı.

3.1.8. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) alınan BrdU, 10 ml Chromosome Medium B içerisinde çözdürüldü (50 µg/10ml medium). Hazırlanan özeltiden besi yerine 10 µg/ml SCE alışması için eklendi (100µl).

3.1.9. Sorenson Tamponu

60 ml KH₂PO₄ ve 30 ml Na₂HPO₄ çözeltilerinden alınarak şaleye konulur. Daha sonra üzerine 10 ml giemsa boyası eklenir. Böylece %10'luk giemsa-sorenson fosfat tampon çözeltisi hazır hale gelir. Hazırlanılan özelti birçok pH değerlerine ayarlanabilir. Bu yöntemde her iki çözeltinin farklı miktarları kullanıldı ve pH istenilen değere ayarlandı [62].

3.1.10. Standart Saline Citrate (SSC) özeltisi

Bu özelti kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını ışınlamadan sonra artırmak amacıyla kullanıldı. Çözeltide 21.9 gr NaCl ve 11.05 gr trisodyum sitrat (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O) kullanıldı. Bir miktar saf su ile ayrı kaplarda çözdürülen bu iki madde, aynı kaba alınarak karıştırıldı. Hazırlanılan karışım 500 ml'ye saf su ile tamamlandı. Sonuç olarak hazırlanılan stok çözelti 5xSSC'dir ve buzdolabında saklandı.

Çalışmada stoktan 20 ml alınarak üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ilave edildi (elde edilen 1xSSC kullanıldı).

Bidistile su.....1000 ml.

pH 5.6 için: Çözelti 2 den 5 ml ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,0 için: Çözelti 2 den 12.3 ml ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,5 için: Çözelti 2 den 30 ml ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,8 için: Çözelti 2 den 50 ml ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 7,2 için: Çözelti 2 den 70 ml ve çözelti 1 den 100 ml.

3.1.11. Fosfat Tampon Çözeltisi

9.1 gr potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4)’dan alınarak 1 lt bidistile suya balon joje içerisinde tamamlanır. İçerisinde 11,9 gr sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) bulunan farklı bir balon joje de 1 lt bidistile su ile tamamlanır. Çözeltiler hazırlanarak oda sıcaklığında saklanır [62].

3.1.12. Giemsa

Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilen Giemsa boyası, çalışma içerisinde Sorenson tamponu içinde hazırlandı. Preparatların boyanmasında %10’luk ve %5’lik çözeltileri kullanıldı.

3.1.13. Entellan

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

3.1.14. Mitomisin-C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503)

Bu çalışmada *Streptomyces Caespitosus*’tan elde edilen Mitomisin-C Wakaki tarafından 1958 yılında keşfedilen bir antibiyotiktir [63]. Mitomisin-C, 334 dalton moleküler ağırlığında, organik sıvılar ve suda çözülebilen, viole-mavi renge sahip kristal ajandır

[64]. Yapılan çalışmalara göre ve DNA sentezin doğrudan etkileyerek, tümör büyümesinin indükleyici etki ettiği görülmüştür [65].

Mitomisin-C (MMC) Çözeltisinin Hazırlanması

Mitomisin-C'den 2 mg alınarak üzerine 2 ml steril bidistile su eklenerek MMC'nin çözdürülmesi sağlandı. Hazırlanan çözeltiden 5 ml'lik kültür ortamına eklendi ve MMC oranı 0.3 µg/ml olan çözeltiler hazırlanmış oldu.

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

1.Etanol (C₂H₅OH), (Merck, K35091886 537)

2.Kimyon ve Karabaş Kekliği uçucu yağları,

3.Potasyum di-hidrojen fosfat (KH₂PO₄), (Merck, A651773 524)

4.Sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), (Merck, K34623780 516)

5.Mitomisin C (MMC) 2mg, (Sigma, M 0503)

6. Giemsa. (Merck, HX694620)

3.2. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları

3.2.1. Hassas Terazî

0,0001 gr hassasiyetindeki özel cam paravanlarla korunan PRECİSA XB 220 A marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanıldı.

3.2.2. Santrifüj

15 dk'lık zaman ayarlayıcı, 8 tüp kapasiteli ve 5000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızına sahip ELEKTRO-MAG marka santrifüj kullanıldı.

3.2.3. Mikroskop

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

3.2.4. Etüv

0 °C - 100 °C ayarlanabilir Elektro-mag M 420 Bp marka etüv deneyde hücre kültürünün yapımında ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye ısıtılmasında kullanıldı.

3.2.5. 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)

3.2.6. Sarf Malzemeler

1. Heparin (Roche)
2. Giemsa (Merck, 5400512)
3. KH_2PO_4 (Merck, 9021622)
4. $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Merck K1 690176)
5. Glasial asetik asit (Merck, 24K18855556)
6. Metanol (Merck, 502K05275408)
7. İmmersiyon yağı (Merck, 09403569)
8. KCl (Merck, 340TA611835)
9. Alkol (Merck)

10. Distile su
11. Tüplük
12. Çeşitli cam malzemeler
13. Konik tabanlı 10 ml'lik steril kültür tüpü
14. Enjektör
15. Çeşitli ebatlarda puarlar
16. Pasteur pipeti
17. Lam
18. Lamel

3.3. Ekstraksiyon

Çalışmada kullandığımız Kimyon (*C. cyminum*) ve Karabaş Kekik (*T. spicata*) bitkilerinin yaprak ve tohum kısımlarından uçucu yağları çıkarıldı. Ekstrakt çıkarma işleminde NON ASBESTOS marka Clevenger cihazı kullanıldı. 40 gr bitki için 400 ml distile su ilave edilerek yaklaşık olarak 3 saatte uçucu yağ çıkarıldı ve bu işlem yeterli uçucu yağ elde edilinceye kadar tekrarlandı.

Elde edilen uçucu yağdan 100 µl alınarak 900 µl asetonla karıştırıldı. Sonuç olarak 1 kısım yağ 9 kısım aseton karıştırılmış oldu [66].

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*) dozu:

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

1000 µl stok çözeltide

100 µl uçucu yağ bulunuyorsa

(100 µl uçucu yağ+900 µl aseton)

X µl

0.25 µl uçucu yağ bulunur

X = 2.5 µl olarak bulunur

Bulunan sonuçla stoktan 2.5 µl alınarak 5 ml besiyerimize eklendi.

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

0.10 µl/ml uçucu yağ için 5 ml besiyerine 0.10 µl/ml x 5 ml = 0.5 µl uçucu yağ gereklidir. Bu doz besiyerine şu şekilde ilave edildi,

1000 µl stok çözeltide

100 µl uçucu yağ bulunuyorsa

(100 µl uçucu yağ+900 µl aseton)

X µl

0.5 µl uçucu yağ bulunur

X = 5 µl olarak bulunur

Bulunan sonuçla 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 µl/ml x 5 ml = 0.75 µl uçucu yağ gereklidir. Bu doz besiyerine şu şekilde ilave edildi,

1000 µl stok çözeltide

100 µl uçucu yağ bulunuyorsa

(100 µl uçucu yağ+900 µl aseton)

X µl

0.75 µl uçucu yağ bulunur

X = 7.5 µl olarak bulunur

Bulunan sonuçla stoktan 7.5 µl alınarak 5 ml besiyerimize eklendi.

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

0.20 µl/ml uçucu yağ için 5 ml besiyerine 0.20 µl/ml x 5 ml = 1.0 µl uçucu yağ gereklidir. Bu doz besiyerine şu şekilde ilave edildi,

1000 µl stok çözeltide 100 µl uçucu yağ bulunuyorsa

(100 µl uçucu yağ+900 µl aseton)

X µl 1.0 µl uçucu yağ bulunur

X = 10 µl olarak bulunur

Bulunan sonuçla stoktan 10 µl alınarak 5 ml besiyerimize eklendi.

Metod

3.4. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Speit ve Haupter (1985)'in bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation=SCD) sağlamak amacıyla geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanıldı [67]. Sağlıklı, yaşları birbirine yakın ve sigara içmeyen on bayan ve on erkekten alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri steril şartlarda kromozom medyumlarına (5ml) 12 damla ekildi. Önceden steril şartlarda hazırlanan BrdU çözeltisinden her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde (hazırlanan BrdU solüsyonundan 100 µl) yine steril şartlarda ve ilave edilerek iyice karıştırıldı (50 µg BrdU/100 µl besi yeri). Hazırlanan hücre kültürü etüvde 37⁰C'de 72 saat için inkübe edildi. Kültür süresinin bitimine 24 saat kala Kimyon ve Karabaş Kekiği uçucu yağlarının insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için son olarak kültür tüplerine ilave edildi.

MMC (Mitomisin-C), bidistile suda çözülerek pozitif kontrol olarak kullanıldı. Son konsantrasyon olan MMC'nin insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür bitimine 24 saat kala 0.3 µg/ml MMC kültür tüplerine eklendi. Aseton (C₃H₆O) test kontrol olarak, distile su (%1) ise negatif kontrol olarak kullanıldı [68].

70. saate ulaşan kültüre (kültür süresinin bitiminden 2 saat önce) hazırlanan kolşisin çözeltisinden her tüpe ilave edildi (0.06 µg/ml) ve iyice karıştırmak amacı ile tüpler yavaş bir şekilde sallandı. 37⁰C'de 2 saat süresince hücreler kolşisin ile ön muameleye tabi tutuldu. Kültür süresinin bitiminde (72. Saatin sonunda) kültür tüpleri 10 dk 2000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen kültür tüplerinin üzerindeki süpernatantı atıldı. Tüpün dibinde kalan 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra etüvde 37⁰C'de tutulan hipotonik çözelti tüplere eklendi. Hücrelerde kümeleşme olmasını önlemek için çözelti tüplere karıştırılarak ve damla damla her tüpe 5 ml ilave edilerek ağızları kapalı şekilde etüve konuldu. Hipotonik çözelti eklenen tüpler 37⁰C'de 30 dk etüvde bekletildi. Sürenin bitiminde 10 dk 2000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Her tüpe 5 ml olarak soğuk fiksatif yavaş bir şekilde karıştırılarak ilave edildi. 2000 rpm'de 10 dk fiksatif ile muamele edilen hücreler santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Bu işlemin 3 kez tekrarlanması ile tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Santrifüj işleminin sonunda dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant kısmı atılarak kalan sıvı ile preparatlar hazırlandı. Pasteur pipeti ile tüpün dibinde toplanan hücreler karıştırılarak homojen hale getirilerek pasteur pipetine 4-5 damla bu hücre süspansiyonundan çekildi. Daha önce temizlenmiş lamaların üzerine pasteur pipetinden 1'er damla 50 cm yükseklikten farklı alanlara damlatıldı (her lama 3-4 damla). Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması sırasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilerek, hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılmaları sağlandı. Kurumak üzere preparatlar oda ısısında 24 saat bekletildi.

