

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAPSAİSİN'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİT KROMOZOMLARINA VE
HÜCRE BÖLÜNME İNDEKSİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mesut TAŞKIRAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Süleyman GÜL

2010

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mesut TAŞKIRAN'ın yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "KAPSAİSİN'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİT KROMOZOMLARINA VE HÜCRE BÖLÜNME İNDEKSİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy.....birliği.....ile kabul edilmiştir.

23/06/2010

Adı Soyadı

İmza

Başkan : Doç. Dr. Süleyman GÜL

Üye : Doç. Dr. Hasan ORAL

Üye : Y. Doç. Dr. Hüseyin GEY



Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/....../2010. gün ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdullah DOĞAN

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 Arş. Gör. Pınar AKSU'ya laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan doktora öğrencisi Şebnem YILDIRIMCAN' a ve tezimin hazırlanmasında yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi Ümit BOZKURT'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Mesut TAŞKIRAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
ÖZET	IV
ABSTARACT	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
SİMGELER VER KISALTMALAR	VII
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kapsaisin	2
2.2. Kromozomlar	4
2.2.1. Kromozom Anomalilikleri	7
2.3 ANALİZ YÖNTEMLERİ	9
2.3.1 Kromozom Tipi Hataların Belirlenmesi	9
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Mitomisin-C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503)	11
3.1.1. Mitomisin-C (MMC)' nin Özellikleri	11
3.1.2. Mitomisin-C (MMC)'nin Kullanım Alanları	11
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Eriyiklerinin Hazırlanması	12
3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	12
3.2.2. Kapsaisin'in Hazırlanması	13
3.2.3. Mitomisin- C (MMC) Eriyiğinin Hazırlanması	13
3.2.4. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması	13
3.2.5 Boyanın Hazırlanışı:	13
3.2.6. Kromozom Medyumu	13
3.2.7. Kolsişin	13
3.2.8. Hipotonik Eriyik	14
3.2.9. Fiksatif	14
3.2.10. Giemsa	14
3.3. Kullanılan Deney Ekipmanları	14
3.3.1. Hassas Terazî	14
3.3.2. Santrifüj	14
3.3.3. Mikroskop	15

3.3.4. Etüv	15
3.3.5. Deney Ekipmanları	15
3.3.6 Sarf Malzemeler	16
3.4. Kromozom Anomallikleri (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	17
3.4.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	17
3.5. Mikroskopik inceleme	19
3.5.1 Kromozom Anomalilerinin Saptanması	20
4.BULGULAR	21
4.1. Kapsaisin'in İnsan Kromozomlarına Etkisi	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
6. KAYNAKLAR	35
7. ÖZGEÇMİŞ	39

ÖZET

Bu çalışmanın amacı kapsaisin'in insan lenfositlerinde kromozomal aberasyon analizlerinin kullanılmasıyla in-vitro koşullarda klastojenik etkilerinin belirlemektir. İnsan kan lenfosit hücreleri, lenfosit kültüründe kapsaisin'in 80µM, 120µM, 160 µM ' lik dozları ile 24-48 saat etkileşime bırakıldı. Kapsaisin'in 80-120 ve 160 µM denemeleri negatif kontrol ve pozitif kontrol olarak kullanılan Mitomisin-c ile karşılaştırıldığında 24-48 saatlerde, kromozomal aberasyon sıklığında önemli derecede bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Bazı kapsaisin dozlarında (120 µM) ve pozitif kontrolde poliploidi oluşmuştur. Bütün deneme grupları, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 24-48 saat sonunda kapsaisin konsantrasyonuna ilaveten kromozom aberasyon sıklığında istatistiksel olarak önemli derecede bir artış göstermiştir. Ayrıca Mitomisin-C denemesi aberant hücrelerin sıklığında artışa neden olmuştur. Kromozom ve kromotid kırıkları, kardeş kromotid birleşimi ve kromotid değişimi bütün konsantrasyon denemelerinde gözlemlenmiştir. Çalışmamız sonucunda, kullandığımız kapsaisin'in 80 µM-120 µM dozları kromozomlarda ve kromatitlerde kırıklara neden olurken, 160 µM de hücre bölünme indeksini düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kapsaisin, Mitomisin- C (MMC), Lenfosit kültürü, Kromozom kırıkları.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the in-vitro analysis of clastogenic effects of capsaicine, using chromosomal aberration analysis in human lymphocytes. Human peripheral blood lymphocyte cells were treated with 80 μM , 120 μM , 160 μM , concentrations of capsaicine for 24 h and 48 h. A significant increase in chromosomal aberration frequency was observed in all treatments of capsaicine (80, 120,160 μM) at 24 and 48 h compared with the negative control and mitomycin C (MMC, 0.3 $\mu\text{g/ml}$), which was used as a positive control. Some capsaicine concentrations (120 μM) and the positive control produced polyploidy. Statistical analysis demonstrated a significant increase in CA frequency after the addition of capsaicine concentration after 24 and 48 h, compared with the negative control, in all treatment groups. The mitomycin treatment also caused a significant increase in the frequency of aberrant cells. Chromatid and chromosome breaks, sister chromatid union and chromatid exchange were observed in all treatment concentrations. According to the results of our study, it was observed that capsaicine at doses of 80-120 μM resulted in breakage in the chromosomes and chromatids, whereas capsaicine at the dose of 160 μM reduced the cell division index.

