



**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAPSAİSİN'İN HÜCRE ÖLDÜRÜCÜ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Nevin İTİK**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Süleyman GÜL**

**MAYIS 2011**

**KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nevin İTİK'in yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "KAPSAİSİN'İN HÜCRE ÖLDÜRÜCÜ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy....birliği.....ile kabul edilmiştir.

.10../.06./2011

Adı Soyadı  
Başkan : Doç. Dr. Süleyman GÜL  
Üye : Doç. Dr. Fikret AKDENİZ  
Üye : Y. Doç. Dr. Hüseyin GEY

İmza



Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ....../....../2011. gün ve ...../..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç . Dr. Muzaffer ALKAN

Enstitü Müdürü

## **ÖNSÖZ**

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

Bu çalışmanın tez konusu olarak seçiminde ve yürütülmesinde, bana gerekli laboratuvar olanakları sunan, yol gösteren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam, Doç.Dr. Süleyman GÜL'e, tezimin yazımında ve yorumlanmasında emeği geçen Öğr. Gör. Aysel İTİK EKİNCİ'ye laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Araş. Gör Pınar AKSU'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

**Nevin İTİK**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET.....	IV
ABSTARACT.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
1.GİRİŞ.....	9
2.GENEL BİLGİLER.....	10
2.1. Kapsaisin.....	10
2.2. Hücre Öldürücü Etki.....	12
2.2.1. Apoptoz.....	13
2.2.2. Nekroz.....	17
3. YÖNTEM.....	18
3.1.1. Kimyasal Maddeler Ve Çözeltiler.....	18
3.1.2. Kapsaisin'in Hazırlanması.....	19
3.1.3. Mitomisin C (MMC) Eriyiğinin Hazırlanması.....	20
3.1.4. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması.....	20
3.1.5. Boyanın Hazırlanışı.....	20
3.1.6. Kromozom Medyumu.....	20
3.1.7. Hipotonik Eriyik.....	20
3.1.8. Fiksatif.....	21
3.1.9.Giemsas.....	21
3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	21
3.2.1. Hassas Terazisi.....	21
3.2.2. Santrifüj.....	21
3.2.3. Mikroskop.....	21
3.2.4. Etüv.....	22

3.2.5. Deney Ekipmanları.....	22
3.2.6. Sarf Malzemeleri.....	22
3.4. Kan Tekniği.....	23
3.5. Preparat Hazırlama.....	24
3.6. Preparatların Boyanması Ve Saklanması.....	25
3.7. Lamların İncelemesi Ve MN Sıklığının Değerlendirilmesi.....	25
3.8. Sitokinezi Bloke Edilmiş Binükleer Hücreleri Tanımla Kriterleri.....	25
3.9. Mikronükleus Sayımı.....	26
3.10. Hücre Sayısı Ve İstatistiksel Değerlendirme.....	27
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>28</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>38</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>41</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>48</b>

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı Kapsaisin'in insan hücresi üzerine etkisinin in-vitro koşullarda klastojenik etkisinin saptanmasıdır. Kapsaisin'in 3 farklı dozu 80 µM, 120 µM, 160 µM insan periferel kanının kullanıldığı lenfosit kültürüne 24. saatte eklenmiştir. 44. saatte Cyt-B eklemek koşuluyla 72 saat kültüre edildi. Sitokinez olayı sitokalsin-B ile engellenerek mikronükleus sıklığı ve hücre ölümü (apoptoz ve nekroz) incelenmiştir. Kapsaisin'in tüm dozlarda kontrollere göre hücre ölümünü istatistiksel olarak artırmış ve bölünme indexini düşürmüştür. Kapsaisin pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin'den daha fazla hücre ölümüne sebep olmuştur. Hücre ölümü ile doz arasında bir bağlantı saptanamamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, Genotoksik ve Sitotoksik etki, Kromozomal aberasyon, Sitokinez, Nükleer sitotoxic bölünme indeksi

## **ABSTRACT**

The aim of this study is to ascertain clastogenic affects of Kapsaisin on human cells in in-vitro conditions. 3 doses of Kapsaisi, which are 80  $\mu$ M, 120  $\mu$ M, 160, were added to lymphocyte culture, in which Minsan peripheral blood is used, in in the 24th hour. In the 44th hour, it was cultured for 72 hours on the condition that it was added Cyt-B. By blocking the cytocinesis case by cytochalasin, micronucleus rate and cell death (apoptosis and necrois ) were analyzed. According to observations of Kapsaisin in all doses, necrosis was increased statistical and separation index was decreased. Kapsaisin caused more necrosis than mitomisin, which is used positively. No connection was observed between necrosis and dose.

**Key word:** Apoptos, Genotoxic ve Cytotoxic impact, Kromosomal aberration, Cytokinesis, Nükleer cytotoxic indexi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1:</b> Hücre bölünmesinin Görünümü .....	10
<b>Şekil 2:</b> Sitotoksik ya da genotoksik ajanlarla karşılaşan bir hücrenin geçirebileceği değişimler.....	12
<b>Şekil 3:</b> Apoptotik bir hücre. ....	14
<b>Şekil 4:</b> Nekrotik bir hücre Görüntüsü.....	15
<b>Şekil 4.1:</b> Normal sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu hücre görünümü.....	27
<b>Şekil 4.2:</b> Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve bir mikronükleus içeren hücre.....	27
<b>Şekil 4.3:</b> Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve iki mikronükleus içeren hücre.....	28
<b>Şekil 4.4:</b> Sitokinezi engellenmiş çok nükleuslu ve apoptoza giden bir hücre.....	28
<b>Şekil 4.5 :</b> a, b. Apoptotik Hücreler.....	30
<b>Şekil 4.6 :</b> Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre.....	32
<b>Şekil 4.7 :</b> Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre.....	25

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

$\mu\text{M}$  : Mikromolar

MMC : Mitomisin-C

KA: Kromozom Anomallikleri

CA: Chromosomal Aberration

$\mu\text{l}$ : Mikrolitre

DMSO: Dimetil sülfoksit

rpm: Devir Sayısı

## 1.GİRİŞ

Bugün dünyada kullanılan bitki sayısı Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre 20.000 civarındadır. Bunlardan 4000 drog yaygın bir şekilde kullanılırken yaklaşık % 10'unun ticareti yapılmaktadır. Özellikle son on yılda bitkisel ilaçlara olan ilgi ve talebin aşırı derecede artması, bitkilerin doğrudan ilaç olarak kullanımının ve bitkilerden ilaç geliştirme çalışmalarının hızlanmasını sağlamıştır. Son yıllarda tüm dünyada bitkiler üzerinde klinik amaçlı ve salgın hastalıkların kontrolü yönünde çalışmalar sürdürülmekte, çeşitli enzim sistemleri kullanılarak, bitkilerden biyoaktif maddelerin bulunması için ileri düzeyde çalışmalar yapılmaktadır. Uluslararası büyük ilaç şirketlerinin hemen hepsinin, büyük ya da küçük, bir bitkisel ürün araştırma bölümü bulunmaktadır. İlaç, kozmetik, parfümeri, gıda, veterinerlik ve tarım alanlarında bitkisel kaynaklı ürünlerle alınan patent sayısı giderek artmaktadır [1-4].

Bitkisel ilaçlara ve bitkilerden elde edilen hammaddelere ilginin arttığı günümüzde, özellikle bazı bitkiler kullanım alanları, miktarları ve insanlar tarafından yararlı etkilerinin onaylanması açısından diğer bitkilere oranla daha fazla öneme sahiptirler.

Bitki özütleri, besin ve içecek katkısı olarak, kozmetik olarak, sabun ve deterjanlara koku olarak, böcek ve sinek öldürücülere katkı olarak kullanılabilir. Bitki özütleri kompleks hidrokarbonların bir karışımıdır ve genellikle terpenlerden oluşur ve koku ve aroma oluşturma kapasitelerine göre sınıflandırılabilir. Pek çok ülkede bitki uçucu yağlarının kullanımı kontrol altına alınmıştır. Bu uçucu yağların akut ve kronik toksisitesi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalar genellikle antimikrobial etkileri üzerinedir. Oysa bitki özütlerinin kansorejenik, teratojenik ve mutajenik etkileri bildirilmiştir. Bitki özütleri oldukça etkili hücre bölünme düzenleyicisi olabilirler.

Özellikle son on yılda bitkisel ilaçlara olan ilgi ve talebin aşırı derecede artması, bitkilerin doğrudan ilaç olarak kullanımının ve bitkilerden ilaç geliştirme çalışmalarının hızlanmasını sağlamıştır. Tüm dünyada bitkiler üzerinde klinik amaçlı ve salgın hastalıkların kontrolü yönünde çalışmalar sürdürülmekte, çeşitli enzim sistemleri kullanılarak, bitkilerden biyoaktif maddelerin elde edilebilmesi için ileri düzeyde çalışmalar yapılmaktadır. Uluslararası büyük ilaç şirketlerinin hemen hepsinin, büyük ya da küçük, bir bitkisel ürün araştırma bölümü bulunmaktadır. İlaç, kozmetik, parfümeri, gıda, veteriner hekimlik ve tarım alanlarında bitkisel kaynaklı ürünlerle

alınan patent sayısı giderek artmaktadır. Bitkisel ilaçlara ve bitkilerden elde edilen hammaddelere ilginin arttığı günümüzde, özellikle bazı bitkiler kullanım alanları, miktarları ve insanlar tarafından yararlı etkilerinin onaylanması açısından diğer bitkilere oranla daha fazla öneme sahiptirler. Bu maddelerin kalıtsal materyale etkilerinin açığa çıkarılması oldukça önemlidir. Klasik kromozom elde edilme yöntemlerinde bile bitkisel materyal sıklıkla kullanılmaktadır. Kolsişin kar çiçeğinden (*Colchicum*) elde edilir ve iğ ipliklerini kırarak kromozomların kutuplara çekilmesini önler. Kolsişin sayesinde kromozomlar metafaz evresinde yakalanır ve incelenir. Yine insan kromozomu incelemelerinde insan kanı kullanılır. Normalde insan kan hücreleri dolaşımında bölünmez ve bölünmeyen hücrelerde kromozom incelemesi yapılamaz. *Fitohemaglutinin* fasulyeden (*Phaseolus vulgaris*) elde edilir ve bölünmeyen kan hücrelerini bir anlamda kanserleştirerek bölünmeye zorlar. İncelenecek bitkisel kökenli maddelerin olası mutajenik ve diğer özelliklerinin ortaya çıkarılması oldukça önemlidir. Bu çalışmanın amacı, bitkisel kökenli bir bileşik olan kapsaisin'in insan lenfosit kültüründe kan hücreleri üzerine yaptığı hücre öldürücü etkiyi, apoptoz ve nekroz yönünden incelemektir.