3.4.2. Preparatların Boyanması

Speit ve Haupter (1985)'in bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation=SCD) sağlamak amacıyla geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır [67]. Kurutulan preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri film gibi örtülecek biçimde Sorenson tamponu ile kapatıldı. 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınıp bu karışımın distile su ile 100 ml'ye tamamlayarak ışınlama

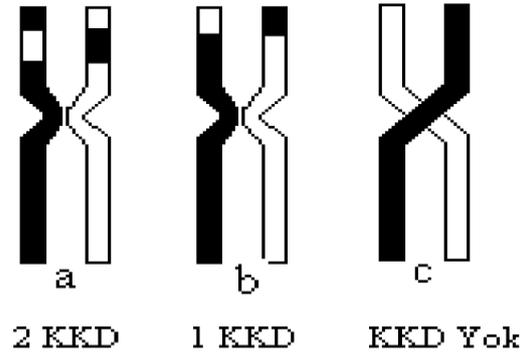
çözeltisi hazırlandı (pH=6.8). Kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını ışınlama çözeltisinin azlığı veya fazlalığının önemli derecede etkilediği görüldü. Bu sebeple ince bir tabaka halinde preparatların üzeri ışınlama çözeltisi ile örtüldü. Bu preparatlar, 30 W'luk 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen karanlıkta 15 cm yükseklikten tek ultraviyole lamba ile 30 dk ışınlandı. Işınlanma sonunda preparatlar 1xSSC eriyi içerisinde 58-60°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk etüvde inkübe edildi. % 5'lik Giemsa boya çözeltisi inkübasyon süresi tamamlanmadan 15 dk önce, 5 ml Giemsa, 5 ml tampon A ve 5 ml tampon B'nin karıştırılarak üzeri 85 ml saf su ile tamamlanmasıyla hazırlandı (pH=6.8). Hazırlanan bu boya filtre kağıdından dik bir şale içerisinde süzüldü. İnkübasyon süresi tamamlandığında 1xSSC solüsyonundaki preparatlar alınarak direkt olarak giemsa boya çözeltisi içerisine konuldu ve 20 dk bekletildi. Süre bitiminde boya içerisinden çıkarılan preparatlar üç ayrı kaba konulan saf sudan geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatların daimi hale gelmesi için entellan ile kapatıldı. Entellanın kuruması ile birlikte preparatlar mikroskop altında incelendi.

3.4.3. Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimi preparatlar immersiyon objektifi ile Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda incelendi (10x100=1000 büyütmede).

3.4.4. KKD ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması KKD Sayısının Saptanması

Kan kültürüne ait iyi dağılmış preparatlardan, bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılması ile ikinci mitozu geçiren 100 metafazda KKD sayısı belirlendi [69]. Kromozom kollarının uç kısmında parça değişimi olmuş ise bir KKD olarak ve eğer kromozom kollarının orta kısmında parça değişimi olmuş ise iki KKD olarak sayıldı. Fakat bu sonuçları incelerken kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapmışlar ise bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi [69].

Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması

Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş Kekik (*Thymbra spicata*) bitkilerinin ekstraktlarının DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile RI hesaplandı. Bu hesaplamalar için rastgele seçilen 100 hücre incelendi. Bu incelemeler esnasında görülen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılarak RI aşağıdaki formülle hesaplandı.

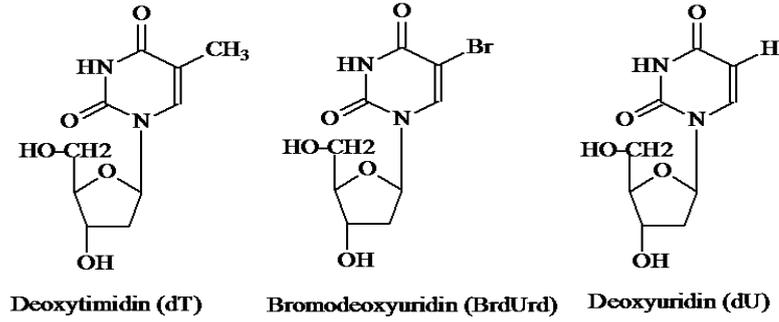
$$RI = (1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3) / 100$$

M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı

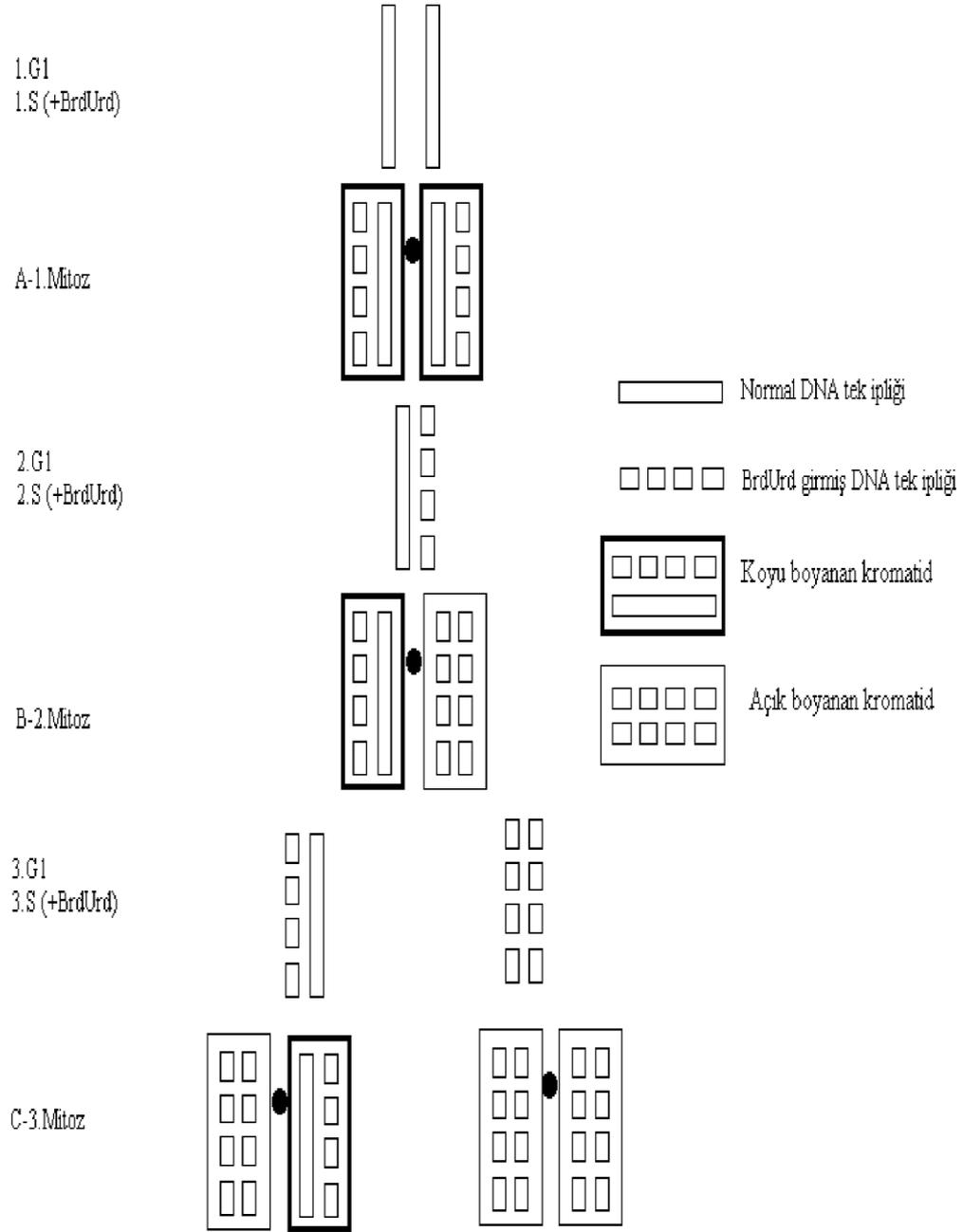
1., 2. ve 3. metafazlar şu yöntemle ayırt edildi [70]. BrdU, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşikleridir ve aralarındaki tek fark taşıdıkları benzen halkasındaki 5. C atomuna dT'de CH₃, BrdU'de Br ve dU'da H atomunun bağlı olmasıdır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdU) ve Deoxyuridin (dU) 'in kimyasal yapıları.

BrdU kültür ortamına koyulduğunda, hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) dT'in yerine BrdU yeni sentezlenen DNA dallarından birinin (polinükleotid ipliği) içine geçmektedir. Böyle hücreler 1. Mitoza uğradıklarında meydana gelen yeni hücelere ait kromozomların her iki kromatidi de koyu renkte boyanmaktadır. S (2. S fazı) fazına giren bu hücreler DNA ipliğinin birisi BrdU diğeri dT taşıdığından, DNA replike olduğunda tekrar ortamda bulunan BrdU'ü yapılarına almaktadırlar. Hücreler 2. Mitoza uğradıklarında ise yavru hücrelerin kromozomlarının kromatidlerinden biri koyu boyanırken diğeri açık boyanmaktadır. Çünkü, koyu boyanan kromatidde DNA ipliğinin biri dT taşıırken, diğeri BrdU taşımaktadır. Açık boyanan kromatidi oluşturan DNA ipliğinin ikisi de BrdU taşımaktadır. BrdU bulunan ortamda S fazına (3. S fazı) böyle yavru hücreler tekrar girdiklerinde ortamdaki BrdU'yu yapılarına alırlar. Bu hücrelerin kromozomlarından birini oluşturan DNA ipliğinden biri BrdU'yu, diğeri dT'uyu taşıdığından 3. mitozu girdiğinde yavru hücrelerin kromatidlerinden biri koyu diğeri açık renkte boyanmaktadır. 3. Mitoza uğradıklarında açık renkte boyanan kromatidleri taşıyan hücreler ise kromatidleri oluşturan DNA ipliklerinin her ikisi de BrdU taşıdığından yeni yavru hücrelerin kromozomlarını oluşturan kromatidlerin her ikisi de açık boyanmaktadır. Bu nedenle 3. Mitoz sonucu oluşan yeni yavru hücrelerin bazılarının her iki kromatidi açık boyanırken, bazılarının kromatidlerinden biri açık diğeri koyu renkte boyanmaktadır. Kısaca özetlersek, BrdU'lu ortamda bulunan hücrelerin kromozomlarını oluşturan kromatidlerin her ikisi, birinci mitoz sonucu oluşan yavru hücrelerde koyu renkte boyanır. İkinci mitoz sonucu oluşan yavru

hücrelerde kromatidlerin biri koyu diğeri açık boyanır. Üçüncü mitoz sonucu oluşan hücrelerde ise hücrelerin bir kısmında kromatidlerin biri açık, diğeri koyu renkte boyanırken, diğeri bir kısmında ise kromatidlerin ikisi de açık boyanmaktadır. Şematik olarak Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Bu boyanma şekliyle hücrelerin kaçınıcı mitozda olduğu anlaşılabilir. Bu hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğeri kromatidi de koyu renkte boyanmaktadır. Böyle hücrelerde 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Metafaz esnasında bulunan 100 hücre incelenerek kaçınıcı mitoz evresinde oldukları belirlenmiştir. Bu sonuca göre replikasyon indeksi (RI) formülle hesaplandı.