Key words: *Capsaicine, Mitomycin-C (MMC), Lymphocyte cultures, Chromosome aberrations, mitotic index*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Kırmızı Biber Bitkisinin Görünümü.....	2
Şekil 2: Trans ve cis kapsaisin'in kimyasal yapısı.....	3
Şekil 3: Elektron Mikroskopunda Kromozom Görüntüsü.....	5
Şekil 4: Mitoz esnasındaki bir insan kromozomunun şematik görünümü.....	6
Şekil 5: Sentromerin yerleşim bölgesine bağlı farklı kromozom tipleri.....	7
Şekil 6: Kromozom Analizinin Aşamaları.....	19
Şekil 7: A,B. Normal bir bayana ait kromozomlar.....	22
Şekil 8: Mitomisin-c'nin insan kromozomlarına etkisi.....	23
Şekil 9: DMSO ile etkileşim içinde kalan kromozomlar.....	24
Şekil 10: 80 µM'lık dozun 24 saatlik etkisi.....	25
Şekil 11: A,B. 80 µM'lık dozun 48 saatlik etkisi.....	27
Şekil 12: 120 µM'lık dozun 24 saatlik etkisi.....	28
Şekil 13: 120 µM'lık dozun 24 saatlik etkisi.....	29
Şekil 14: 120 µM'lık dozun 48 saatlik etkisi.....	30
Şekil 15: 120 µM'lık dozun 48 saatlik etkisi.....	30

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ M : Mikromolar

MMC : Mitomisin-C

KA: Kromozom Anomallikleri

CA: Chromosomal Aberration

μ l: Mikrolitre

DMSO: Dimetil sülfoksit

rpm: Devir Sayısı

1.GİRİŞ

Bugün dünyada ilaç yapımında ve ticari amaçla kullanılan bitki sayısı Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre 20.000 civarındadır. Bunlardan 4000 drog yaygın bir şekilde kullanılırken yaklaşık % 10'unun ticareti yapılmaktadır [1]. 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, veteriner hekimlik ve tarım alanlarında bitkisel kaynaklı ürünlerle alınan patent sayısı giderek artmaktadır [2]. 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.

Dünyada hayatın başladığı kabul edilen 4,6 milyar yıl önce, DNA(deoksiribonükleik asit) yaşamın hücresel metabolik aktivasyonlarını ortaya koyan genetik yapı olarak hizmet etmiştir. "Gen" terimi 1900'lü yıllara kadar kullanılmamasına rağmen genin fonksiyonu ile olan araştırma 1800'lü yıllarda başlamıştır. Gregor Mendel, Avusturyalı din adamı, manastırının bahçesinde yıllarca çalışıp, farklı bezelye varyetelerini melezlemiştir. Dikkatli kayıtlar tutarak, melezlerin döllerini saymış, bezelye şekli, çiçek rengi, bitki yüksekliği gibi özelliklere bakarak genlerin fenotipik ekspresiyonunu incelemiştir. Dikkatli gözlem, doğru kayıt tutarak verileri özenle analiz yapmış ve her bir bitkinin erkek ve dişi ebeveynlerinin döllerine kalıtım üniteleri veya faktörlerin varlığı teorisini ortaya koymuştur. 1884 yılında Mendel öldüğü zaman çalışmasının değerini kimse bilmiyordu. Mendel'in bulduğu faktör veya kalıtım ünitelerini gen olduğu 1900 yıllara kadar anlaşılamadı [3]. İnsan kromozomları ilk defa 1857'de Virehow tarafından görülmesine karşın, kromozom ile kalıtım arasındaki ilgiyi ortaya koyanlar Weissman (1883) Strasburger (1884) ve Kollieker(1885)'dir. Kromozom kelimesi ise ilk kez Waldeyer tarafından 1888 yılında kullanılmıştır [4].

Bu çalışmanın amacı bitkisel kökenli bileşik kapsaisin'in insan kromozomlarına sayısal ve yapısal olarak yaptığı etkilerin incelenmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kapsaisin

Yüzyıllardan beri insanlar tarafından gerek besin maddesi, gerekse ilaç olarak kullanılan ss biberi (*Capsicum* sp.) bitkisi de önemi giderek artan bitkilerden birisidir. *Solanaceae* familyasının *Capsicum* türü, 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, arliston, iri kare ve konik olmak üzere değişik tipleri vardır. Acılık meyvenin “kapsaisin” (C₁₈H₂₇O₃N) 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). Ss biberi bileşiminde ayrıca uçucu yağ ve sabit yağda bulundurmaktadır [6-9]. Kapsaisin miktarı türden tre 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 ss biberinde kapsaisin miktarı oldukça yüksektir [10-12]. Kapsaisin oranları % 0.1 [13] ile % 2 [14] arasında değişmektedir.



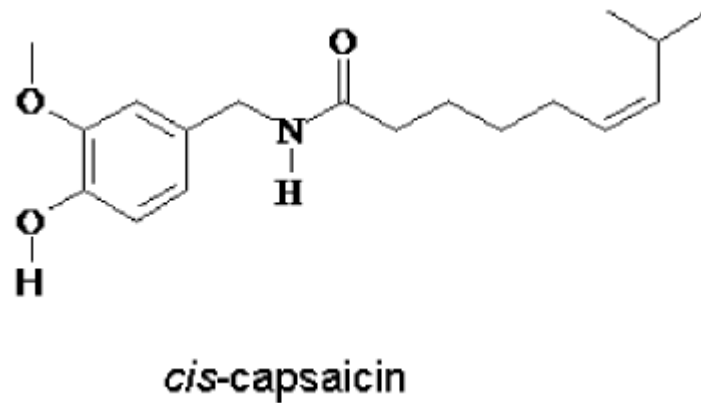
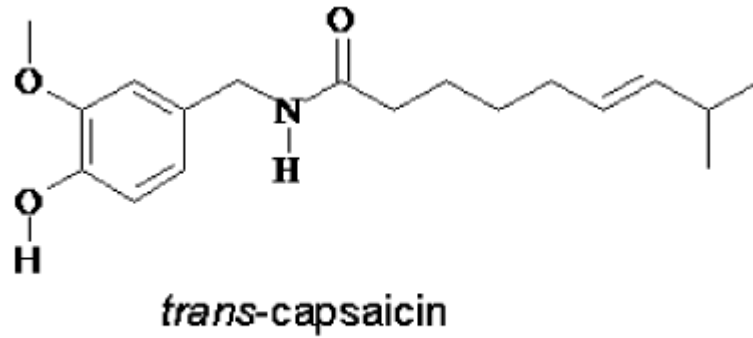
Şekil 1:Kırmızı Biber Bitkisinin Görünümü

Botanikte *kapsikum annuum* olarak adlandırılan kırmızı acı biberin etken maddesi olan kapsaisin, kuvvetli acı, beyaz, kokusuz, sıcak su, etil alkol, metil alkol ve asetonda kolayca eriyebilen bir maddedir. Kırmızı acı biberin yapısındaki kapsaisin miktarı % 0.12-17 mg arasında değişmektedir [15,16].