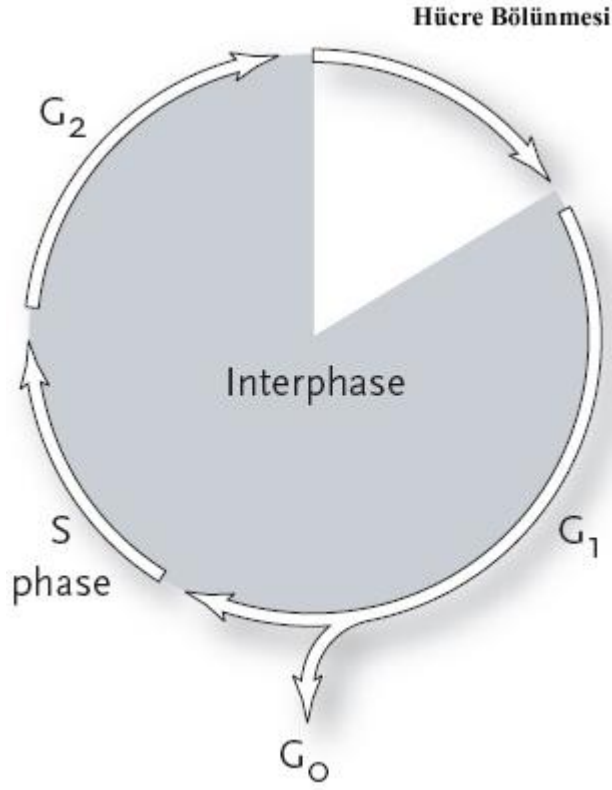
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kapsaisin

Yüzyıllardan beri insanlar tarafından gerek besin maddesi, gerekse ilaç olarak kullanılan süs biberi (*Capsicum* sp.) bitkisi de önemi giderek artan bitkilerden birisidir. *Solanaceae* familyasının *Capsicum* cinsi, yenedünyanın tropik ve subtropik bölgelerinde yetişen yaklaşık 30 türü kapsamaktadır. Bunlardan 5 türün kültürü yapılmakta olup, *Capsicum annum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum pubescens*, *Capsicum frutescens* ve *Capsicum chinense* ekonomik öneme sahiptir [5]. *Capsicum* cinsi dünyanın değişik bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Uzun sivri, dolmalık, çarliston, iri kare ve konik olmak üzere değişik tipleri vardır. Acılık meyvenin “kapsaisin” ( $C_{18}H_{27}O_3N$ ) içeriğine ve bileşimine bağlıdır ve yüksek oranda plasenta kısmında bulunur. Kapsaisin kırmızı taze biberde yeşil biberden iki üç kat daha fazladır. Besin değeri bakımından iyi bir sebze türüdür. Özellikle C vitamini açısından oldukça zengindir (103 mg/100 g). Süs biberi bileşiminde ayrıca uçucu yağ ve sabit yağda bulundurmaktadır [6-9]. Kapsaisin miktarı çeşitten çeşide değişmektedir. Kurutulmuş kırmızı toz biber acılık bakımından “scoville acılık birimi”ne göre 5 gruba ayrılmıştır. Buna göre biberler acısız (0–700), az acı (700–3000), orta acı (3000–25000) ve çok acı (80000) şeklinde sınıflandırılmaktadır [10,11]. Kırmızıbiber sebze ve baharat olarak yoğun bir şekilde kullanıldığı gibi kapsaisin içeriği nedeniyle ilaç yapımında da büyük öneme sahiptir. Özellikle süs biberinde kapsaisin miktarı oldukça yüksektir [10–12]. Kapsaisin oranları % 0.1 [13] ile % 2 [14] arasında değişmektedir.

### 2.2. Hücre Öldürücü Etki

Bilindiği gibi bir hücrenin yaşam döngüsü G1, S, GII ve Mitoz evresinden oluşmaktadır. Bu evrelerin yalnızca S evresinde DNA sentezi yapılmaktadır.



**Şekil 1:Hücre Bölünmesi**

G<sub>0</sub> evresinin özelliği bu evrede hücrelerin diploit olması ve yeniden programlanmaya açık olmasıdır. Eğer evrelerin S fazına geçmesine izin verilirse buradanda G<sub>2</sub> fazına geçecek ve DNA iki katına çıkacak. Hücre bölünmesinde olmayacağından tetraploit bir nükleus oluşacaktı. Tetraploit bir nükleusun çekirdeği alınmış başka bir yumurtaya transferi başarısızlıkla sonuçlanacaktı. Hücrelerin G<sub>0</sub> evresinde olduğundan emin olmak için özel bir yöntem geliştirmiştir. Öncelikle hücreler kültürde büyütülmüş ve daha sonra bazı maddelerin eksik olduğu başka bir ortama alınmışlardır. Hücreler G<sub>1</sub> evresinde ise hücre evresinden çıkarılmış ve G<sub>0</sub> evresine sokulmuştur. Hücreler S ya da G fazında ise ya ölmüş ya da G<sub>0</sub> a girmişlerdir. G<sub>1</sub> ve G<sub>0</sub> da hücre nükleusu diploittir.

Hücre bölünüp bölünmeyeceğine G<sub>1</sub> evresinde karar verir. Burada mekanizma önemlidir. Bazı genlerin hücre bölünme mekanizmasını denetlediği bilinmektedir. P53 geni en çok bilinen ve üzerine en fazla çalışma yapılan genidir. Bu gen G<sub>1</sub> evresinde hücreyi kontrol etmekte eğer hücre uygunsa bölünmesine izin vermekte değilse apoptoz ve nekroz olarak bilinen programlı hücre ölümüne göndermektedir. Gen bozulduğunda

bölünmemesi gereken hücreler bölünmekte ve beklenmeyen bölünme anomalilerine neden olmaktadır.

P53 genindeki mutasyonlar insandaki kötü huylu tümörlerin en önemli sebeplerindendir. P53 geni kromozom 17'nin kısa kolu üzerinde bulunur.

### **2.2. 1. Apoptoz**

Apoptoz terimi programlı ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Eski bir Yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bugün de bu terimin kullanımı uygundur ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü anlatır. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir [19–21]. Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur [19]. Bu da demektir ki; apoptoz oranının azalması ile hücre sayısı artar aksine eğer apoptoz oranı artarsa hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelir [20].

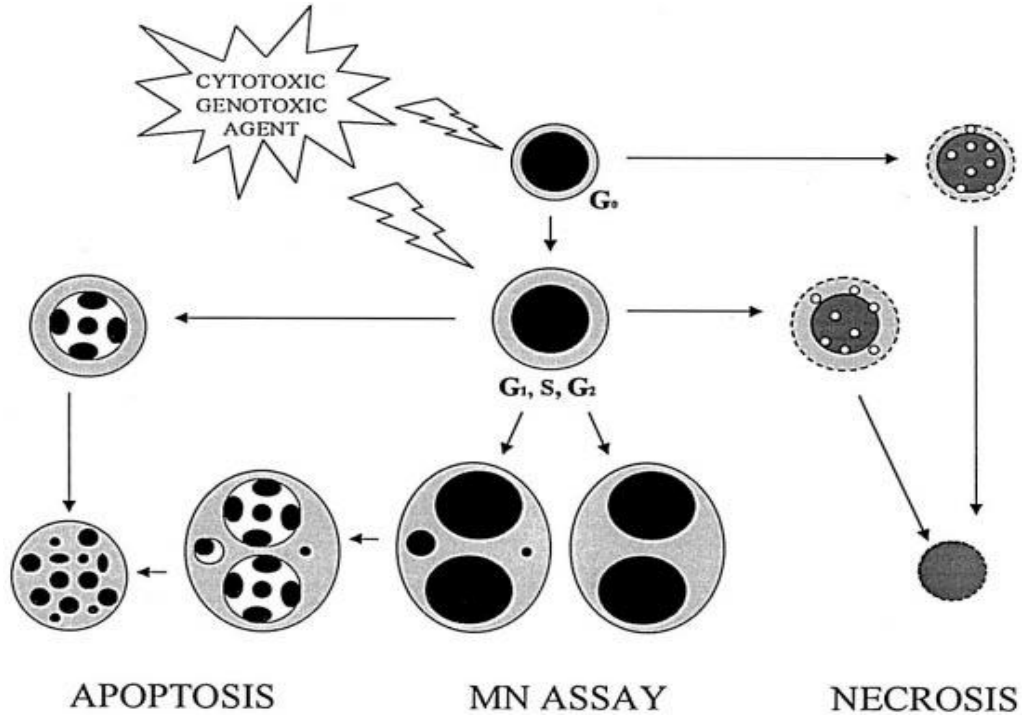
Doku yaşamı, hücresel çoğalma ve apoptozis gibi hücre ölüm işlemleri arasındaki sıkı dengeyle sürdürülür. Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan bir hücre intihar mekanizmasıdır. Bu içsel intihar formunun temelinde genetik mekanizma vardır. Apoptozis tipik morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Göze çarpan morfolojik değişimler hücre küçülmesi, nuklear kromatinin yoğunlaşması, nukleusun fragmantasyonu ve DNA'nın internukleozomal alandan

ayrılmasıdır. Genomik DNA'nın (deoksiribonükleik asit) internukleozomal fragmentasyonu son yıllarda apoptozisin en belirgin biyokimyasal işareti olarak düşünülmektedir. Tüm bu özelliklerin oluşumu enerjiye bağımlıdır. Bundan dolayı apoptozis enerjiye bağımlı işlemlerle hücreyi ölüme sürükler. Caspase ailesi proteazları, BCL-2 ailesi proteinleri ve p53 gen ürünü apoptozisin düzenlenmesinde merkezi rol oynar.