Şekil 3.3. BrdU'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması [70].

Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Olympus marka mikroskopta 1000 büyütmede fotoğraflar çekildi.

4. BULGULAR

4.1. Kimyon (*C. cyminum*) ve Karabaş Kekik (*T. spicata*) Bitki Uçucu Yağlarının Aseton Karışımı Muamele Edilen İnsan Periferal Lenfositlerinde KKD Üzerine Etkisi

C. cyminum ve *T. spicata* uçucu yağlarının 0.05 µl/ml, 0.10 µl/ml, 0.15 µl/ml ve 0.20 µl/ml dozları ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde belirlenen ortalama kardeş kromatid sayıları (KKD) tablo 4.1'de görülmektedir. Her iki kontrolle karşılaştırıldığı zaman, sayılan 100 hücrede, *C. cyminum* ve *T. spicata* uçucu yağlarının insan lenfositlerinde KKD sayısını artırdığı görüldü (Çizelge 4.1 ve 4.2). Kimyon doz ve SCE arasında $r=0.94$ pozitif korelasyon bulunmuş ve kekik doz ve SCE arasında $r=0.99$ pozitif korelasyon bulundu (Grafik 4.1 ve 4.2).

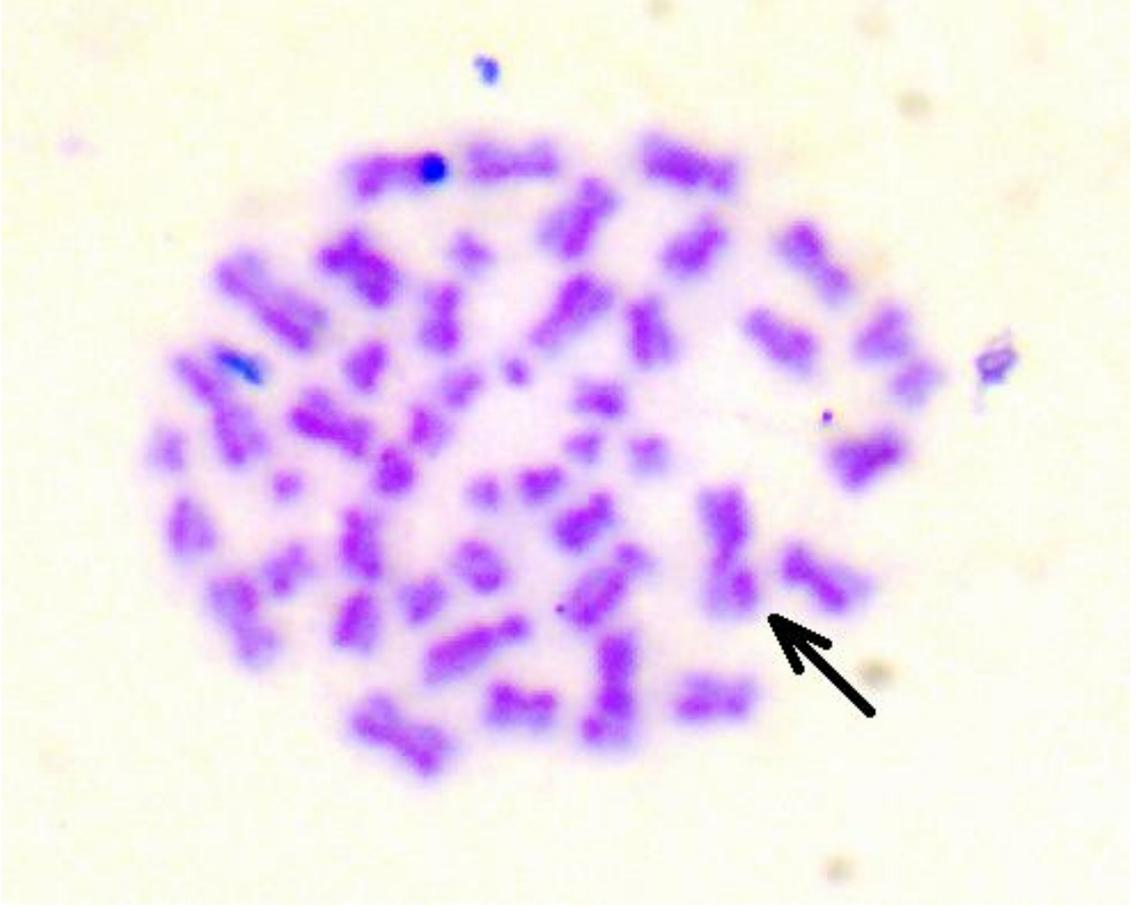
Tablo 4.1. Farklı dozlarda Kimyon ve Karabaş Kekik Uçucu Yağlarının Aseton karışımı ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı.

Gruplar	Konsantrasyon (µl/ml)	Muamele süresi (saat)	Toplam Hücre	KKD sayısı	±SEM (%)
Negatif Kontrol	-	24	100	0.3	±0.3
Aseton	2.5 µl/ml	24	100	1	±0.57
Kimyon Uçucu Yağı	0.05 µl/ml	24	100	2.5*	±0.28
“	0.10 µl/ml	24	100	3.16*	±0.16
“	0.15 µl/ml	24	100	5.5*	±0.28
“	0.20 µl/ml	24	100	10*	±0.57
Karabaş Kekik Uçucu Yağı	0.05 µl/ml	24	100	3.4*	±0.20
“	0.10 µl/ml	24	100	5.5*	±0.28
“	0.15 µl/ml	24	100	8.4*	±0.20
“	0.20 µl/ml	24	100	11.83*	±0.44
Pozitif Kontrol (MMC)	0.3 µg/ml	24	100	64	±0.57

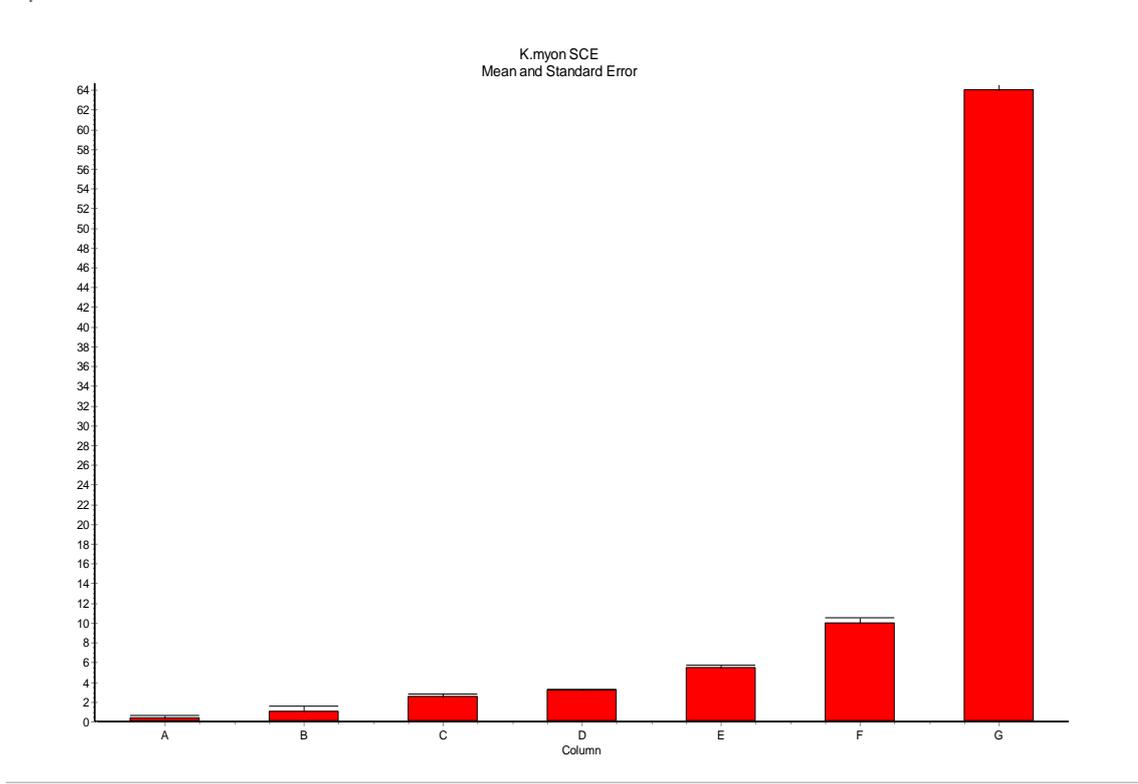
Dunnett T testi ile karşılaştırıldı.

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

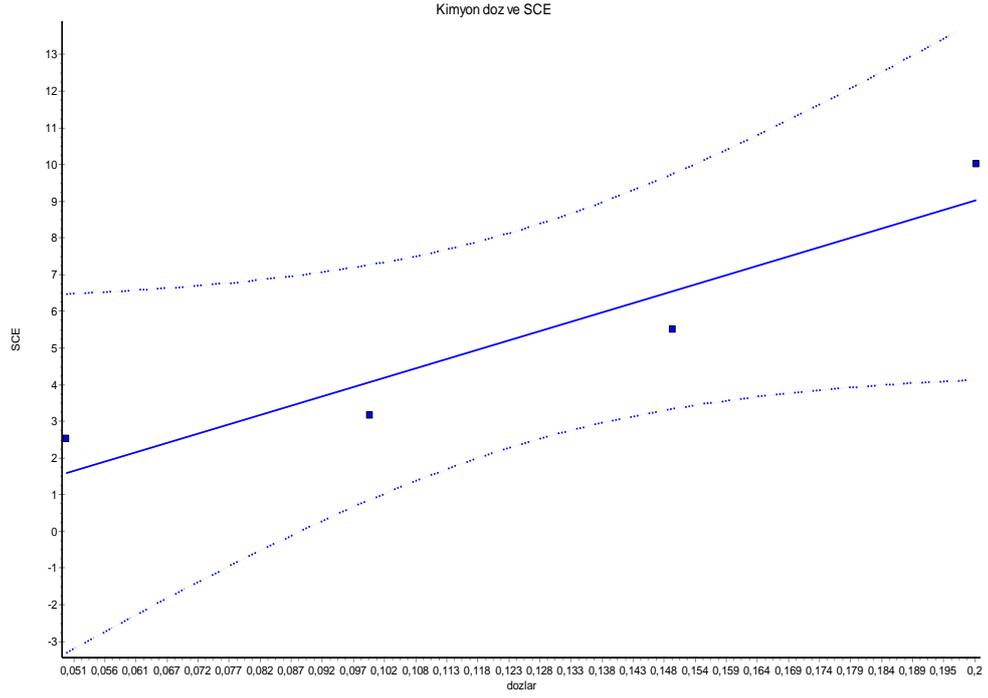
*Kontrol ve solvent kontrole göre önemli ($p < 0.01$).