Saga (1972), gübrelemenin kırmızıbiber meyvelerinde acılık üzerine etkisini incelemiştir. Fosfor ve potasyum bulunmayan topraklarda yetiştirilen biber meyvesinde kapsaisin içeriğinin çok düşük olduğunu saptamıştır. Gelişme safhasında bulunan fosfor miktarının meyve gelişimini ve meyvenin kapsaisin içeriğini etkilediğini belirtmiştir [17].

Palacio (1977), kırmızıbiber meyvesinin içeriğinde bulunan kapsaisin maddesinin belirlenmesi amacıyla değişik metotlar denemiştir. Vanadium oksitriklorid kullanılan, colorimetrik yöntemin diğer yöntemlerden daha kullanışlı olduğunu bildirilmiştir [18].

Akgül (1993), biber meyvelerinin kimyasal yapısında bulunan başta kapsaisin olmak üzere karoten, kapsorubin, zeaksantin, kriptosantin, lutein vb. maddelerin biber bitkilerinin ontogenetik varyeteye ve yetiştiği ortamın ekolojik şartlarına göre değiştiğini bildirmiştir [11].



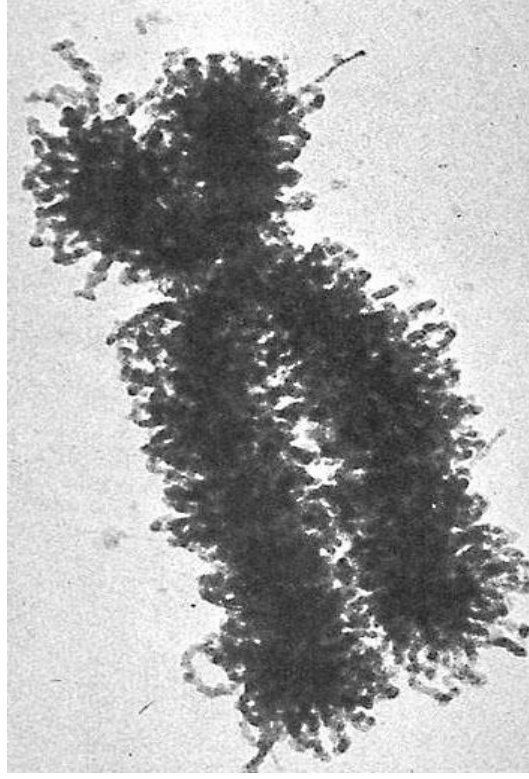
Şekil 2: Trans ve sis kapsaisin'in kimyasal yapısı

2.2. Kromozomlar

Kromozom, (Yunanca, *chromos*(renk),*soma*(vücut); DNA'nın "histon" proteinleri etrafına sarılmasıyla, yoğunlaşarak oluşturduğu, canlılarda kalıtımı sağlayan genetik birimlerdir. Her canlı gibi insan da trilyonlarca hücreden meydana gelir. Hücre , bitkisel ya da hayvansal her türlü yaşam biçiminin en küçük birimidir. Her hücre bir sitoplazma ve çekirdekten meydana gelir. Çekirdeğin içinde ise kromozom adı verilen iplikçi parçalar bulunur. Kromozomlar, molekül yapıları çok iyi bilinen DNA (deoksiribonükleik asit) zinciri ile histon denilen protein zincirinden oluşur. DNA zincirleri de özgül proteinleri sentezlemekle görevli gen adı verilen birimlerden oluşur [19].

Mitoz bölünmenin interfaz evresinde kromatin ağı şeklinde bulunan DNA profaz evresinde kısalıp kalınlaşmaya başlar ve metafaz evresinde en kısa duruma gelir. Yaklaşık 10.000 kat kısalmış haliyle ışık mikroskopunda 100'lük objektifte incelenebilir. Kromozomlar, İ, V, J harfleri gibi biçimlerde görünür ve boyutları mikronla ölçülür. Kromozomların sayısı canlı türlerinde değişiklik gösterir. Örneğin sirke sineğinde 8, kurbağada 26, farede 42, köpekte 78 kromozom vardır. İnsanın kromozom sayısı ise 46'dır. 22'si çift otozom kromozomdur. İnsan hücresinde 1 çift de eşeyssel kromozom bulunur ve toplam sayı 46 eder. Eşey kromozomları kadınlarda XX, erkeklerde XY' dir [20].

Kromozomların mikroskop altında incelendiği bilim dalına "Sitogenetik" adı verilir. Bu şekilde kromozom sayısında (ör. Down sendromunda 47, Turner sendromunda 45) veya yapısındaki (delesyon veya translokasyon vb.) değişiklikler bu şekilde saptanabilir. Ancak kromozomlardaki bir değişikliğin mikroskopta görülebilmesi için en az 3 milyon nükleotitlik bir kısmın değişmesi gerekir, daha küçük değişiklikler ancak moleküler genetik yöntemlerle incelenebilir [20].