Tek hücreli canlılarda hücre ölümünün tek yolu apoptozdur. Çok hücreli organizmalarda ise genetik oluşumlu hücre hasarının bloke edilmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi bu yolla gerçekleşir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıklar engellenmiş olur. Apoptoz olayının oluşmasından daha önce hücresel replikasyon işlemi durur (DNA onarımı) eğer bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse apoptoz ile sonuçlanan olaylar serisi başlar. Bu sırada apoptozun başlayıp başlamaması hasarın boyutuna, hücrenin tipine ve hücrenin üretkenlik potansiyeli olan tümör geliştirme riskine bağlıdır [20].

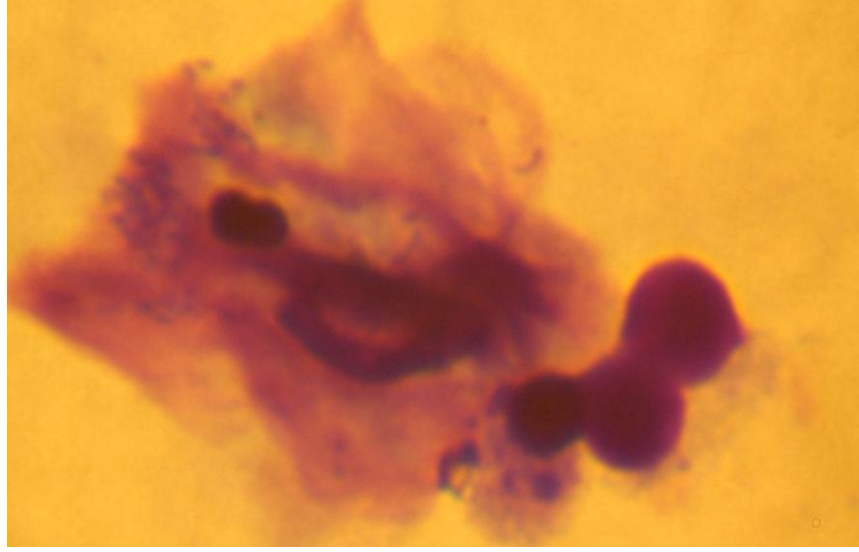
Apoptoz; üyelerin oluşumunda, el ve ayak parmak taslakları arasındaki ara dokunun ortadan kalkmasında, omuriliğin şekillenmesinde, erkek fetüslerde müller kanalının tahribatı sırasında ve iltihapta nötrofil ölümünün sağlanması ve menstrual siklus gibi birçok olayda görülür [20].





**Şekil 2: Sitotoksik ya da genotoksik ajanlarla karşılaşan bir hücrenin geçirebileceği değişimler [21].**

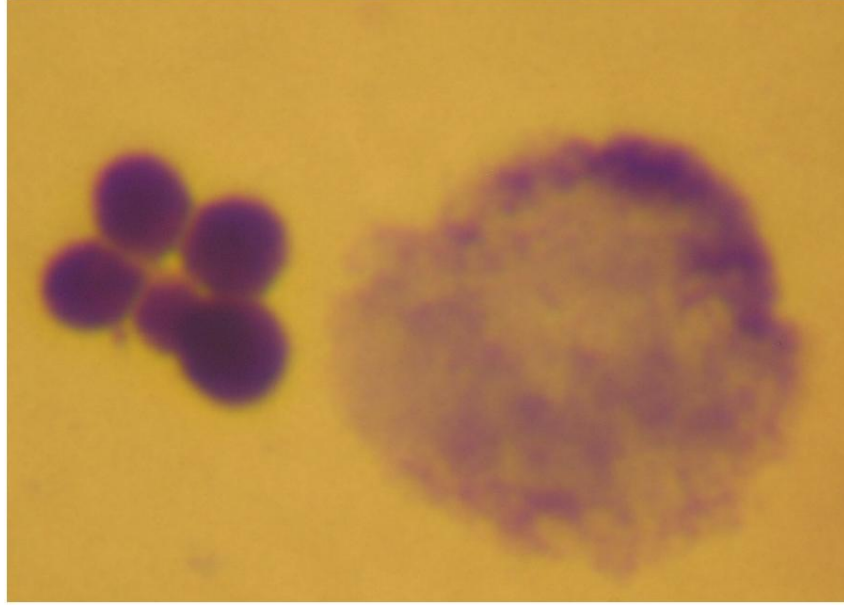
Apoptoz, farklılaşmış dokuların olgunlaşmasında da esastır. Çünkü apoptoz vücudun bütünündeki hücre sayısının sabit tutulmasını ve immün sistem faaliyetlerinin gerçekleşmesini sağlar. Bu son olaya örnek olarak, immün bir reaksiyonun sonucu dikkate alınacak olursa; bu noktada aktive edilmiş lenfositlerin direkt apoptoz vasıtasıyla kendi antiijenlerini elimine ettikleri görülür. Böylece apoptotik hücre miktarında görülen bir artış, daha önce de belirtildiği gibi dengenin olumsuz yönde bozulmasına; Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif hastalıklardan ülseratif kolitler, AİDS gibi kronik hastalıklara ve hatta immünolojik hastalıklara bile neden olabilir



**Şekil 3:** Apoptotik bir hücre.

### **2.2. 2. Nekroz**

Nekroz, bir veya daha fazla sayıda hücrenin, dokunun ya da organın geri dönüşmez şekilde hasar görmesi sonucu görülen patolojik ölümdür. Örneğin bir yanık durumunda aşırı ısıya maruz kalan vücut parçası nekroza uğrayıp cansız doku haline gelebilir. Diğer sebepler; yaralanma, enfeksiyon, kanser, enfarktüs, zehirlenme ve enflamasyon olabilir. Nekroz; iskemi, toksik maddelerin aşırı konsantrasyonu, hipertermi, viral enfeksiyon ve hipertermi gibi nedenlerle ortaya çıkabilir. Nekroz hücre zarının bütünlüğünün bozulması, kromatinin dağılması, hücre şişmesi, organellerin bozulması, büyük hücresel vakuollerin oluşumu ile karakterize olan bir oluşumdur. Nekroz apoptozdan, hücre gruplarını etkilemesi ve infalmasyon oluşumu yönleri ile ayrılır.



**Şekil 4:** Nekrotik bir hücre.

### **3. Yöntem**

Bu çalışmada materyal olarak sigara içmeyen yakın yaşlardaki 8 erkek (23 ve 24 yaşlarında), 8 bayandan (23 yaşlarında) alınan periferik kan ve test maddesi olarak da kapsaisin ve pozitif kontrol olarak Mitomisin C (MMC) test kontrolü olarakta DMSO (Dimetil sülfoksit ) kullanılmıştır [23].

#### **3.1.1 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler**

**1.Etanol ( $C_2H_5OH$ ), (Merck, K35091886 537)**

**2.Kapsaisin,(SIGMA, M2028-50MG)**

**3.Potasyum di-hidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ ), (Merck, A651773 524)**

**4.Sodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4$ ), (Merck, K34623780 516)**

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

**6.Giemsa (Merck, HX694620)**

**Fosfat Tampon Çözeltisi:** Potasyum di-hidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )’dan 9.1 gr. alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır. Başka bir balon jöjeye de sodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )’dan 11,9 gr alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır ve stok çözeltiler hazırlanmış olur [24- 26].

**Sorenson Fosfat Tampon Çözeltisi:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltisinden 60 ml. ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinden 30 ml. alınarak şaleye konulur ve üzerine 10 ml. giemsa boyası eklenmesi suretiyle %10 luk giemsa-sorenson fosfat tampon çözeltimiz hazırlanmış olur. Sorenson fosfat tampon çözeltisi çeşitli pH değerlerine ayarlanabilir, bu işlem için her iki çözeltinin değişik miktarları kullanılarak pH istenilen değere ayarlanır [26].

**Çözelti 1:**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 9.1 gr.  
Bidistile su.....1000 ml.

**Çözelti 2:**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....11.9 gr.  
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.

**3.1.2. Kapsaisin’in Hazırlanması**

Yapılan hesaplamalarda molekül ağırlığı 305,4 olan capsaicin (Sigma) maddesinden 26 mg alınarak 13 ml DMSO (Dimetil sülfoksit )’ da çözülmüştür. Buda 0,05 ml’de 0,1 mg capsaicin’in bulunduğunu gösterir. 80, 120, 160  $\mu\text{M}$ ’lık dozlar kullanılarak çalışma yapılmıştır.

### **3.1.3. Mitomisin C (MMC) Çözeltinin Hazırlanması**

2 mg mitomisin-C bulunan ortama 2 ml steril bidistile su ilave edilerek MMC eritilmiştir. Sonra bu eriyikten 5 ml'lik kültür ortamına ilave edilerek son konsantrasyondaki MMC oranı 0.3 µg/ml olan çözeltiler hazırlanmıştır.

Yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki MMC ile hücreler 24 saat muamele edilmiştir.

### **3.1.4. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması**

Sorensen tamponu, tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

### **3.1.5 Boyanın Hazırlanışı:**

Tampon A: 11.34 gr  $KH_2PO_4$  250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8). Tampon B: 14.83 gr  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  250 ml saf su içinde eritilmiştir.

### **3.1.6. Kromozom Medyumu**

Biochrome firmasının ürettiği kromozom, hücre kültürü için kullanılmıştır. Besiyeri içeriğinde, Non essential Amino Acids, Fetal Calf Serum, Heparin, Penicillin G, Sodium Salt, Streptomycin Sulphate, Phytohemagglutinin M bulunuyordu. Tüpler 5'er ml'lik ve hazır olarak satışa sunulmuştu.

### **3.1.7. Hipotonik Çözelti**

Hipotonik eriyik olarak % 0,4'lük KC1 (Merck) kullanılmıştır. Bidistile su içinde stok halinde hazırlanan eriyik ağzı kapalı cam bir kaptaki buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 1 saat önce yeterli miktarda alınıp 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

### **3.1.8. Fiksatif**

Preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif, 1 kısım glasiyal asetik asit' in 3 kısım metanol (1/3 : glasiyal asetik asit/metil alkol) ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

### **3.1.9. Giemsa**

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

## **3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları**

### **3.2.1. Hassas Teraziler**

Tartım işlemlerinde 0, 0001 gr hassasiyetindeki PRECİSA XB 220 A marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

### **3.2.2. Santrifüj**

5000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 15 dk.'lık zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli ELEKTRO-MAG marka santrifüj çahşmalarda kullanılmıştır.

### **3.2.3. Mikroskop**

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır.

### **3.2.4. Etüv**

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

### **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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (merck, 9021622)
- 4.Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>H<sub>2</sub>0 (Merck, K1 690176)
- 5.Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
- 6.Metanol (Merck, 502K05275408)
- 7.Ksilol (Merck, 207K037553)
- 8.İmmersiyon yağı (Merck, 09403569)
- 9.KCL (Merck, 340TA611835)
- 10.Alkol (Merck)
- 11.Distile su
- 12.Tüplük
- 13.Çeşitli cam malzemeler

14.Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü

15.Enjektör

16.Çeşitli ebatlarda puarlar

17.Pastör pipeti

18.Lam

19.Lamel

### **3.3. Kan Örneklerinin Alınması**

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

### **3.4. Kültür Tekniği**

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 4 ml medyum içeren kültür tüplerine steril ortamda, alınan kan örneklerinin 3-4 damlası dışarı atıldıktan sonra 12 damla (~0.4 ml) kan ilave edildi. Tüplerin üzerine kontrol kişilerinin adı yazıldı ve her bir kişi için 2 tüpe ekim yapıldı. Tüpler hafifçe karıştırılarak 37 °C'lik etüvde 24.saatte **Kapsaisin**,(SIGMA, M2028-50MG), 44. saatte Cyt-B eklemek koşuluyla 72 saat kültüre edildi. Pozitif kontrol amacıyla kullanılan MMC steril bidestile suda çözülmüştür. MMC'nin insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür bitimine 24 saat kala son konsantrasyonu 0.3 µg/ml MMC kültür tüplerine ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise distile su (%1) test kontrolü olarak DMSO (Dimetil sülfoksit ) kullanılmıştır

Umegaki ve arkadaşlarının MN elde etmek için çalışmasında kullanılan Balasem ve Ali metoduna göre çıkarım işlemleri yapıldı [24- 27].

1. 72 saat inkubasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
2. Dipte 0,6–0,7 ml kalıncaya kadar üstteki supernatantlar atıldı.
3. Daha sonra hücrelere laboratuvar ısısında beklemiş, olan % 0,4'lük hipotonik solüsyonundan 6 ml eklenerek 15 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.



4. Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi.

5. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glasiyal asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj yapıldı.

6. Süpernatantların tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 ml ilave edilip, 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

### **3.5. Preparat Hazırlama**

Lamlar temizlenerek, içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip soğuyuncaya kadar buzdolabı buzlukunda bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar iyice kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla lamlara yakın mesafeden (1-2 cm yukarıdan) 9- 10 damla damlatıldı. Lamlara kuvvetlice üflenerek hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı preparatlar hazırlandı ve lamlar ayrı ayrı kodlandı.

### **3.6. Preparatların Boyanması ve Saklanması**

Sorenson boya tamponu (pH=7.0):Sorenson boya tamponu 5.26 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 8.65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. 90 ml Sorenson boya tamponu üzerine 10 ml giemsa boyası eklenerek giemsa boyası hazırlandı.

Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan % 10'luk giemsa boyasında 15dakika boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirildikten sonra kanada balsamı (entellan) damlatılarak lamelle kapatıldı.

### **3.7. Lamların incelenmesi ve MN Sıklığının Değerlendirilmesi**

En iyi görüntü 1000X'lik büyütmede sağlandı. Lamlar analizden önce numaralandırılmalıdır. Her bir duplike kültürden alınan lamlar için bir skor elde edilmelidir. Her bir preparat aşağıdaki bilgileri içeriyordu.

- 1.** MN'ların sayısı, en azından 1000 BN hücrede sayılmalıdır ve 1000 BN hücre başına MN frekansı hesaplanmalıdır. BN hücrede MN'ların sayılmasında kullanılan kriterler detaylı bir şekilde aşağıda açıklanmıştır.
- 2.** Sıfır, bir veya daha fazla MN içeren BN hücre dağılımı; tek bir BN hücrede MN sayısı normalde sağlıklı bireylerin lenfositlerinde 0 ila 3 arasında değişmektedir ancak maruz kalınan genotoksine ve yaşa bağlı olarak 3'den fazla olabilir.
- 3.** Mikronükleuslu BN hücrelerinin frekansı, en azından 1000 BN hücrede bulunmalıdır.
- 4.** 1000 BN hücresinde nükleoplazmik köprü frekansı hesaplanmalıdır.
- 5.** 500 hücre başına tek çekirdekli (mononükleer), iki çekirdekli (binükleer), üç çekirdekli (trinükleer) ve dört çekirdekli (tetranükleer) hücrelerin oranı hesaplanmalıdır. Bu bilgiye dayanarak çekirdek bölünme indeksi oluşturulabilir.
- 6.** Canlı ya da apoptoz veya nekrozdan dolayı ölen hücrelerin sayısı, aynı preparat üzerinde 500 hücre başına tek-, iki- ve çok- çekirdekli hücreler sayılırken sayılabilir. Hücreler sayılırken, hücre tanımlanamadığında skorlanan hücrelere dahil edilmez [24-27].

### **3.8. Sitokinezi Bloke Edilmiş Binükleer Hücreleri Tanımlama Kriterleri:**

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

- 1.** Hücreler binükleer (iki çekirdekli) olmalıdır.
- 2.** Binükleer hücredeki iki çekirdeğin boyutu yaklaşık olarak aynı olmalı ve yoğun boyanmalıdır.

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

### 3.9. Mikronükleus Sayımı

Sayılan çekirdeklerin tekrar sayılmaması için ışık mikroskopunda 400X büyütmede sitoplazması dağılmayıp sınırları belli olan çekirdekler belirlendi ve sadece bunlar sayıldı. Kontrol kişiler için duplike olarak yapılan kültürlerden hazırlanan preparatlarda 2000 BN hücre sayıldı ve mikronükleuslar kaydedildi. Aynı zamanda, her bir kişi için, 500 mononükleer (tek çekirdekli) hücre başına binükleer (iki çekirdekli), trinükleer (üç çekirdekli) ve tetranükleer (dört çekirdekli) hücrelerin sayısı da kaydedildi ve çekirdek bölünme indeksi (NDI) hesaplandı.

Nükleer bölünme indeksi (NBİ) =  $(M_1 + 2(M_2) + 3(M_3) + 4(M_4)) / N$  formülüne göre hesaplanmıştır Burada M1- M4 hücre ve içindeki çekirdek sayısını, N ise sayılan toplam hücre sayısını göstermektedir.