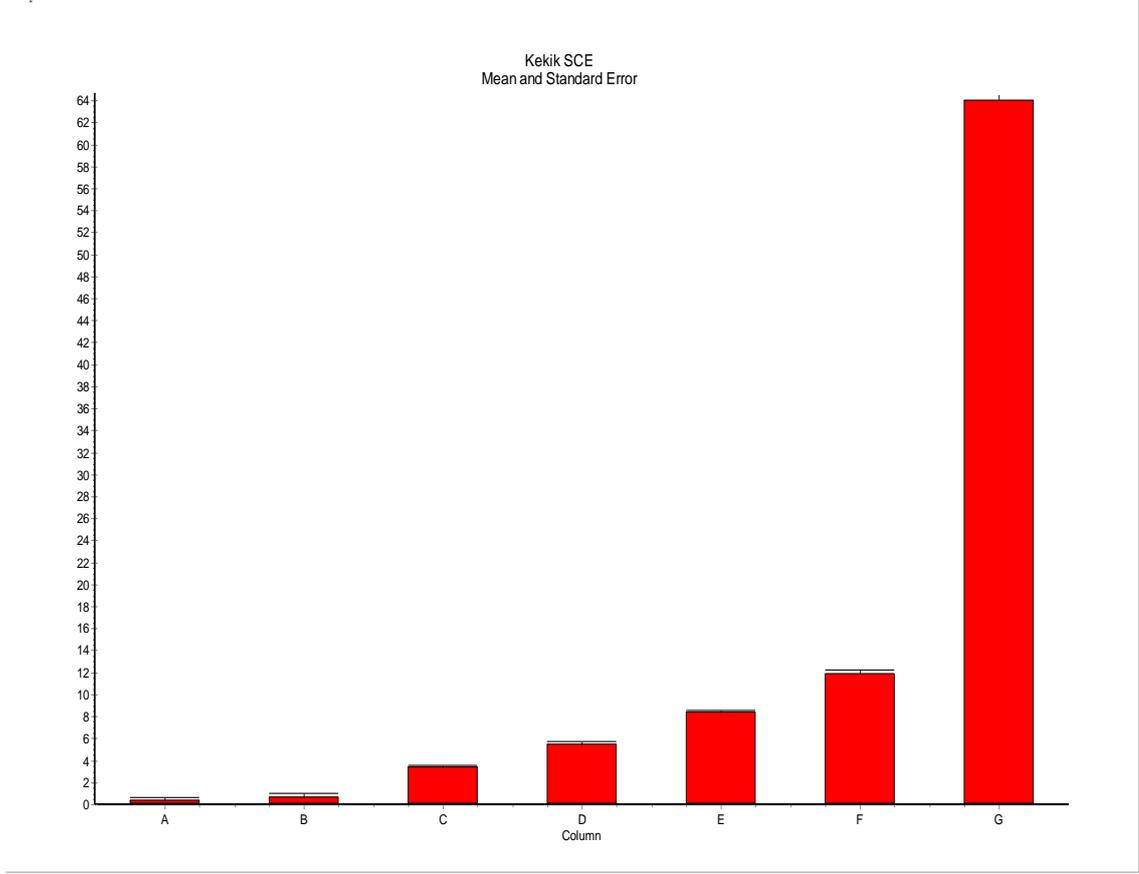
Resim 4.1. KKD'n görüldüğü M2 evresindeki metafaz plağı.



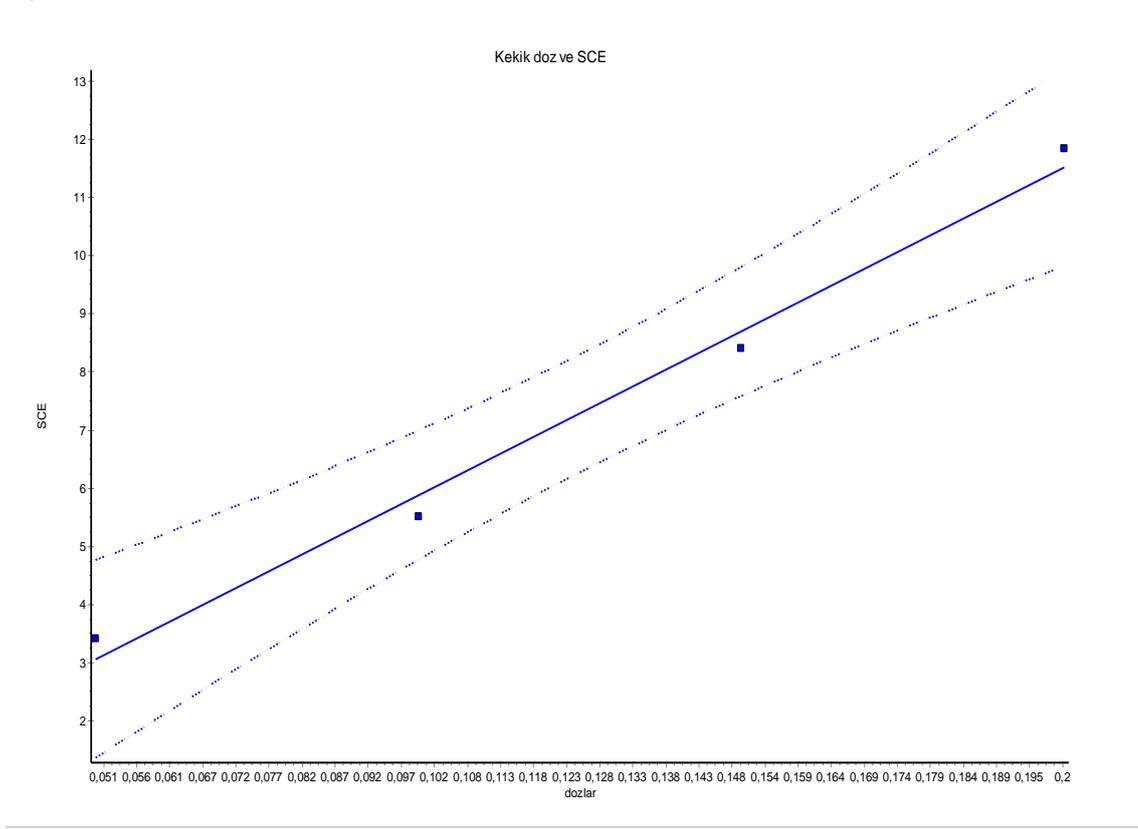
Çizelge 4.1. Farklı dozlarda Kimyon Ekstraktlarının Aseton karışımı ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı. (A: Negatif Kontrol, B: Aseton (2.5 µl/ml), C: Kimyon (0.05 µl/ml), D: Kimyon (0.10 µl/ml), E: Kimyon (0.15 µl/ml), F: Kimyon (0.20 µl/ml), G: Pozitif Kontrol (MMC) (0.3 µg/ml)).



Grafik 4.1. Kimyon doz ve SCE arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0.94$).



Çizelge 4.2. Farklı dozlarda Kekik Ekstraktlarının Aseton karışımı ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı. (A: Negatif Kontrol, B: Aseton (2.5 µl/ml), C: Kekik (0.05 µl/ml), D: Kekik (0.10 µl/ml), E: Kekik (0.15 µl/ml), F: Kekik (0.20 µl/ml), G: Pozitif Kontrol (MMC) (0.3 µg/ml)).



Grafik 4.2. Kekik doz ve SCE arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0.99$).

4.2. Karabaş Kekik (*T. spicata*) Uçucu Yağının Aseton Karışımı Muamele Edilen İnsan Periferal Lenfositlerinde KKD Üzerine Etkisi

T. spicata uçucu yağının 0.05 $\mu\text{l/ml}$, 0.10 $\mu\text{l/ml}$, 0.15 $\mu\text{l/ml}$ ve 0.20 $\mu\text{l/ml}$ dozları ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde belirlenen replikasyon indeksi (RI) ve M1, M2 ve M3 oranları tablo 4.2'de görülmektedir. Her iki kontrolle karşılaştırıldığı zaman sayılan 100 hücrede, *T. spicata* ekstraktının insan lenfositlerinde RI'ni azalttığı görülmektedir (Çizelge 4.3). *T. spicata* ekstraktının 0.10 $\mu\text{l/ml}$, 0.15 $\mu\text{l/ml}$ ve 0.20 $\mu\text{l/ml}$ dozları kontrol ve solvent kontrole göre önemli ($p<0.01$). Kekik doz ve RI arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r=-0.94$) (Grafik 4.3).

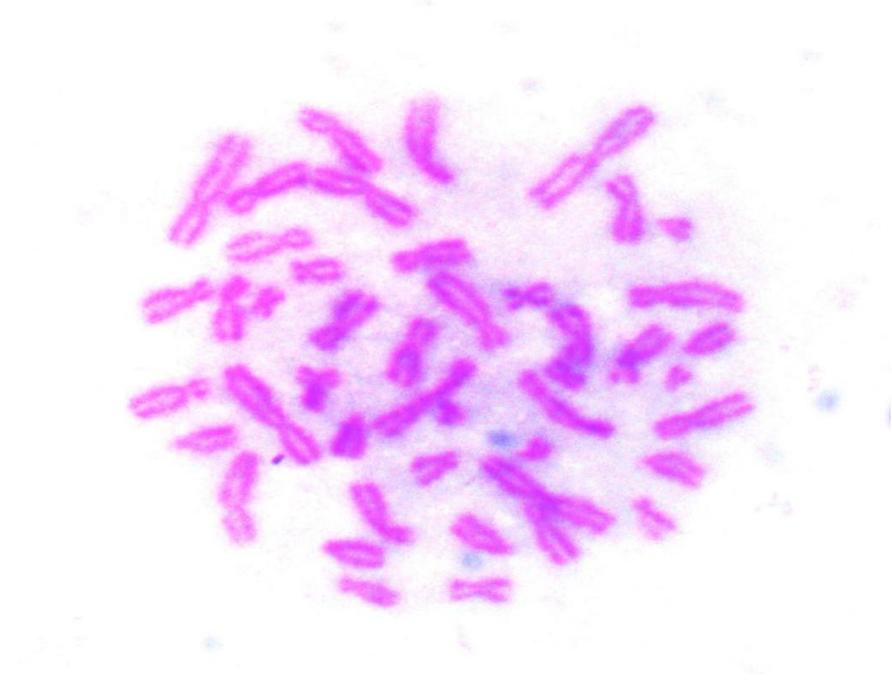
Tablo 4.2. Kontrol ve Karabaş Kekik Uçucu Yağ Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi (%).