Şekil 3: Elektron Mikroskopunda Kromozom Görüntüsü

Kromozomlar özel bazı bölgelerden oluşmaktadır:

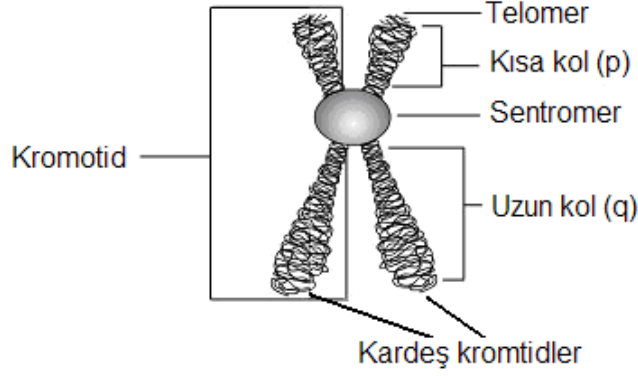
Kromatid: Kromatinlerin protein iskelete sarılması ile ortaya çıkan yapılara denir ve kromozomun kolları gibi görülürler. Sentromerin her iki tarafındaki kromatidler kromozom kolu olarak adlandırılırlar. Sentromerin ikiye ayırdığı kromatidler kromozomun kısa kolu (p kolu) ve uzun kolu (q kolu) olarak adlandırılırlar. Kardeş kromatidler birbiriyle tamamen aynı olan genetik bilgiyi taşırlar (Mayoz I'de krossingover'a kadar) [21].

Sentromer: Sentromerler aslında spesifik proteinlerin bağlandığı DNA dizileridir. Bu proteinler arasındaki kinetokor proteinleri, mayoz ve mitoz bölünmelerin anafaz safhaları esnasında kromozomların iğ ipliklerine tutunarak hücrenin kutuplarına doğru hareket etmelerini sağlarlar. Sentromer kromozomu p ve q olarak iki kola ayıran ve sitogenetik bir belirleyici olarak görünen primer boğum olarak tanımlanır [21].

Telomerler: Telomerler kromozomların uç kısımlarında bulunan özel DNA dizileridir. Kromozom uçlarında hem kendi üzerine katlanmasını hem de diğer kromozomlara yapışmasını engelleyerek kromozomun bütünlüğünde büyük rol oynarlar. Yaşlanma ile

birlikte telomerik DNA dizileri kısalmaya başlar. Kanser hücrelerinin telomerik dizilerinde kısalma gözlenmez [21].

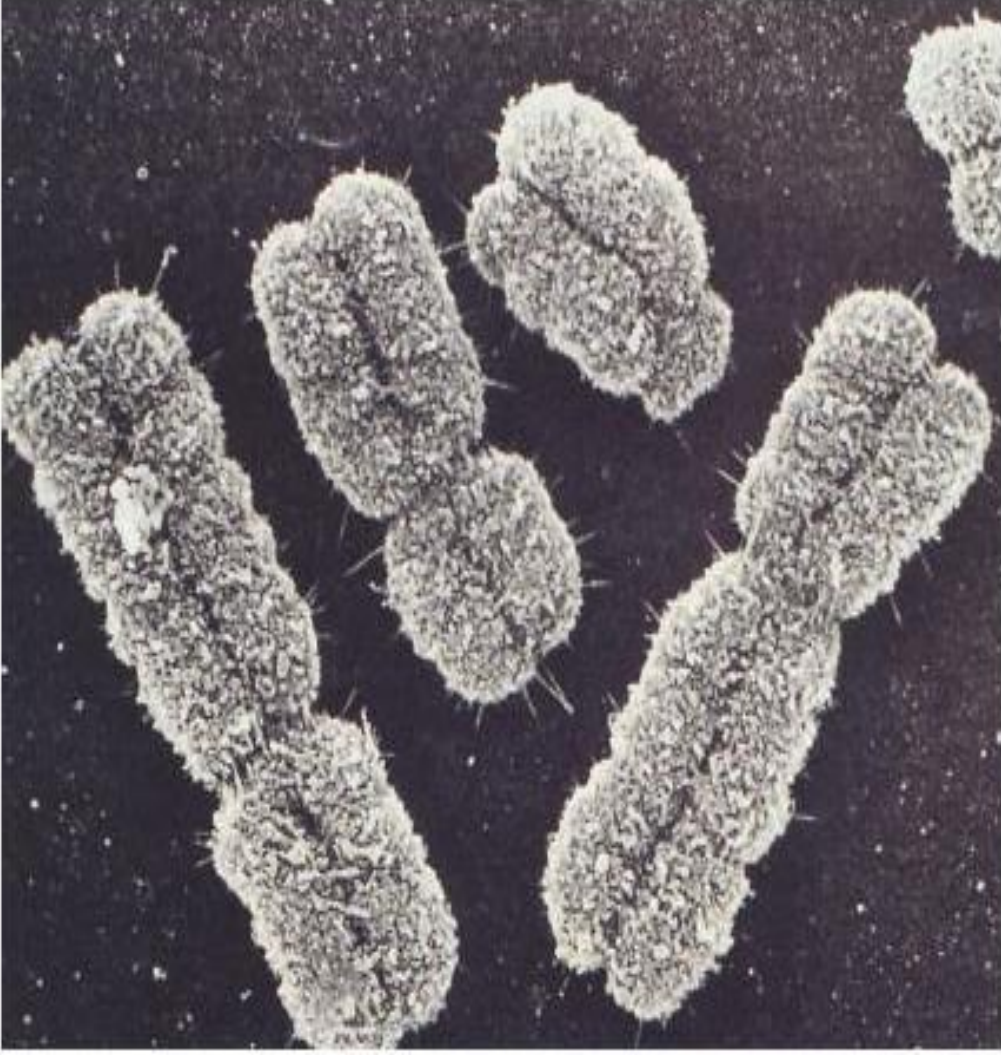
Replikasyon Başlangıç Noktası (Origins of Replication, ORI): Işık mikroskobu ile görülememesine rağmen, bütün kromozomlar en az bir tane DNA sentezinin başladığı bölge içerirler. Ökaryotik kromozomlarda birden fazla ORI bölgesi bulunur [21].