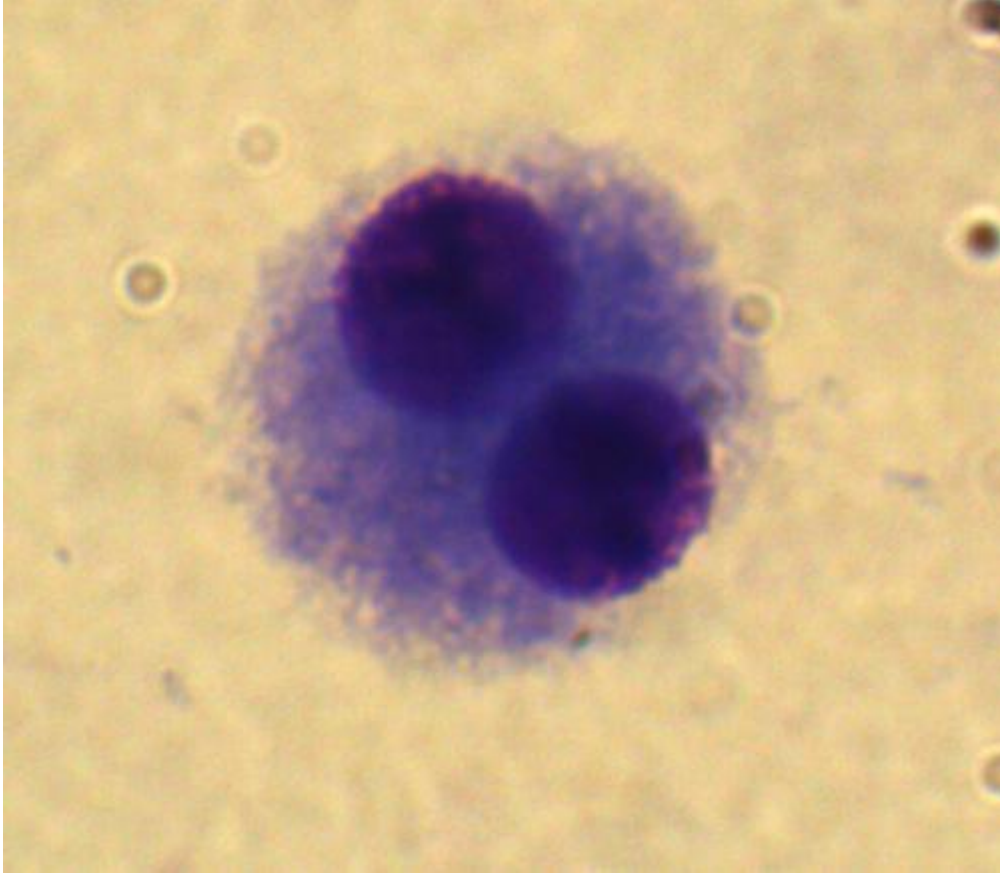
Apoptotik ve nekrotik hücreler ışık mikroskopunda çekirdeğin yapısına bakılarak belirlenmiştir. Apoptotik hücrelerde nükleus küçük parçalara ayrılmıştır ve hücre zarının yapısı kısmen bozulmuştur. Nekrotik hücrelerde ise solgun bir çekirdek yapısı vardır ve içleri boşluklarla doludur. Nekrotik hücrelerin stoplazmasının yapısı da bozulmuştur. NCBİ: Nükleer sitotoksik bölünme indeksi:  $(A_p + N_{ec} + M_1 + 2(M_2) + 3(M_3) + 4(M_4)) / N$  formülü yardımı ile hesaplanmıştır [21].

### 3.10. Hücre Sayısı ve İstatistiksel Değerlendirme

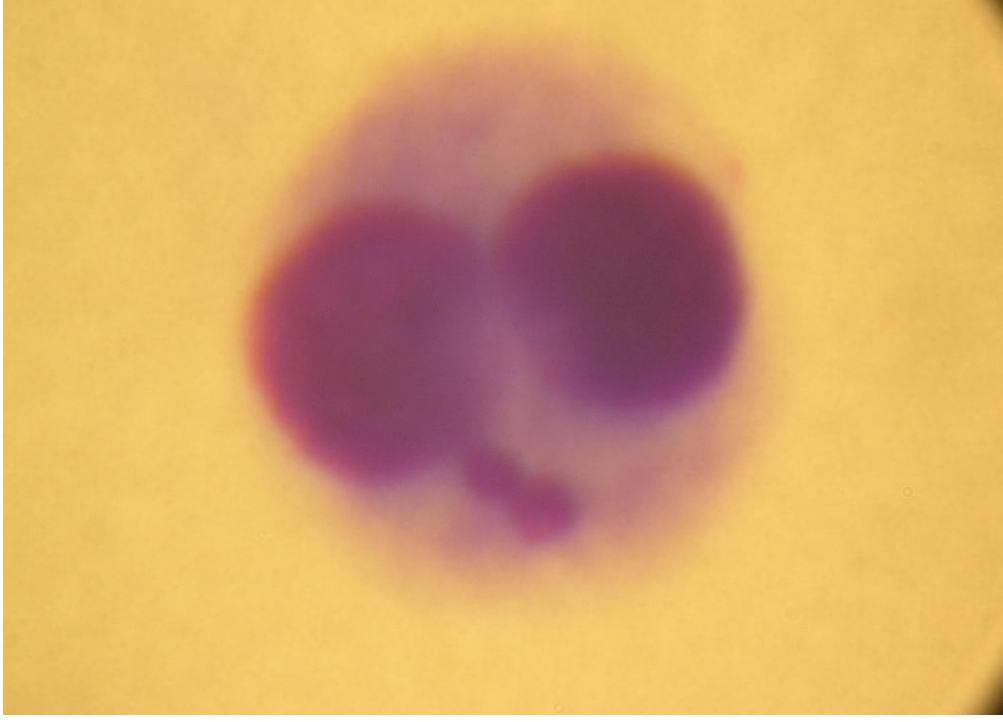
İstatistiksel analiz “GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego California USA)” programıyla yapılmıştır. Kültürde bulunan hücrelerdeki mikronükleus sıklığındaki artış Dunnett's *t*-test ile hesaplanmıştır [28].

#### 4. BULGULAR

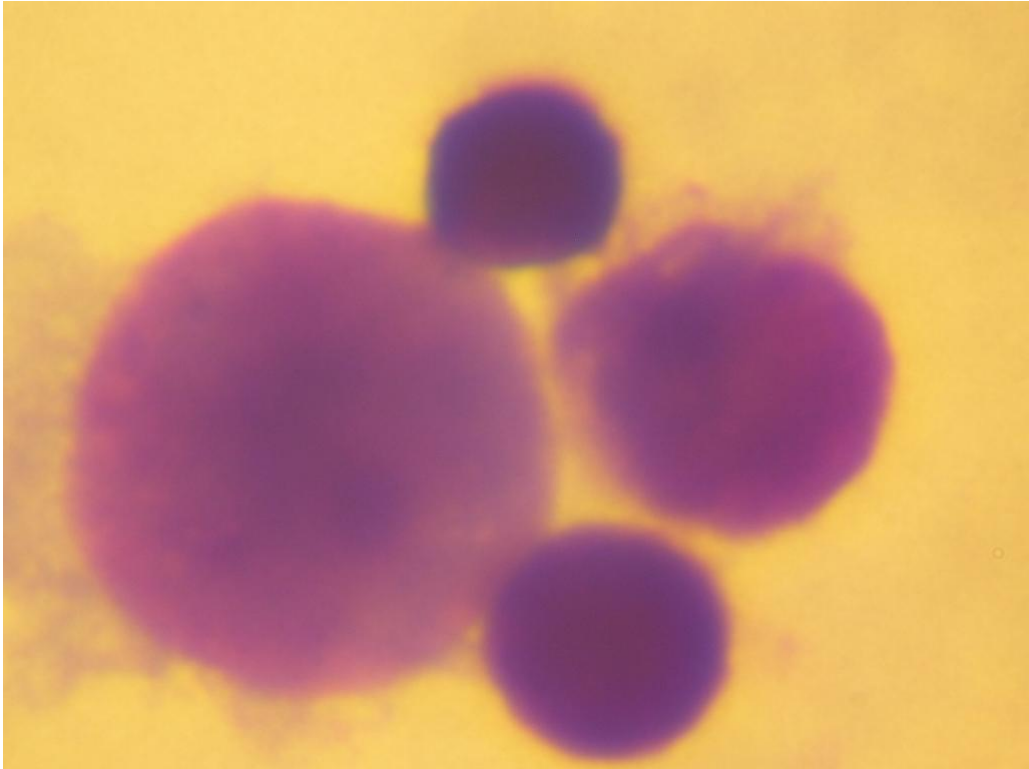
Kapsaisin'in 3 farklı dozu (80, 120, 160  $\mu$ M) insan periferel kanının kullanıldığı lenfosit kültürüne 24. saatte eklenmiştir. Sitokinez olayı sitokalsin-B ile engellenerek mikronükleus sıklığı ve hücre ölümü (apoptoz ve nekroz) incelenmiştir. İnsan hücrelerine Kapsaisin'in yaptığı etki tablo..'de gösterilmiştir. Kapsaisin tüm dozlarda kontrollere göre hücre ölümünü istatistiksel olarak artırmış ve bölünme indexini düşürmüştür ( $r = -0.88$ ). Kapsaisin pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin den daha fazla hücre ölümüne sebep olmuştur. Hücre ölümü ile doz arasında bir bağlantı saptanamamıştır. Çekirdek bölünme indeksi hücrelerde bulunan çekirdek sayısına göre hesaplanmıştır ve Tablo 4.1'de verilmiştir.



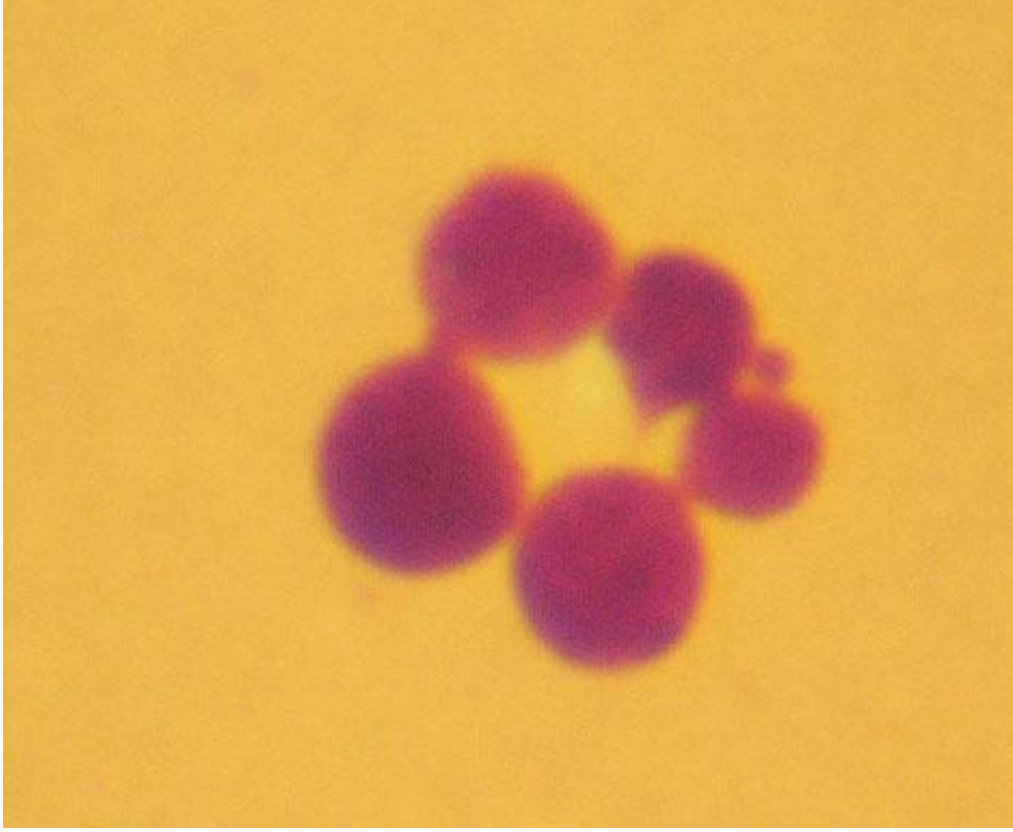
**Şekil 4.1:** Normal sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu hücre.