Gruplar	Konsantrasyon (µl/ml)	Muamele Süresi (saat)	Toplam Hücre	M1	M2	M3	RI Sayısı	±SEM (%)
Negatif Kontrol	-	-	100	10	25	65	2.57	±0.02
Aseton	2.5 µl/ml	24	100	35	20	45	2.25*	±0.08
Karabaş Kekik Uçucu Yağı	0.05 µl/ml	24	100	12	38	50	2.44	±0.05
“	0.10 µl/ml	24	100	48	12	40	1.90*	±0.05
“	0.15 µl/ml	24	100	59	11	30	1.75*	±0.02
“	0.20 µl/ml	24	100	60	17	23	1.58*	±0.02
Pozitif Kontrol (MMC)	0.3 µg/ml	24	100	89	5	6	1.20	±0.02

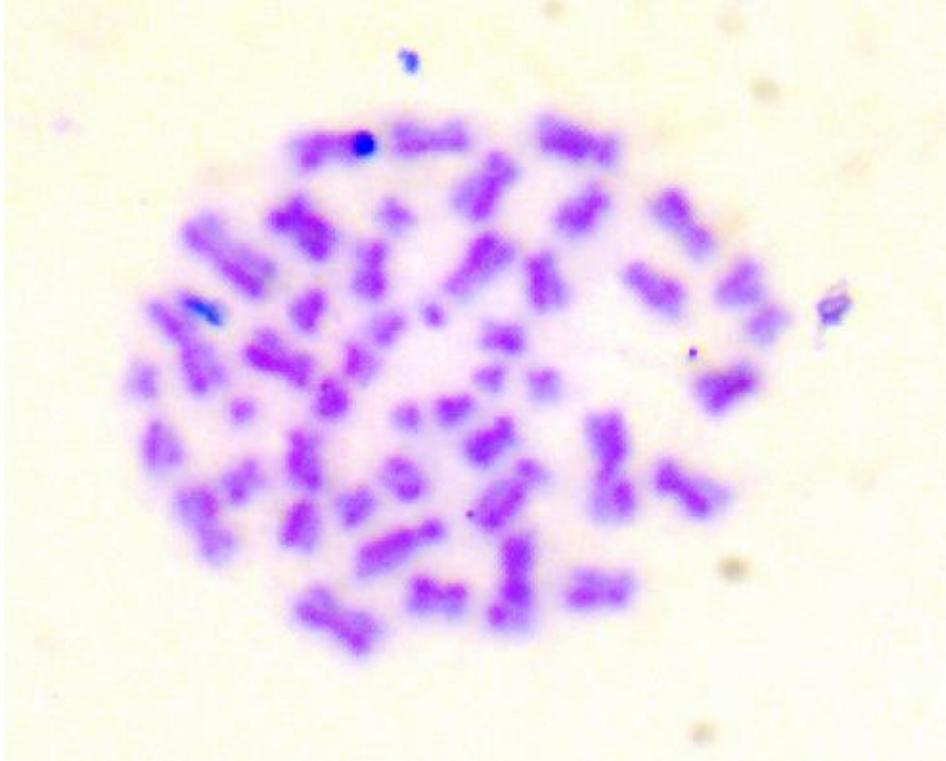
Dunnet T testi ile karşılaştırıldı.

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

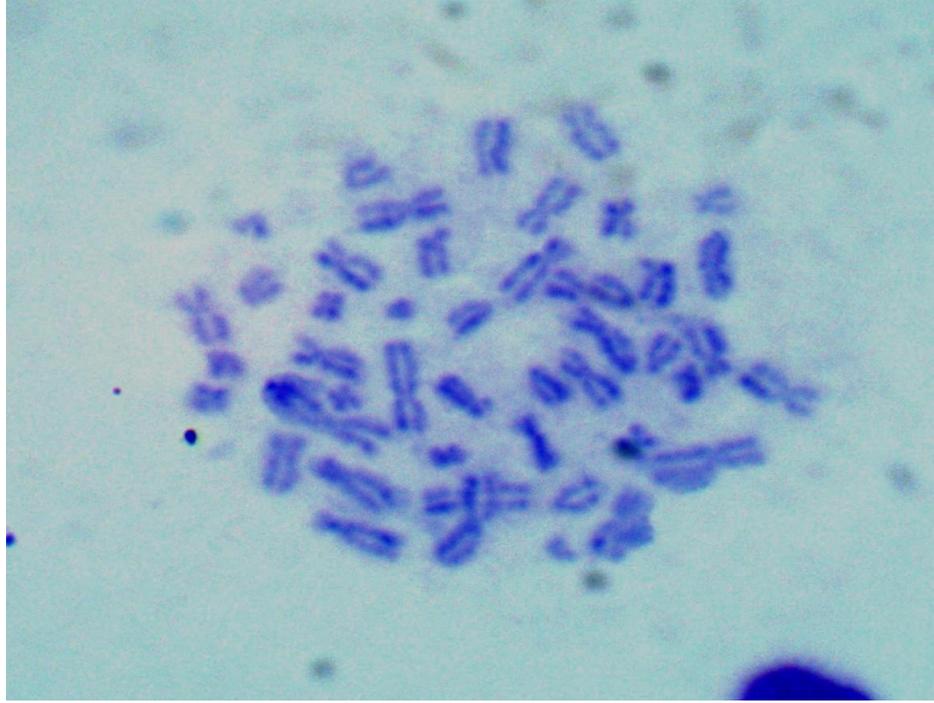
*Kontrol ve solvent kontrole göre önemli ($p<0.01$).



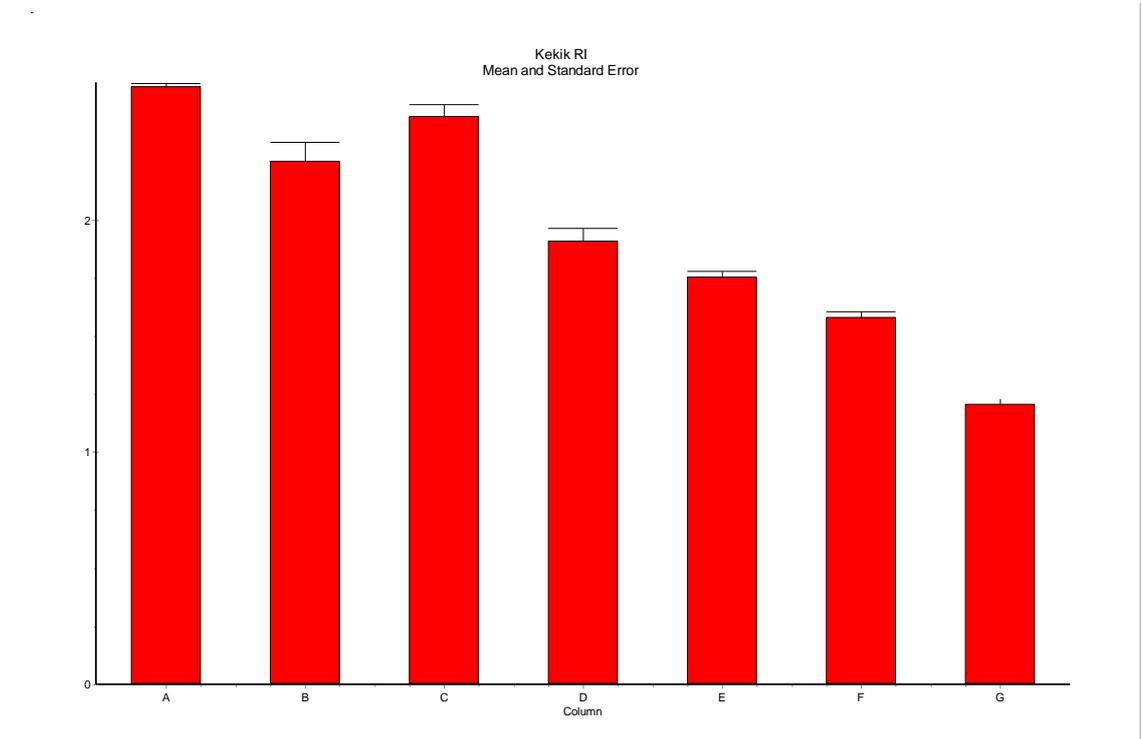
Resim 4.2. M1 evresindeki metafaz plağı



Resim 4.3. M2 evresindeki metafaz plağı.

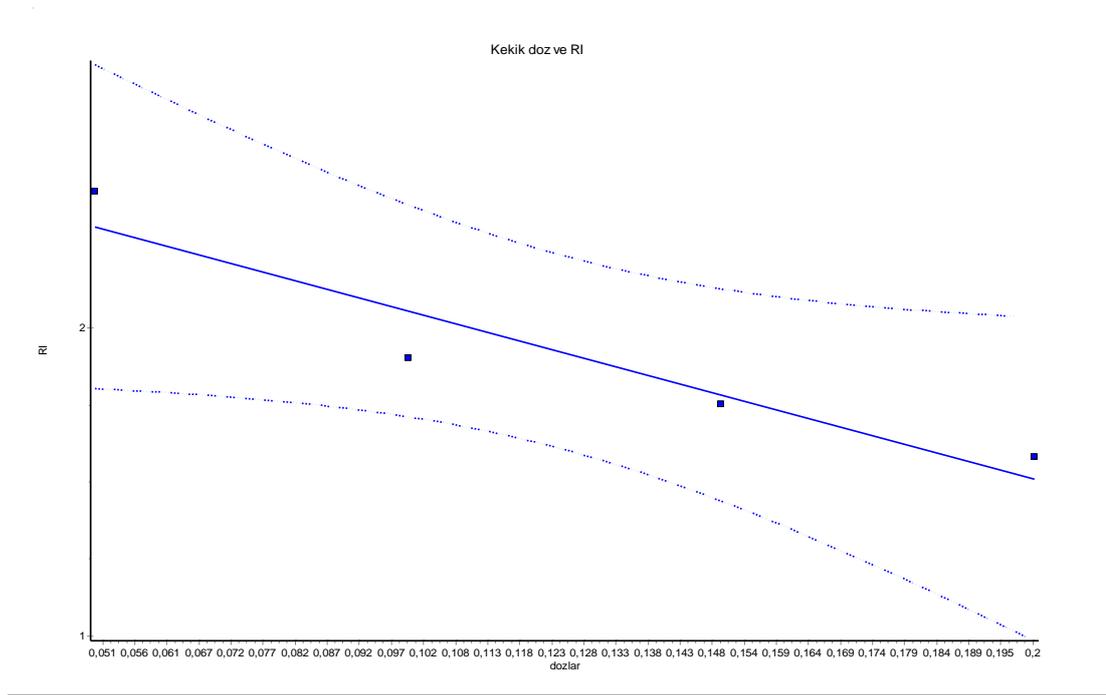


Resim 4.4. M3 evresindeki metafaz plağı.



Çizelge 4.3. Kontrol ve Kekik Ekstrakt Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeks Oranları (A: Negatif Kontrol, B: Aseton (2.5 μ l/ml), C: Kekik (0.05 μ l/ml), D: Kekik (0.10 μ l/ml), E: Kekik (0.15 μ l/ml), F: Kekik (0.20 μ l/ml), G: Pozitif

Kontrol (MMC) (0.3 µg/ml).



Grafik 4.3. Kekik doz ve RI arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r=-0.94$).