Şekil 4: Mitoz esnasındaki bir insan kromozomunun şematik görünümü.

Bölünen insan hücre kromozomları en kolay metafaz veya prometafazda analiz edilir. Bu evrede kromozomlar sentromerlerinden birleşmiş kardeş kromatidlerden oluşur ve mikroskop altında kromozom yaymalarında görünür durumdadırlar.

Kromozomların çoğu sadece boyları ile değil, aynı zamanda sentromerlerin kromozom üzerindeki yerleşimi ile de birbirlerinden ayrılırlar. Bir kromozom, sentromerinin pozisyonuna göre submetasentrik, metasentrik, akrosentrik ve telosentrik olarak ayırt edilebilir. Sentromer submetasentrik bir kromozomu kısa kol (p) ve uzun kol (q) olarak böler. Metasentrik kromozomlarda kısa ve uzun kollar yaklaşık aynı uzunluktadır. Akrosentrik kromozomlarda, kısa kol çok küçüktür ve kısa kolun ucunda satellit olarak isimlendirilen (satellit DNA ile karıştırılmamalı) yoğun bir yapı bulunur. Satellit büyüklüğü, bir bireyin her akrosentrik kromozomu için farklıdır (kromozomal polimorfizm). Telosentrik kromozomlarda kısa kol ve satellit bulunmaz. İnsan kromozomları arasında telosentrik kromozom bulunmazken ev faresinin (*Mus musculus*) tüm kromozomları telosentrik kromozomlardır [21].



Şekil 5: Sentromerin yerleşim bölgesine bağlı farklı kromozom tipleri.

2.2.1. Kromozom Anomalilikleri

Bir kromozomda meydana gelen yapısal yada sayısal değişiklikleri gösterir. Genellikle mayoz ve mitozu izleyen hücre bölünmesi sırasında meydana gelen hatalardan kaynaklanırlar. Birkaç farklı türü bulunmakla beraber, genel olarak sayısal ve yapısal anomaliler olarak iki ana gruba ayrılırlarm [22].

2.2.1.1. Sayısal Anomaliler

Çift kromozomlardan birinin kaybolması (monozomi) ya da bir çiftte ek olarak bir tane daha kromozomun bulunması (trizomi) olarak tanımlanır. Sayısal anomalilere en bilinen örnek, "Trizomi 21" (üç tane 21. kromozom) olarak da bilinen "Down Sendromu"dur. Monozomi olarak ise, eşey kromozomlarından birinin olmaması durumu olan (45,X) "Turner Sendromu" gösterilebilir [22].

2.2.1.2. Yapısal Anomaliler

Kromozomun yapısal formunun değişmesiyle oluşan birkaç farklı türü vardır:

Delesyonlar: Kromozomun yapısından bir parçanın kaybolmasıdır. Bilinen örnekleri; kromozom 4'ün kısa kolunda bir parçanın kaybolmasıyla meydana gelen Wolf-Hirschhorn sendromu ve 11. kromozomun uç (terminal) kısmında meydana gelen delesyon ile görülen, Jacobsen sendromudur.

Duplikasyonlar: Bir kromozomun bir parçasının kendini eşlemesiyle ve fazla genetik materyal oluşturmasıyla sonuçlanan düzensizliklerdir. Bloom sendromu ve Rett sendromu örnek olarak gösterilebilir.

Translokasyonlar: Bir kromozomun yada kromozom parçasının diğer bir kromozom ile birleşmesiyle meydana gelen düzensizliklerdir. İki çeşidi vardır; Resiprokal translokasyonlarda iki farklı kromozomdan parçalar karşılıklı değişir. Robertsonian translokasyonlarda, bütün bir kromozom diğerinin sentromerine birleşir. Bu yalnızca, 3, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlarda görülür.

İnversiyonlar: Kromozomdaki bir kısmın kopup, ters dönüp daha sonra tekrar aynı yere birleşmesiyle meydana gelen düzensizliklerdir.

Ring kromozomlar: Kromozomun bir parçasının kopup, daha sonra halka şeklinde kendiyile birleşmesiyle meydana gelen düzensizliklerdir. Genetik materyal kaybı olmadan yada olarak gerçekleşebilir [22].

2.3 ANALİZ YÖNTEMLERİ

2.3.1 Kromozom Tipi Hataların Belirlenmesi

Yapısal kromozom hatalarının iki tipini (kromozom tipi ve kromotit tipi) kapsamaktadır. Poliploidlikteki bir artış, kimyasal maddenin sayısal hatalarda oluşturma potansiyeline sahip olacağını gösterir. Kimyasal mutajenlerin çoğu, kromotit tip hatalar oluşturur. Ancak kromozom tipi hatalar meydana gelebilir.

Kromozom mutasyonları ve ilişkili olaylar birçok genetik hastalığın sebebini oluşturur. Ayrıca “onkogen” lerde ve tümör engelleyici genlerde değişikliklere yol açan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların insanlarda deneysel hayvanlarda kanser oluşmasına sebep olduğu hususunda çok önemli deliller bulunmaktadır. Kromozom hatası testleri in vivo ve in vitro olarak iki tarzda gerçekleştirilebilir [23].

2.3.1.1 İn-Vivo Kromozom Hatası Testi

İn-vivo kromozom hatası testi, türler arasında ve dokular arasında değişiklik göstermekle birlikte, özellikle in vivo metabolizma, farmakinetik ve DNA eşleme işlemi ile ilgili faktörlerin önem kazandığı mutajenik riski tayin etmek için uygulanır. Ayrıca, bir in vitro test yardımıyla belirlenmiş mutajenik bir etkinin daha fazla araştırılması içinde kullanışlıdır. Ancak, ulaşamayacağı test maddesinin veya bir reaktif bir metabolitenin hedef (kullanılacak) dokuya uzanamayacağı hususunda delil varsa, bu testi kullanmak doğru değildir. Böyle bir teste kullanılacak doku, kolaylıkla izole edilebilen ve işleme tabi tutulabilen ve hızlı hücre döngüsüne sahip hücrelerden oluşması gerekir.