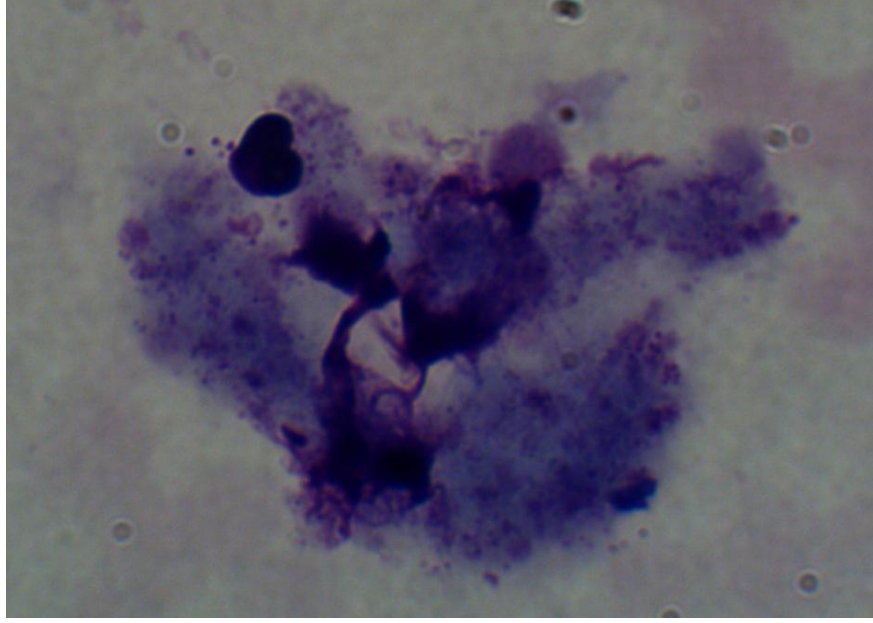
**Şekil 4.2:** Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve bir mikronükleus içeren hücre.



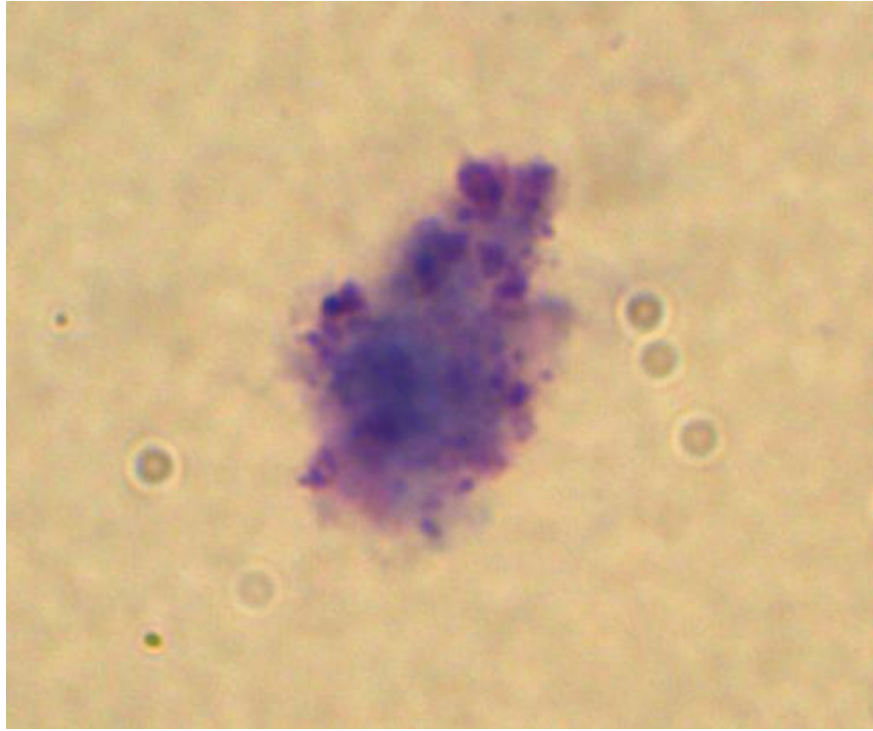
**Şekil 4.3:** Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve iki mikronükleus içeren hücre.



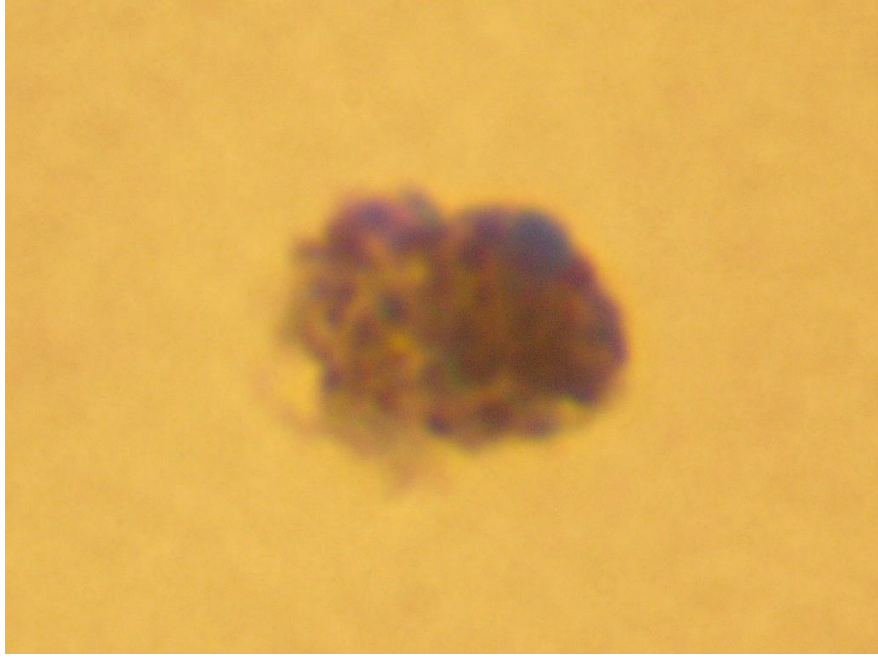
**Şekil 4. 4:** Sitokinezi engellenmiş çok nükleuslu ve apoptoza giden bir hücre.