4.3. Kimyon (*C. cuminum*) Uçucu Yağının Aseton Karışımı Muamele Edilen İnsan Periferik Lenfositlerinde KKD Üzerine Etkisi

C. cuminum uçucu yağının 0.05 µl/ml, 0.10 µl/ml, 0.15 µl/ml ve 0.20 µl/ml dozları ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde belirlenen replikasyon indeksi (RI) ve M1, M2 ve M3 oranları tablo 4.3'de görülmektedir. Her iki kontrolle karşılaştırıldığı zaman sayılan 100 hücrede, *C. cuminum* ekstraktının insan lenfositlerinde RI'ni azalttığı görülmektedir (Çizelge 4.4). *C. cuminum* ekstraktının 0.05 µl/ml, 0.10 µl/ml, 0.15 µl/ml ve 0.20 µl/ml dozları kontrol ve solvent kontrole göre önemli ($p<0.01$). Kimyon doz ve RI arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r=-0.95$) (Grafik 4.4).

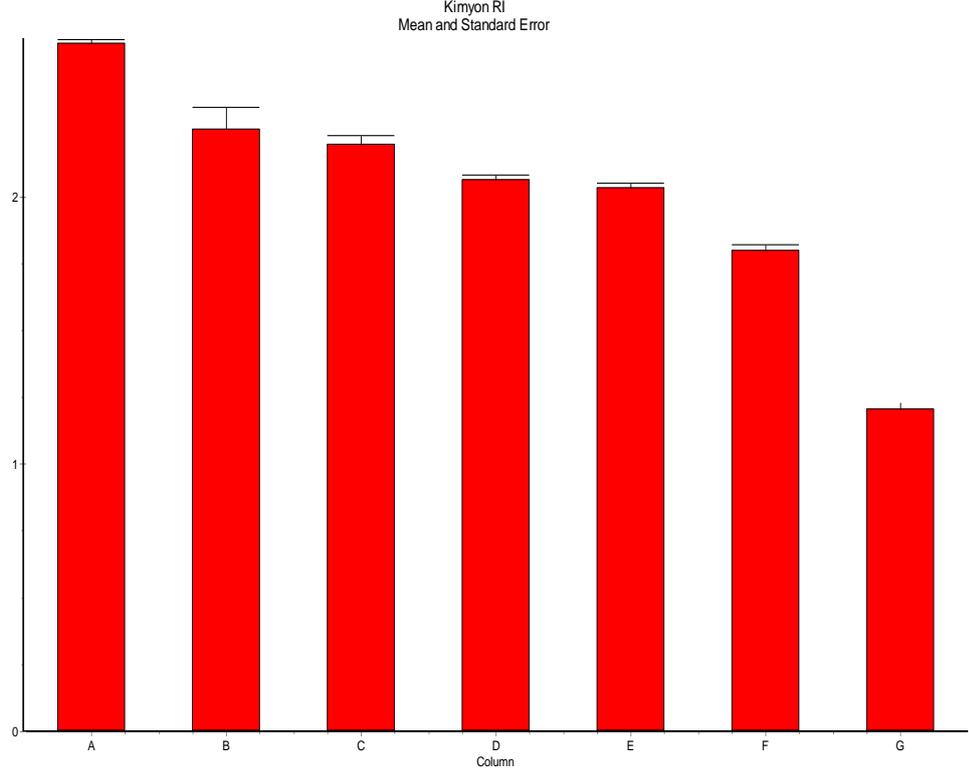
Tablo 4.3. Kontrol ve Kimyon Ekstrakt Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi (%).

Gruplar	Konsantrasyon (μl/ml)	Muamele Süresi (saat)	Toplam Hücre	M1	M2	M3	RI Sayısı	\pmSEM (%)
Negatif Kontrol	-	-	100	10	25	65	2.57	\pm 0.02
Aseton	2.5 μ l/ml	24	100	35	20	45	2.25*	\pm 0.08
Kimyon Uçucu Yağı	0.05 μ l/ml	24	100	36	15	49	2.19*	\pm 0.03
“	0.10 μ l/ml	24	100	43	10	47	2.06*	\pm 0.01
“	0.15 μ l/ml	24	100	42	14	44	2.03*	\pm 0.01
“	0.20 μ l/ml	24	100	40	36	24	1.79*	\pm 0.02
Pozitif Kontrol (MMC)	0.3 μ g/ml	24	100	89	5	6	1.20	\pm 0.02

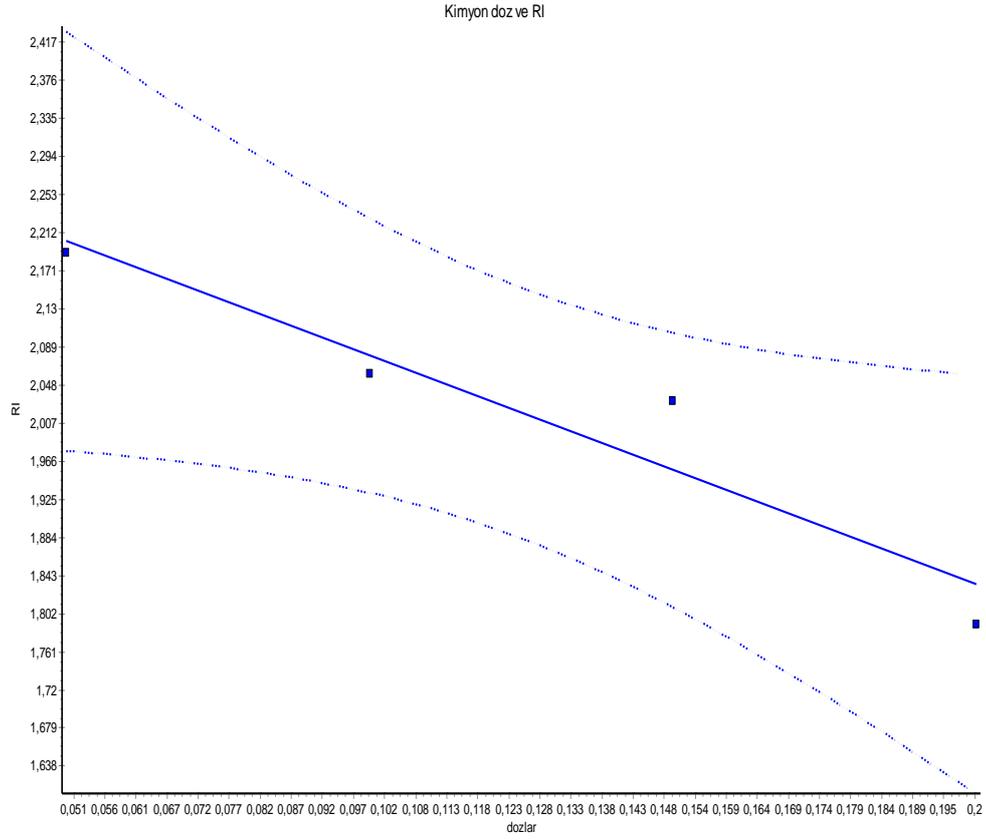
Dunnet T testi ile karşılaştırıldı.

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

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



Çizelge 4.4. Kontrol ve Kimyon Ekstrakt Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeks Oranları (A: Negatif Kontrol, B: Aseton (2.5 µl/ml), C: Kimyon (0.05 µl/ml), D: Kimyon (0.10 µl/ml), E: Kimyon (0.15 µl/ml), F: Kimyon (0.20 µl/ml), G: Pozitif Kontrol (MMC) (0.3 µg/ml)).



Grafik 4.4. Kimyon doz ve RI arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r=-0.95$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatürde Karabaş Kekiği uçucu yağ bileşeni olan Thymol'le yapılan iki ayrı çalışmada; bronşit, öksürük, nezle ve ekzema gibi bazı hastalıklarda, antiseptik olarak kullanıldığı görülmüştür. Aynı zamanda Thymol'ün genotoksik etkisi KKD testiyle belirlenerek, Thymol'ün yüksek dozlarda önemli derecede KKD sayısını artırdığı, fakat bu sonuç istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır [71, 72].

Batı ve Güney Anadolu'da yetişmekte olan Kara kekik'in *Thymbra spicata L.* türünün yaprak ve çiçeklerinden ibaret olduğunu ve % 1.2-1.5 arasında uçucu yağ taşıdığını, bu uçucu yağda fenol türevi olarak özellikle carvacrol (% 45) bulunduğu saptanmıştır [73].

Mentha, *Melissa officinalis* ve *Thymus vulgaris* bitkilerinde sıcak kuru, güneşli havalarda uçucu yağ miktarının düştüğü görülürken, nemli ve soğuk havalar da ise uçucu yağ miktarının arttığı gözlenmiştir [74].

MMC'nin varlığında, insan lenfosit hücrelerinde yapılan bu çalışmada; carvacrol'ün bütün dozlarda SCE'nin oluşumunu artırmadığı, hatta MMC'nin neden olduğu SCE oranlarını inhibe ettiği görülmüştür [75].

Unda beyazlatma maddesi olarak kullanılan benzol peroksit'in; genotoksik etkisinin olup olmadığını insan periferik lenfositlerinde *in vitro* kardeş kromatid değişimi (SCE) testi ile araştırılan bu çalışmada; benzol peroksit'in genel olarak KKD'yi artırdığı, fakat bu artışın yalnızca en yüksek konsantrasyondaki (100 µg/ml) benzol peroksit ile 48 saatlik uygulama süresinde istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlenmiştir [76].

KKD yöntemi kullanılarak yapılan bir başka çalışmada; değişik tiplerdeki lösemili olgularda genomik instabilitenin rolünün değerlendirilmesi sonucunda; KKD sıklığının düşük oranda olmasını lösemili olgularda beklenen olası bir durum olarak karşılamış ve genomik instabilitenin araştırılmasında informatif olmayacağını öne sürmüştür [77].

Literatürde CO zehirlenmesinde KKD çalışması ile ilgili yeterli düzeyde çalışmaya rastlanılmamış olup CO zehirlenmelerinin sıklığı göz önüne alınarak yapılan bu çalışmada, CO zehirlenmesinin genotoksik etkisi ve bağışıklık sistemimizin en önemli hücresel elemanları olan lenfositlerin yaşam süresi üzerine etkileri belirlenmiştir. CO zehirlenmelerinde CO'nin hücre üzerindeki toksik etkileri ve canlıların genetik yapısında

mutasyon oluşturma ihtimali sebebiyle ciddi bir sağlık problemi olarak görülmüştür [78].

Genotoksisite testleri olan; kromozom aberasyonu, mikronukleus ve kardeş kromatid değişimi yöntemleri ile Miyelodisplastik sendrom olgularında genomik instabilitenin rolünü belirlemek ve bu yöntemlerin birbirleriyle olan ilişkisini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada; MDS'lu olgulardaki MN ve KKD sıklığındaki anlamlı artış, genomik instabilite için MN ve KKD'nin informatif bir biyolojik gösterge olduğu görülmektedir [79].

Karabaş Kekliği olarak da bilinen Isparta yöresinde yetişen TSL (*Thymbra spicata L.*); değişik dozlarda TSL yağının ve atorvastatinin (ATS) sıçanların karaciğer, kalp ve böbrek dokularındaki histopatolojik etkilerine bakılarak; TSL ve ATS'nin genel anlamda rutin biyokimyasal tetkikleri bozmadığı görülmüştür. TSL'nin hiperkolesterolemide etkili olabileceği ve 300 mg/kg TSL ile ATS yaklaşık aynı oranda antihiperkolesterolemik etki gösterdiği saptanmıştır. TSL ve ATS'de çok düşük oranda böbrek hasarı görülmüş fakat TSL'nin hasar miktarı doz artışıyla artmaktadır [80].