Bu metot hayvanların uygun bir yol ve süre ile test maddesine maruz bırakılmasına ve bu sürenin sonunda öldürülerek hücrelerinin kromozomal hasar yönünden incelenmesi prensibine dayanır. Ancak, öldürmeden önce hayvanlar metafazda durdurma amili (örneğin; kolşisin ve kolsemid) ile muamele edilirler. Daha sonra kromozom preparasyonları yapılır, boyanır ve kromozom hatası olup olmadığını belirlemek amacıyla metafaz hücreleri analiz edilir [23].

2.3.1.2. İn-Vitro Kromozom Hatası Testi

İn-vivo'da olduğu gibi, in vitro kromozom hatası testide, kültürü yapılan hücrelerde yapısal kromozom hatalarına sebep olan amili tespit etmek amacıyla yapılır. Bu testin prensibi, hücre kültürlerinin metabolik aktivasyonlu ya da aktivasyonsuz test maddesine maruz bırakılmasına, önceden belirlenen aralıklarda metafazda durdurulmasıdır.

İn-vitro kromozom hatası testinde, oluşturulmuş hücre hatları, hücre soyları veya primer hücre kültürlerinin kültürlerini kullanılabilir. Kullanılacak hücreler; kültürde büyütülebilirliği, karyotip kararlılığı, kromozom sayısı, kromozom farklılığı ve kromozom hatalarının kendiliğinden olan frekansı gibi özellikler dikkate alınarak seçilir (23).

3. MATERYAL VE METOT

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

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

3.1.1. Mitomisin-C (MMC)' nin Özellikleri

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan, Mitomisin-C (MMC) mavi-menekşe renkte, kristal şeklinde ve suda çözünebilir bir maddedir. Suda çözünen (pH=6-9) eriyik, ısıktan korunduğu ve 5°C altındaki buzdolabında saklandığı zaman yedi gün özelliğini korumaktadır.

Mitomisin-C 2 mg ve 10 mg'lik şişelerde toz şeklinde bulunur. MMC antineoplastik ve geniş spektrumlu bir sitostatik (hücre bölünmesini durduran) ajandır [25].

3.1.2. Mitomisin-C (MMC)'nin Kullanım Alanları

Mitomisin-C (MMC), antineoplastik ilaçlar grubuna girmektedir. Bu grupta cyclophosphamide, daunamycin, Mitomisin-C, streptozotocin ve uracil mustard bulunmaktadır.

Mitomisin-C (MMC) çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan alkilleyici bir ajandır. MMC'nin kullandığı kanser türleri aşağıda verilmiştir.

- Mide kanseri
- Anüs ve kalın barsak kanserleri
- Göğüs kanseri
- Küçük hücreli akciğer kanseri
- Baş ve boyun kanserleri
- Küçük mesane papillomalan
- Pankreas kanseri

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Eriyiklerinin Hazırlanması

3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

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

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

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

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

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

6.Giemsa (Merck, HX694620)

Fosfat Tampon Çözeltisi : Potasyum di-hidrojen fosfat (KH₂PO₄)’dan 9.1 gr. alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır. Başka bir balon jöjeye de sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄)’dan 11,9 gr alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır ve stok çözeltiler hazırlanmış olur [26].

Sorenson Fosfat Tampon Çözeltisi: KH₂PO₄ çözeltisinden 60 ml. ve Na₂HPO₄ 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:

KH₂PO₄..... 9.1 gr.

Bidistile su.....1000 ml.

Çözelti 2:

Na₂HPO₄.....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.

3.2.2. Kapsaisin'in Hazırlanması

Yapılan hesaplamalarda molekül ağırlığı 305,4 olan kapsaisin (Sigma) maddesinden 26 mg alınarak 13 ml DMSO (Dimetil sülfoksit)' da çözülmüştür. Buda 0,05 ml'de 0,1 mg kapsaisin'in bulunduğunu gösterir. 80, 120, 160 μM 'lık dozlar kullanılarak çalışma yapılmıştır.

3.2.3. Mitomisin- C (MMC) Eriyiğinin Hazırlanması

2 mg Mitomisin-C bulunan ortama 2 ml steril bidistile su ilave edilerek MMC eritilmiştir. Sonra bu eriyikten 5 ml'lik kültür ortamına ilave edilerek son konsantrasyondaki MMC oranı 0.3 $\mu\text{g/ml}$ olan çözeltiler hazırlanmıştır.

Yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki MMC ile hücreler 24 saat muamele edilmiştir.

3.2.4. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması

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

3.2.5 Boyanın Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8). Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HP}_4.12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içinde eritilmiştir.

3.2.6. 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.

3.2.7. Kolsişin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (Kolsişin) (Sigma) kullanılmıştır. Kolsişin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 μg olacak şekilde (0.06 $\mu\text{g/ml}$) 5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolsişin'in bazı özellikleri aşağıdadır:

Kapalı formülü	: C ₂₂ H ₂₅ N ₆ O ₆
Molekül ağırlığı	: 399.4
Etil asetat içeriği	: %3.4
Kloroform içeriği	: < %0.1
Sigma no	: C-975

3.2.8. Hipotonik Eriyik

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

3.2.9. Fiksatif

Preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif, 1 kısım glacial asetik asit' in 3 kısım metanol (1/3 : glacial 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.

3.2.10. Giemsa

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

3.3. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.3.1. Hassas Teraziler

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

3.3.2. Santrifüj

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

3.3.3. Mikroskop

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

3.3.4. 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.