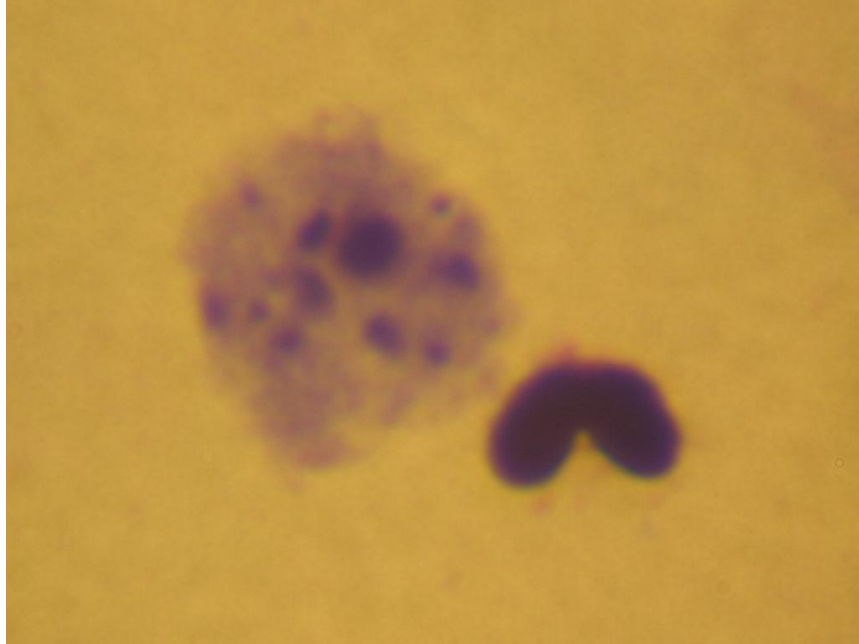
**Şekil 4.5: a.**



**Şekil 4.5: a, b. Apoptotik Hücreler.**



**Şekil 4. 6:** Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre



**Şekil 4.7:** Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre.

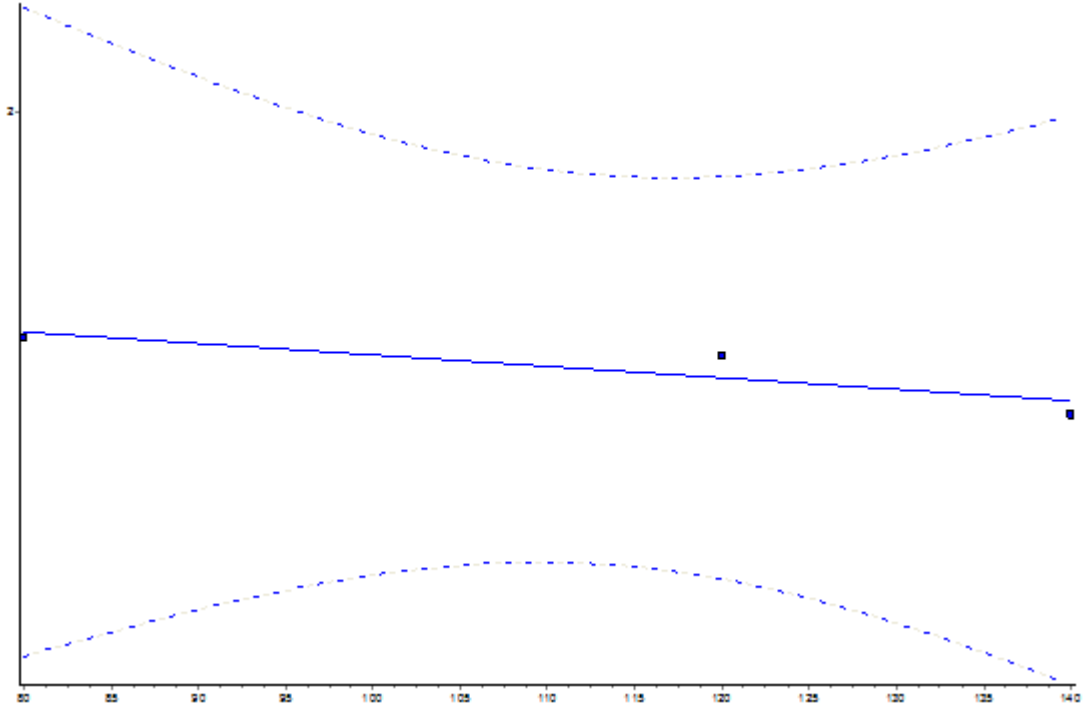


**Tablo 4. 1.** Kapsaisin'in insan lenfositlerinde mikronükleus sıklığı, nükleer bölünme indeksi, nükleer sitotoksik bölünme indeksine etkileri

Test Maddesi	Uygulama		Sayılan Hücre Sayısı	Çekirdek sayısı				NBİ ±SH	A	N	NSBİ
	Süre (s)	Doz		1	2	3	4				
Negatif Kontrol	-	-	2000	744	978	93	185	1.86±0.34	0	0	1.86±0.34
PK (MMC)	24	0.5 µg /ml	2000	1186	690	64	60	1.49±0.90	22	25	1.51±1.15
Kapsaisin	24	80 µM	2000	1206	492	146	150	1.61±0.73*	66	56	1.67±1.05
	24	120 µM	2000	1164	444	170	149	1.58±0.55*	37	27	1.61±0.85
	24	160 µM	2000	1105	536	164	71	1.48±0.84*	74	50	1.54±0.92

\*Belirgin bir şekilde negatif kontrolden farklı  $P < 0.05$  (Dunnett's *t*-test). NBİ: Nükleer Bölünme indeksi. NSBİ: Nükleer sitotoksik bölünme indeksi. PK: Pozitif Kontrol. A: Apoptotik hücre N: Nekrotik Hücre. SH: Standart Hata

**Çizelge 4.1.** Kapsaisin doz-çekirdek bölünme indexi regressyon çizelgesi



Tablo ve çizelgelerden de görülebileceği gibi kapsaisin bölünme indeksini düşürmekte, apoptoz ve nekroza sebep olmaktadır.

## 5. TARTIŞMA

Capsicum cinsinden olan acı kırmızıbiber (*Capsicum annuum*) *Solanaceae* familyasındandır. Anavatanı Güney Amerika olmakla birlikte Güney Asya ülkeleri, ülkemizin Güney Doğu Anadolu Bölgesi gibi dünyanın çeşitli bölgelerinde 7000 yıldır yetiştirilmektedir. Yapılan çalışmalar kırmızıbiberin baharat olarak Hindistan'da kişi başına günde 2,5 g, Tayland'da 5 g ve Meksika'da 20 g acı biber tüketimi rapor edilmiştir. Amerika ve Avrupa'da ise kişi başına günlük kapsaisin tüketiminin 1,5 mg civarında olduğu tahmin edilmektedir. Acı biberin yapısında kapsaisin, nordihidro-kapsaisin, homodihidro-kapsaisin, dihidro-kapsaisin ve homokapsaisin olarak adlandırılan kapsaisinoidler bulunduğu saptanmıştır [29].

Kapsaisinin bazı kanser türlerini açığa çıkaracağı saptanmıştır. Meksika'da yapılan kontrollü çalışmada 220 mide kanseri vakası ile birlikte genel popülasyondan 752 kişi seçilmiş ve acı biber tüketenlerdeki mide kanseri riski tüketmeyenlere göre 5.5 kat daha fazla bulunmuştur [30].

Acı biber tozunun ağız boşluğu, farinks, yemek borusu ve gırtlak kanseri için risk faktörü olduğu (doza bağlı olarak 2–3 kat) Hindistanda yapılan bir çalışma sonucu saptanmıştır [31].

Bitki özütlerinin hücreler üzerine çok büyük etkiler yapabildiğini Kolsişin ve Fitohemaglutinin örneklerinden ayrıntılı olarak biliyoruz. İncelenmesi amaçlanan kırmızıbiberin yapısında bulunan capsaicinin olası genotoksik, anojenik (hücre bölünme mekanizmasını etkileyen ajan) ve klastojenik (kromozomları etkileyen ajan) etkilerinin ortaya konulması önemlidir.

Bu etkilerin açığa çıkarılmasının;

- 1- Besin güvenirliliği açısından,
- 2- Literatüre katkı açısından,
- 3- İleride yapılacak antimutajenik çalışmalara direk kaynak olması açısından,
- 4- Yapılacak diğer çalışmalara kaynak olması açısından,
- 5- İlaç sanayisine katkı yönünden, önemlidir.

Bitki ekstraktlarının kromozomlar üzerine yaptığı etki üzerine pek çok araştırma vardır. Bitki uçucu yağları kompleks hidrokarbonların bir karışımıdır ve genellikle terpenlerden oluşur. Bitki uçucu yağları koku ve aroma oluşturma kapasitelerine göre sınıflandırılabilir. Bitki uçucu yağları, besin ve içecek katkısı olarak, kozmetik olarak, sabun ve deterjanlara koku olarak, böcek ve sinek öldürücülere katkı olarak kullanılabilir. Pek çok ülkede bitki uçucu yağlarının kullanımı kontrol altına alınmıştır. Bu uçucu yağların akut ve kronik toksisitesi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalar genellikle antimikrobial etkileri üzerinedir. Oysa bitki özütlerinin kansorejenik, teratojenik ve mutajenik etkileri bildirilmiştir. Klasik kromozom elde edilme yöntemlerinde bile bitkisel materyal sıklıkla kullanılmaktadır. Kolsişin kar çiçeğinden (*Colchicum*) elde edilir ve iğ ipliklerini kırarak kromozomların kutuplara çekilmesini önler. Kolsişin sayesinde kromozomlar metafaz evresinde yakalanır ve incelenir. Yine insan kromozomu incelemelerinde insan kanı kullanılır. Normalde insan kan hücreleri dolaşımında bölünmez ve bölünmeyen hücrelerde kromozom incelemesi yapılamaz. *Fitohemaglutinin* fasulyeden (*Phaseolus vulgaris*) elde edilir ve bölünmeyen kan hücrelerini bir nevi kanserleştirerek bölünmeye zorlar. Bu örneklerden de görüleceği üzere bitki özütleri oldukça etkili hücre bölünme düzenleyicisi olabilirler.

Bugün dünyada kullanılan bitki sayısı Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre 20.000 civarındadır. Bunlardan 4000 drog yaygın bir şekilde kullanılırken yaklaşık % 10'unun ticareti yapılmaktadır. Özellikle son on yılda bitkisel ilaçlara olan ilgi ve talebin aşırı derecede artması, bitkilerin doğrudan ilaç olarak kullanımının ve bitkilerden ilaç geliştirme çalışmalarının hızlanmasını sağlamıştır. Son yıllarda tüm dünyada bitkiler üzerinde klinik amaçlı ve salgın hastalıkların kontrolü yönünde çalışmalar sürdürülmekte, çeşitli enzim sistemleri kullanılarak, bitkilerden biyoaktif maddelerin bulunması için ileri düzeyde çalışmalar yapılmaktadır. Uluslararası büyük ilaç şirketlerinin hemen hepsinin, büyük ya da küçük, bir bitkisel ürün araştırma bölümü bulunmaktadır. Bazı bitki ve baharat uçucu yağlarının biyolojik aktiviteleri üzerindeki araştırmalar sonucunda bu baharatlardan bazılarının; insektisidal, antibakteriyel ve antimikotik, antiviral, antiseptik, spazmolitik, antioksidant antikarsinojenik, antiplazmoidal ve antitoksijenik gibi ilginç aktiviteler gösterdikleri görülmüştür. İlaç, kozmetik, parfümeri, gıda, veteriner hekimlik ve tarım alanlarında bitkisel kaynaklı

ürünlerle alınan patent sayısı giderek artmaktadır. Bitkisel ilaçlara ve bitkilerden elde edilen hammaddelere ilginin arttığı günümüzde, özellikle bazı bitkiler kullanım alanları, miktarları ve insanlar tarafından yararlı etkilerinin onaylanması açısından diğer bitkilere oranla daha fazla öneme sahiptirler [11-14].