Ülkemizde kullanımı yaygın olan baharatlardan tarçın, kimyon ve sumak üzerine yapılan çalışmada; baharat örneklerinin her bir türün su, etanol-su, metanol ve kloroform ekstraktları literatüre uygun yöntemler kullanılarak edilmiştir. Antioksidan aktiviteleri, fenolik bileşik miktarları ve indirgeme kabiliyetleri belirlenen ekstraktlar; antioksidan aktivite düzeylerinin, tarçın ve kimyonun su ekstraktlarında en yüksek, kloroform ekstraktlarında en düşük ve diğer tüm ekstraktlarda ise orta seviyede olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ekstraktların toplam fenolik bileşik miktarlarının; sumağın metanol ve etanol-su ekstraktlarında en yüksek, kloroform ekstraktlarında en düşük ve diğer bütün ekstraktlarda değişen seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Ölçümler doğrultusunda ekstraktların indirgeyici güçlerinin, sumak metanol ekstraktında en yüksek, kloroform ekstraktlarında en düşük ve diğer bütün ekstraktlarda değişen düzeylerde olduğu görülmüştür [81].

Akrilamidin (AA) etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada; kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (CA) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılmış olup, AA'nın sitotoksik etkilerini araştırmak için ise mitotik indeks (MI) ve replikasyon indeksi (RI) kullanılmıştır. AA'nın genotoksisitesine karşı pelargonidin (PG) ve gallik asit (GA)'in antigenotoksik etkileri de incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen *in vivo* ve *in vitro* test verilerine göre gallik asit'in, AA'nın neden olduğu genotoksisite frekansında belirgin bir düşüşe neden olduğu ve GA'in pelargonidin (PG)'den daha güçlü bir anti mutajenik etkisinin olduğu, PG'in herhangi bir genotoksik ve sitotoksik etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır [82].

Bir başka çalışmada ise; gemfibrozil'in kardeş kromatid değişim oranına etkilerinin, insan periferel lenfosit kültüründe *in vitro* olarak araştırılarak gemfibrozil'in farklı dozlarda kardeş kromatid değişim oranında artışa sebep olduğu görülmüş olup ayrıca; KKD-replikasyon indeksi arasında negatif bir korelasyon ($r = -0.97$) olduğu, gemfibrozil konsantrasyonlarının artışıyla hücre replikasyon indeksi ve KKD'nin arttığı sonucuna ulaşılmıştır [83].

Yapılan *in vitro* alışmamız doğrultusunda Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Karabaş kekiği (*Thymbra spicata*) bitkilerinin genotoksik etkilerini KKD testi ile gösterdik ve sonuç olarak Kimyon bitki uçucu yağlarının insan lenfosit kültüründe, dört farklı dozunun (0.05 μ l/ml, 0.10 μ l/ml, 0.15 μ l/ml, 0.20 μ l/ml) 24 saat uygulanması ile Kimyon (*C. cyminum*) Uçucu Yağının;

- a) Replikasyon indeksini düşürdüğü ve farklı dozları ile replikasyon indeksi arasında negatif korelasyon vardır ($r = -0.95$).
- b) Kontrol ve solvent kontrole göre her doz önemlidir ($p < 0.01$).
- c) KKD sayısını negatif kontrole kıyasla artırdığı saptanmıştır.

Karabaş Kekik uçucu yağının insan lenfosit kültüründe, dört farklı dozunun (0.05 μ l/ml, 0.10 μ l/ml, 0.15 μ l/ml, 0.20 μ l/ml) 24 saat uygulanması ile Karabaş Kekik (*T. spicata*) Uçucu Yağının;

- a) Farklı dozları ile replikasyon indeksi arasında negatif korelasyon vardır ($r = -0.94$) ve replikasyon indeksini düşürdüğü görülmüştür.
- b) Kontrol ve solvent kontrole göre 0.10 $\mu\text{l/ml}$, 0.15 $\mu\text{l/ml}$ ve 0.20 $\mu\text{l/ml}$ dozları önemlidir ($p < 0.01$).
- c) Dozları ve KKD sayısı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r = 0.99$).

Çalışmamızın verilerine göre; Kimyon ve Karabaş Kekik Ekstraktı uygulanmış deneme grupları negatif kontrole kıyaslandıklarında, uygulanan ekstrakt dozlarında artışa bağlı olarak KKD oranının arttığı görülmektedir. Ayrıca ekstrakt konsantrasyonu artışı ile replikasyon indeksinin (RI) düştüğü görülmüştür. *In vitro* olarak yaptığımız bu çalışma Kimyon ve Karabaş Kekik ekstraktlarının tam anlamıyla etkilerini açıklayamayabilir bu nedenle *in vivo* çalışmaların yapılması da önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Jain, S., Shrivastava, S., Nayak, S. and Sumbhate, S., 2007. Phcog Mag: Plant Review, Recent Trends in Curcuma longa Linn. Pharmacognosy Reviews, 1: 119-128.
- [2] Koç, H. "Doğrudan doğadan bitkilerle sağlıklı yaşama". Tokat : Ümit Ofset, 2002.
- [3] Baytop, T. "Türkiye'de bitkiler ile tedavi". İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi,1999: s.253-255.
- [4] Gürsoy, OV, Gürsoy, UK., "Anadoluda Ve Dışeti İle İlgili Hastalıkların Tedavisinde Halk Arasında Yaygın Olarak Kullanılan Bitkiler, Kullanım Şekilleri ve Bitkisel Özellikleri". "Cumhuriyet Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi" 2004; 7(1): 64-67.
- [5] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kimyon> (Erişim tarihi: Aralık 2013).
- [6] Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Dearfield, K.L., Jacobsonkram, D., Tice, R.R. and Carrano, A.V., 1993. Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. Mutation Res., 297: 101- 180.
- [7] Carrano, A.V. and Natarajan, A.T., "Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques". Mutation Res., 204: 379-406, 1988.
- [8] Anderson, D.," Human Biomonitoring. Mutation Res", 204: 353-541, 1988.
- [9] Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Högstedt, B.,Knudaen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S. and Sorsa, M., "Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage". Cancer Res., 54: 2919-2922, 1994.

- [10] Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P. and Mac Gregor, J.T., 1991. "Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environ. and Mol. Mutagen*", 18: 277-291.
- [11] Fenech, M., 2002. "Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology". *Toxicology*, 181: 411-416.
- [12] Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M. and Takeda, S., "Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells". *Molecular and Cellular Biology*, 19 (7): 5166-5169, 1999.
- [13] Helleday, T., 2003. "Pathways for Mitotic Homologous Recombination in Mammalian Cells". *Mutation Res.*, 532: 103-115.
- [14] Perry, P. and Evans, H.J., 1975. "Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure By Sister Chromatid Exchange". *Nature*. 258: 121-125.
- [15] Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindl, P.A. and Minkler, J.L., 1978. "Sister Chromatid Exchanges As An Indicator Of Mutagenesis". *Nature*, 271, 551-553.
- [16] Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D. and Aitio, A., 2000. "IPCS Guidelines For The Monitoring Of Genotoxic Effects Of Carcinogens In Humans". *International Programme on Chemical Safety*. 463(2): 111-72.
- [17] Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Šrám, R.J., Kunudsen, L.E., Barale, R. and Fucic, A., 2006. "Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk". *Mutation Res.*, 600: 37-45.

- [18] Akgül, A., “Baharat Bilimi ve Teknolojisi”, Ankara, Ankara Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 1993: (15): 111-112.
- [19] Ceylan, A., Tıbbi Bitkiler I. İzmir: Tarla Bitkileri Bölümü, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın, 1995: 312.
- [20] Allahghadri, T., Rasooli, I., Owlia, P., Nadooshan, MJ., Ghazanfari, T., Taghizadeh, M., Darvish, S., Astaneh, A., “Antimicrobial Property, Antioxidant Capacity, and Cytotoxicity of Essential Oil from Cumin Produced in Iran”. J Food Sci, 2010; 75(2): 54-61.
- [21] Bettaieb, I., Bourgou, S., Wannes, WA., Hamrouni, I., Limam, F., Marzouk, B., “Essential Oils, Phenolics, and Antioxidant Activities of Different Parts of Cumin (*Cuminum cyminum L.*)”, J Agr Food Chem 2010; 58(19): 10410-10418.
- [22] Aruna, K., Sivaramakrishnan, VM., “Anticarcinogenic Effects Of Some Indian Plant Products”. Food Chem Toxicol 1992; 30(11): 953-956.
- [23] Baytop, A., “Farmasötik Botanik”. İstanbul: İstanbul. Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dilek Matbaası Yayınları. 1983: 3158.
- [24] Pamuk, A., “Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi”. İstanbul: Pamuk Yayıncılık ve Matbaacılık, 1998: (1): 656.
- [25] Tansı, S., “Karabaş Kekik (*Thymbra Spicata L.*)’De Drog Verimi İle Ekolojik, Ontogenetik Ve Morfogenetik Varyabilitenin Araştırılması”, Çukurova Üniversitesi, Doktora Tezi, Adana. Haziran 1991.
- [26] Davis, P.H., 1982. Labiatae , Flora of Turkey and the East Aegean Islands. 7. University Press. Edinburg.
- [27] Tıbbi ve Aromatik Bitkisel Ürünler, Tıbbi ve Aromatik Bitkisel Ürünlerin Üretimi

ve Kalite Kontrolü, Başer, K.H.C. (Ed), Anadolu Üniversitesi, Yayınları No:2109, Eskişehir, ISBN: 978-975-06-07-90-5, (Açıköğretim Fakültesi – Uzaktan Eğitim Programları Tıbbi ve Aromatik Bitkiler – Önlisans Programı), 2010.

[28] Waldeyer, W., 1888, Ueber karyokinese und ihre beziehungen zu den befruchtungsvorgängen, *Archiv Für Mikroskopische Anatomie*, 32 (1), 1-122.

[29] Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T., 2011, Organisation of the plant genome in chromosomes, *The Plant Journal*, 66, 18-33.

[30] Elçi, Ş., 1982, “Sitogenetikte Gözlemler Ve Araştırma Yöntemleri”, Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları, Biyoloji: 3, Uğürel Matbaası, Malatya.

[31] Choo, K.H., 1997, Centromere DNA dynamics: Latent centromeres and neocentromere formation, *American Journal of Human Genetics*, 61 (6), 1225-1233.

[32] Maney, T., Ginkel, L.M., Hunter, A.W., Wordeman, L., 1999, The kinetochore of higher eucaryotes: A molecular view, *International Review of Cytology*, 194, 67-131.

[33] Babu, A. and Verma, R.S., 1987, Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin, *International Review of Cytology*, 108, 1-60.

[34] Barch, M.J., 1991, *The act cytogenetics laboratory manual*, Raven Press, Second Edition, London.