3.3.5. 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)

3.3.6 Sarf Malzemeler

- 1.Heparin (Roche)
- 2.Giemsa (Merck, 5400512)
- 3.KH₂PO₄ (merck, 9021622)
- 4.Na₂HP0₄H₂0 (Merck, KI 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 paralar
- 17.Pastör pipeti
- 18.Lam
- 19.Lamel

3.4. Kromozom Anomallikleri (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları 23-24 olan kişiden alınan, heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına (5 ml) steril şartlarda 13-14 damla (0.4 ml) ekilmiştir. Hücre kültürü inkübatörde 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Capsaicin'in insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 ve 48 saat kala son konsantrasyonu kültür tüplerine ilave edilmiştir.

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 [27].

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan Kolsişin eriyiğinden 35 µl (0.06 µg Kolsişin/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C'de) Kolsişin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri, 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37 °C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmış olup hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Her tüpe 7 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konmuştur. Hücreler 30 dk. hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Hipotonik çözelti ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 2000 rpm'de (170 x g) 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0, 5 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra yayma yapılmıştır.

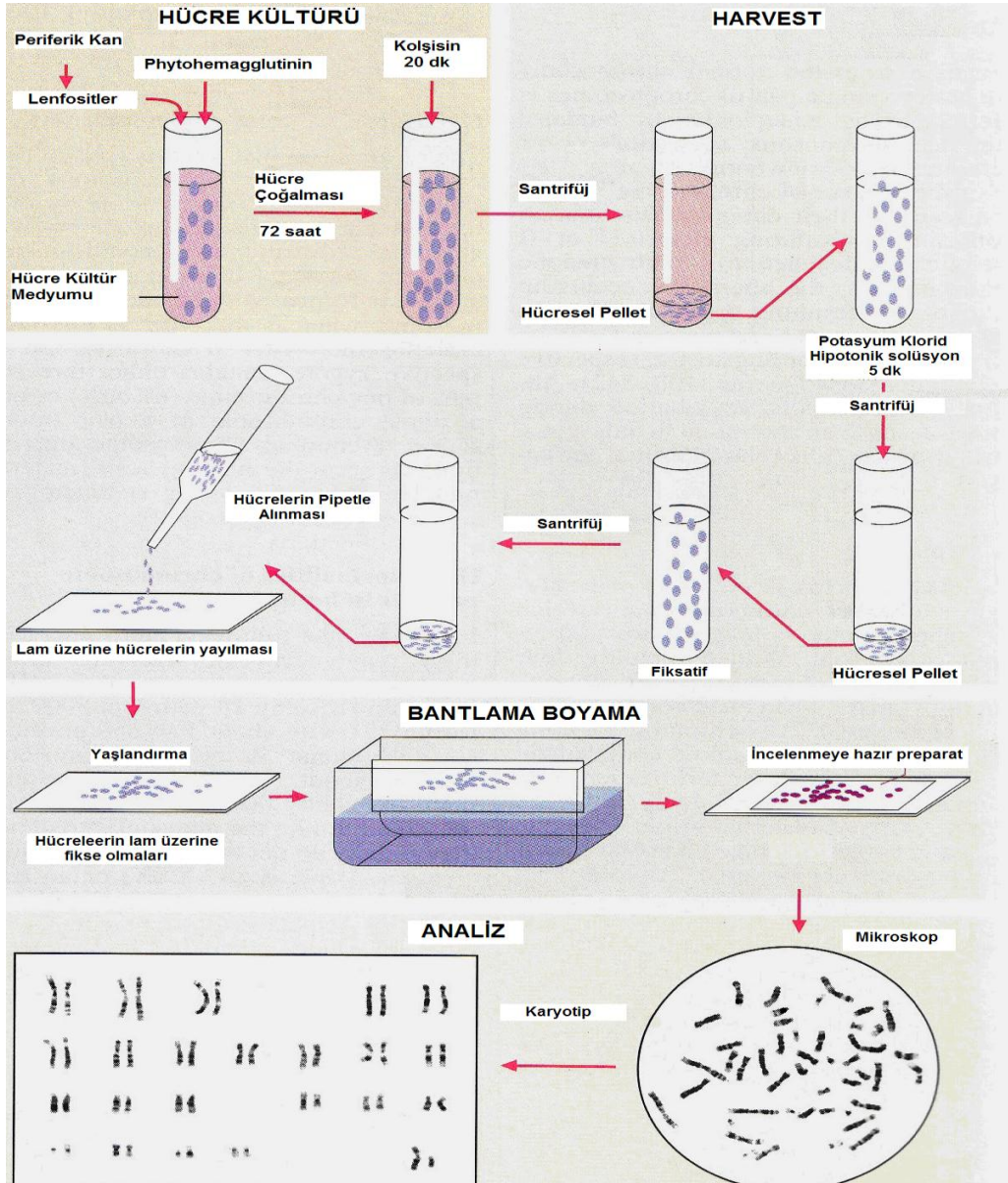
Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak

hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamlara farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.5. Mikroskopik inceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).