Qari [32] *Origanum majorana*'nın antimutajenik potansiyelini *Vicia faba* kök meristematik hücrelerinde incelenmiştir. *Vicia faba*'nın kök uç hücreleri 6 saat 250 ve 350 µg/ml sodyum asit ile muamele edilmiş ve sodyum asitle muameleden sonra *Origanum majorana* 50,100 ve 200 µg /ml 20 saat verilmiştir. Uçlar kolşisinle muamele edildikten sonra ezilmiş ve hücreler kromozom anormallikleri ve mitotik indeksi bakımından incelenmiştir. *Origanum majorana* kontrolle karşılaştırıldığında *Vicia faba*'nın kök uç hücrelerinde önemli bir etki göstermemiştir. Sodyum asit tek başına artan konsantrasyonları ile kromozom anormalliklerini önemli derecede indüklemektedir. Anormalliklerin bir kısmı kök ucu hücreleri *Origanum majorana* ile ön muameleye tabi tutulduğunda önemli derecede azalmaktadır. Bu çalışma *Vicia faba* kök meristematik hücrelerinde sodyum asidin indüklendiği kromozomal anormalliklere karşı *Origanum majorana*'nın antimutajenik potansiyele sahip olduğunu gözler önüne sermektedir. Ayrıca *O.Majora* ile muamele edilen tüm gruplarda mitotik indeks yüzdesinin azalması düşük oranda gerçekleşmiştir. *Origanum majora*'nın antimutajenik potansiyeli *Vicia faba* kök meristematik hücrelerinde 50 µg /ml konsantrasyonunda etkilidir.

Gálvez ve arkadaşları [33] kanser tedavisi için geleneksel ilaç olarak kullanılan yedi *Plantago* türünün metanolik ekstraktlarını üç insan kanser hücresine karşı sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Flavonoidler insan kanser hücrelerinin poliferasyonuna karşı güçlü bir inhibe edici etki gösterebildiklerinden, birçok *Plantago* türünde önemli flavonoid olarak bilinen luteolin-7-O-β-glukosid belirlenmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre *Plantago* türlerinin kültür içinde test edilen hücreler karşı belirli ölçüde sitotoksik etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

*Plantago major*'un havalı yaprak ve tohumlarından su, metanol, kloroform ve hekzan ekstraktları kemik iliği CD1 ve dalak, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Candida albicans* kültür ortamları içine ve metanol ekstraktları da HTC-15, OVCAR, UISO ve KB kültür ortamları içine eklenmiştir [34].

Mori ve arkadaşları kapsaisin'in kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğunu ve kapsaisin'in bazı prostat kanser hücrelerindeki apoptoz oranını artırdığını göstermişlerdir [35].

Bizde çalışmamızda kapsaisin'in bütün deneme gruplarında, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 24 saat sonunda hücre bölünme indexinde ve hücre ölümünde belirgin istatistiksel değişikliklere sebep olduğunu belirledik. Günümüzde yaygın olarak kullanılan acı biberin asıl bileşenlerinden olan kapsaisin'in hücre bölünme mekanizmaları üzerine yaptığı değişimler, zayıflama amacı ile yada diğer amaçlarla kullanımının sınırlanması gerekliliğini göstermiştir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Cakilcioglu U, Turkoglu I: An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazig-Turkey). *J Ethnopharmacol* 2010; 132(1): 165-175.
2. Davis PH: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, *Edinburgh Univ Press*, 1982, pp: 633-635.
3. Sezik E, Yesilada E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T: Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *J Ethnopharmacol* 2001; 75(2-3):95-115.
4. Koenig WA, Joulain D, Hochmuth DH: Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. MassFinder 3. Hochmuth DH (ed). *Convenient and Rapid Analysis of GCMS*, Hamburg, Germany, 2004.
5. Kızılaslan, A., Karıdalı Tipi Biber Salçasının Özelliklerinin İyileştirilmesi Üzerine Bir Araştırma. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (1993).
6. Ekbiç, E., Biberlerde Patates Y virüsüne (PVY) Dayanıklılık Özelliği için Bulk Segregant Analizi Tekniği (BSA) ile RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Marke'larının Araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi (1998).
7. Sürmeli, N., Gürsoy, A., Yağlık (Salçalık) Biber Islahı. Yalova. Bahçe 14 (1-2) s.31-35 (1985).
8. Asımgil, A., Şifalı Bitkiler. Timaş Yayınları, İstanbul. s.176 (1993).
9. Bağcı, M., Özçalabı, R., Yabancı ve Yerli Biber Çeşitlerinin İhracatçı ve Salça İmaline Uygunluğu ve Bölgeye Adaptasyonu Üzerine Araştırmalar. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu. Tarım Ormancılık Arş. Grubu, s.73 (1974).
10. Bosdland, P.W., Chiles: History, Cultivation and Uses. G. Charalambous (Ed.) Spices, Herbs and Edible Fungi, Elseiver Science B.V. New Mexico (1994).

11. Akgül, A., Baharat Bilimi ve Teknoloji. Gıda Teknolojisi Dergisi Yayın No: 5 Ankara (1993).
12. Greenleaf, W.H., Breeding Vegetable Crops AVI Publishing Company, INC. Westport, Connecticut, Vegetable Crops Department, University of Florida, Gainesville/Florida. S.67-127.(1986).
13. Thomas, B.V., Schreiber, A.A., Weisskopf, P.C. : Simple Method for Quantitation of Capsaicinoids in Peppers Using Capillary Gas Chromatography, J Agric Food Chem., 46, 2655-2663 (1998)
14. Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Yayınları No:3255-Eczacılık Fakültesi No:40 Sanal Mat. s.267.(1984).
15. Schormiller, Alkaloidhaltige Genusmittel, Gewirze, Kochsalz. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, 400, 1970.(1996).
16. Erdost, H.: Toksik ya da Toksik Olmayan Dozlarda T.ketilen Kırmızı Acı Bibere Bağlı Olarak Organizmada Meydana Gelen Değişiklikler. Uludağ .niv. Vet. Fak. Derg., 1 (15): 245- 253.
17. Saga, K., Studies on the Pungency of Red Pepper Fruit; the Effect of Mineral Nutritiomn, Especially Phosporus Nutrition. Bulletin of the Faculty of Agriculture. Hİrosaki University, HORTCD. Abs. 730308706. No:18; s. 96-106.(1972).
18. Palacio, J.J.R., Spectrophotometric Determination of *Capsaicin*. Journal of the Assoication of Officinal Analytical Chemists, 60: s. 970-972.(1977)
19. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. Pathol Annu. 1982; 17: 229-259.
20. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. Mol Endocrinol. 1994; 8: 665-73.
21. Altunkaynak, B. Z., Özbek, E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? Tıp Araştırmaları Dergisi: 2008 : 6 (2) :93 -104
22. Fenech, M., Morley, A. A., “Measurement of micronucleus method in human lymphocytes”, *Mutat Res*, 147: 29-36 (1985).
23. Connor, J. M., Ferguson-Smith, M.A. Essential Medical Genetics. Blackwell Scientific Puplicaton.(1993).



- 24.** 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).
- 25.** Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M., The Relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 5(3),19-24 (1991).
- 26.** Ulupınar, M., Alaş, A., "Balık Sitogenetiği ve Laboratuar Teknikleri Kitabı" I Baskı, s. 10 (2002).
- 27.** Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M., The Relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 5(3),19-24 (1991).
- 28.** Lazutka JR, Mierauskiene J, Slapsyte G, Dedonyte V. Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha x piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology 39(5):485-492 (2001).
- 29.** GraphPad Software, InStat guide to choosing and interpreting statistical tests, (1998) GraphPad Software, Inc., San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)
- 30.** Kosuge, S., Inagaki, Y. : Studies on the Pungent Principles of Red Pepper. Part XI. Determination and Contents of the Two Pungent Principles. Nippon Nogei Kagaku Kaishi, J Agric Chem Soc., 36, 251 (1962)
- 31.** Lopez-Carillo, L., Avila, H. M., Dubrow, R. : Chili Pepper Consumption and Gastric Cancer in Mexico: A case-control study, Am J Epidemiol., 139, 263-271 (1994)
- 32.** Bevan, S.J., Docherty, R.J. : Cellular Mechanisms of the Action of Capsaicin. In: Wood J, ed., Capsaicin in the Study of Pain, Academic Press, London, England, (1993), pp : 27-44.

- 33.** Qari S.H. “*In vitro* evaluation of the anti-mutagenic effect of *Origanum majorana* extract on the meristemetic root cells of *Vicia faba* JTUSCI 1: 6-11 (2008)
- 34.** Marina Gálvez, Carmen Martín-Cordero, Miguel López-Lázaro, Felipe Cortés, Maria Jesús Ayuso, “Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines.” *Journal of Ethnopharmacology* 88 125–130 (2003)
- 35.** R. Velasco-Lezama, R. Tapia-Aguilar, R. Román-Ramos, E. Vega-Avila, Ma. S. Pérez Gutiérrez.” Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro” *Journal of Ethnopharmacology* 103 36–42 (2006)
- 36.** Mori, A., Lehmann, S., O’Kelly, J., Kumagai, T., Desmond, J.C., Pervan, M., McBride, W.H., Kizaki, M., Koeffler, H.P. : Capsaicin, a Component of Red Peppers, Inhibits the Growth of Androgen-Independent, p53 Mutant Prostate Cancer Cells, *Cancer Res.*, 66, 3222-3229 (2006)

## 7. ÖZGEÇMİŞ

**Nevin İTİK;** 1980 yılında Konya merkezde doğdu. İlk öğrenimini Koyunoğlu İlköğretim okulunda ortaokulu ve lise öğrenimini Karatay Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2005-2010 yılları arasında Konya Başkent Üniversitesi hastanesinde ardından Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde uzman Biyolog olarak çalıştı. Halen çalışmaya devam etmektedir. 2009 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. Halen Yüksek Lisansına devam etmektedir.