[35] Spinner, N.B., Eunpu, D.L., Schmickel, R.D., Zackai, E.H., Mceldrew, D., Bunin, G.R., Mcdermid, H. and Emanuel, B.S., 1989, The Role of cytologic NOR variants in the etiology of Trisomi 21, *The American Journal of Human Genetics*, 44 (5), 631-638.

[36] Taylor, JH., Woods, PS., Hughes, ML. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc Natl Acad Sci*, 1957; 43: 122.

- [37] Latt, SA., Sehrek, RR., Loveday, KS., Dougherty, CP., Schuler, CF. Sister chromatid Exchange. *Adv. Hum. Genet*, 1980; 10: 267-331.
- [38] Sardaş, S., Karakaya, AE. Clastogenicity test; sister chromatid Exchange. *J. Fac. Pharm Gazi*, 1990; 7 (2) 91-104.
- [39] Wolff S. Sister chromatid exchange. *Ann. Rev. Genet*, 1977; 11: 183-201.
- [40] Kato, H. "Possible Role of DNA Synthesis In Formation of Sister Chromatid Exchanges". *Nature*, 1974; 252: 739-741.
- [41] Tsui, YC., Creasy, MR., Hulten, MA. "The Effect Of The Male Contraseptive Agent Gossypol On Human Lymphocytes *In Vitro*: Traditional Chromosome Breakage Micronüklei SCE And Cell Kinetics". *Journal Of Medical Genetics*, 1988; 20: 81-85.
- [42] Vernole, P., Caporossi, D., "Sister Chromatid Exchange In Human Lymphocytes Exposed to Benzoic Acid Potassium Salt". *Mutation Research*, 1988; 208: 233-236.
- [43] Garret, NE., Stack, HF. and Waters, MD., Evaluation of the genetic activity profile of 65 pesticides. *Mutat Res*, 1986; 168: 301-325.
- [44] Gary, VF., Nelson, RL., Griffith, J., Harkins, M., "Preparation For Human Study Of Pesticide Applicators: Sister Chromatid Exchanges And Chromosome Aberrations İn Cultured Human Lymphocytes Exposed To Selected Fumigants". *Teratog Carcinog Mutagen*, 1990; 10: 1, 21-29.
- [45] Soyöz, M., Özçelik, N., "Zirai Mücadelede Kullanılan Pestisidlerin Sitogenetik Etkileri". *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003; 10(1): 6-9.
- [46] Perry, P., Wolff, S., "New Giemsa Method For Differential Staining of Sister Chromatids". *Nature*, 1974; 261: 156-158.

- [47] Shafer, DA., “Replication Bypass Model of Sister Chromatid Exchanges and Implications For Bloom’s Syndrome and Fanconi’s Anemia”. *Hum. Genet*, 1977; 39: 177-190.
- [48] Emre, S., “Antikanser İlaçların ve Karsinojen Maddelerin İnsan Kromozomları Üzerine Etkilerinin *In Vitro* Sistemde Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange, SCE) Analiz Yöntemi İle Belirlenmesi”. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1989.
- [49] Swift, M., Sholman, L., Perry, M., Chase, C., “Malignant Neoplasms In The Families Of Patients With Ataxia Telangiectasis”. *Cancer Res*, 1976; 36: 209-216.
- [50] Latt, SA., Stetten, G., Juergens, LA., Buchanan, GR., Gerald, PS. “Induction By Alkylating Agents Of Sister Chromatid Exchanges And Chromatid Breaks İn Fanconi’s Anemia”. *Proc.Natl.Acad. Sci*, 72: 1975; 4066-4070.
- [51] Auerbach, AD., Wolman, SR., “Susceptibility Of Fanconi’s Anemia Fibroblasts To Chromosome Damage By Carsinogens”. *Nature*, 1976; 261: 494- 496.
- [52] German, J., Ellis, NA., Proytcheva, M., “Bloom’s Syndrome Xix. Cytogenetic And Population Evidence For Genetic Heterogeneity”. *Clin. Genet*, 1996; 49: 223–231.
- [53] Changati, RSK., Schonberg, S., German, J. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom’s Syndrome lymphocytes. *Proc.Natl.Acad. Sci*, 1974; 71: 4508-4512.
- [54] Galloway, S.M., Miller, J.E., Armstrong, M.J., Bean, C.L., Skopek, T.R., Nichols, W.W., “DNA Synthesis İnhibition As An İndirect Mechanism Of Chromosome Aberrations: Comparison Of DNA-Reactive And Nondna-Reactive Clastogens”. *J. Mutat. Res.* 400,169-186, 1998.

- [55] İpek, E., Tüylü, B.A., Zetinoğlu, H., “Effects Of Carvacrol On Sister Chromatid Exchanges İn Human Lymphocyte Cultures”. J. Cytotechnology. 43,1-3:145-148, 2003
- [56] Natarajan, A. T., Obe, G., “Mutagenicity Testing With Cultured Mammalian Cells: Cytogenetic Assays”. In: Heddle JA(ed) Mutagenicity. New Horizons in Genetic Toxicology. Academic Pres, New York, 1-213, 1982.
- [57] 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.
- [58] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kimyon> (Erişim tarihi: Aralık 2013).
- [59] Koç H. “Doğrudan doğadan bitkilerle sağlıklı yaşama”. Tokat : Ümit Ofset, 2002.
- [60] Gürsoy, OV., Gürsoy, UK. “Anadolu’da ve Dişeti İle İlgili Hastalıkların Tedavisinde Halk Arasında Yaygın Olarak Kullanılan Bitkiler, Kullanım Şekilleri ve Bitkisel Özellikleri”. “Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi” 2004; 7(1): 64-67.
- [61] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Aseton> (Erişim tarihi: Aralık 2013).
- [62] Frick, M.H., Elo, O., Haapa, K., Heinonen,O.P., Heinsalmi P., Helo P., Engl N., “Helsinki Heart Study: Primary-Prevention Trial with Gemfibrozil in Middle-Aged Men with Dyslipidemia” J. Med. 317: 1237-1245, 1987.
- [63] Wakaki, S., Marumo, H., Tomioka, K., Shimizu, M., Kato, E., Kamada, H., Kudo, S., Fujimoto, Y., “Purification And İsolation Study On Gancidins”. J Antibiot 1958; 11:150-5.
- [64] The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Commonly Used Antineoplastic Drugs. 1999; 114:992.
- [65] Hu, D., Sires, BS., Tong, DC., Royack, GA., Oda, D., “Effect Of Brief Exposure To Mitomycin C On Cultured Human Nasal Mucosa Fibroblasts”. Ophthalm Plast Reconstr Surg 2000; 16:119-25.

- [66] Lazutka, J.R., Mierauskiene, J., Slapsyte, G., Dedonyte, V., “Genotoxicity Of Dill (*Anethum graveolens L.*), Peppermint (*Mentha piperita L.*) and Pine (*Pinus sylvestris L.*) Essential Oils In Human Lymphocytes and *Drosophila melanogaster*” Food and Chemical Toxicology 39 (2001) 485-492.
- [67] Speit, G., Haupter, S., On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences Between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. J. Hum. Genet. 70, 126-129, 1985.
- [68] Kertsen, S., Desvergne, B., and Wahli, W., “Roles of PPARs in health and disease” Nature May 25; 405(6785):421-4, 2000.
- [69] Titenko-Holland, N., Ahlborn, T., Lowe, X., Shang, N., Smith, M.T., Wyrobek, A.J., “Micronuclei and developmental abnormalities in 4-day Mouse embryos after aternal treatment with acrylamide”. J. Environ. Mol. Mutagen. 31:206-217, 1998.
- [70] Topaktaş, M., Speit, G., “Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması”. Ç. Ü. Sağlık Bil. Der. 5,1, 2, 3, 73-84, 1990.
- [71] Büyükleyla, M., “Thymol’ün İnsan Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Anormalliği ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri”. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2007.
- [72] Becarano, S. J., Emden, C., 1946. “Pratik Tıbbi Formüller”. İsmail Akgün Matbaası. İstanbul.
- [73] Baytop, H., 1974. “Karakekik (Herba Thymbrae) Farmakognozi Ders Kitabı”, İstanbul Üniversitesi Yayın No. 2003, Ecz. Fac., No. 19, 2, Baha Matbaası. İstanbul .(367)S).
- [74] Kuyumcu, N., 1986. Türkiye’de Tıbbi ve Kokulu Bitkilerin Kültürleri ile İlgili Uygulamalar. VI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı. (Editör Bilge Şener) Ankara. 16-19 Mayıs 1986. 53-74.

- [75] İpek, E., Tüylü, B.A., Zetinoğlu, H., “Effects Of Carvacrol On Sister Chromatid Exchanges In Human Lymphocyte Cultures”. J. Cytotechnology. 43,1-3:145-148, 2003.
- [76] Yavuz, A., “Benzol Peroksit’in İnsan Periferal Lenfositlerinde *in vitro* Genotoksik Etkileri”. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2005.
- [77] Sevinç, B., “Hematolojik Malign Hastalıklarda Genomik İnstabilitenin Farklı Sitogenetik Yöntemlerle (Kromozom Aberasyonu, Kardeş Kromatid Değişimi, Mikronukleus) Araştırılması”. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik ABD, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2006.
- [78] Ocak, T., “Karbon Monoksitle Zehirlenme Olgularının Lenfosit Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişimi Sıklığının Belirlenmesi”. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp AD, Uzmanlık Tezi, 2008.
- [79] Nazlıgül, E., “Miyelodisplastik Sendromlu Olgularda Genomik İnstabilitenin Farklı Sitogenetik Yöntemlerle (Kromozom Aberasyonu, Kardeş Kromatid Değişimi, Mikronukleus) Araştırılması”, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı/ Genetik Programı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul-2009 .
- [80] Demiralay, H., “Thymbra Spicata Labiatae Oil’in (Karabaş Kekik Yağı) Ve Atorvastatin’in Antihiperkolesterolemik Etkinliğinin Araştırılması” Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Isparta. 2010.
- [81] Aydın, Ö., ‘Tarçın, Kimyon Ve Sumak Adlı Baharat Türlerinden Elde Edilen Su, Etanol-Su, Metanol Ve Kloroform Ekstraktlarının *In Vitro* Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi’ Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık-Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2011.
- [82] Aksu, P., “Akrilamidin *In Vivo* ve *In Vitro* Genotoksitesisi Üzerine Fenolik Bileşiklerden Pelargonidin ve Gallik Asidin Etkileri”, Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kars, 2012.

[83] Uludaş, E., “Gemfibrozil’in Kardeş Kromatid Değişim (KKD=SCE) Oranına Etkilerinin İnsan Periferal Lenfosit Kültüründe İncelenmesi” Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji AD, Yüksek Lisans Tezi, 2013.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hanife Yıldırım

Doğum Yeri : Çorum

Doğum Tarihi : 22.09.1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Çorum Atatürk Lisesi (2004-2007)

Lisans : Kafkas Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2008-2012)

Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AD, Moleküler Biyoloji (2012-2014)