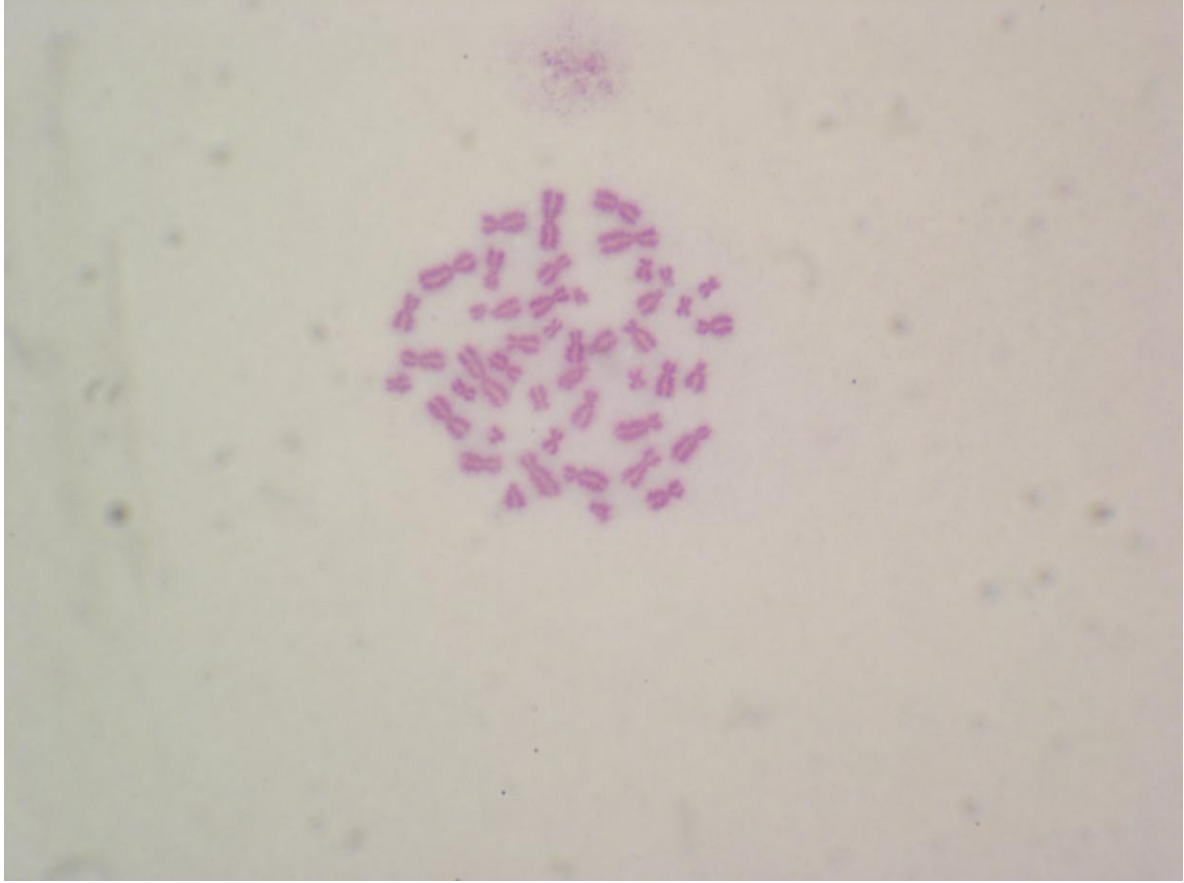
Şekil 6: Kromozom Analizinin Aşamaları (28).

3.5.1 Kromozom Anomalilerinin Saptanması

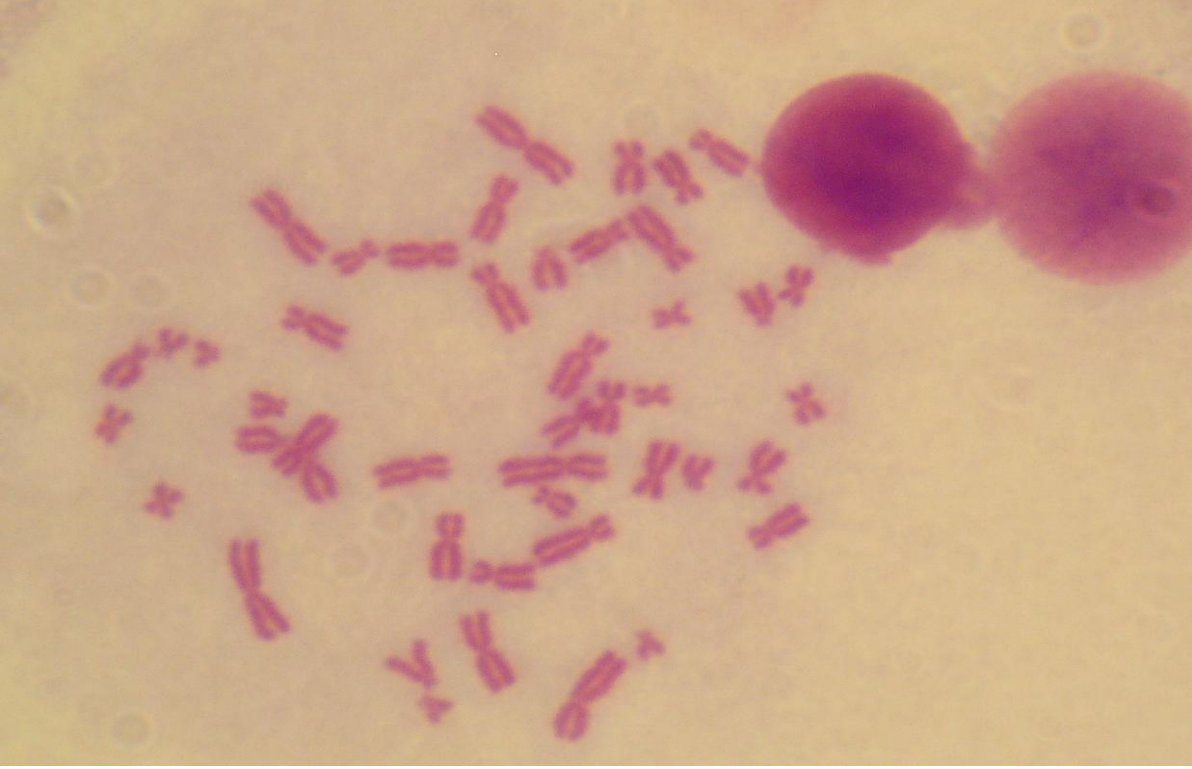
Muamele edilmiş ve kontrol kültürlerde her bir kişiden hazırlanan, iyi dağılmış kromozomlara sahip preparatlardan, her bir doz için, 400 metafaz incelenerek kırık ve diğer anomaliler sayılmıştır. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı anormallikleri kromozomlara göre ayrı ayrı kaydedilmiştir. İncelenen 100 hücre içerisinde kromozom kırığı bulunan anormal hücrelerin sayısı saptanmıştır.

4.BULGULAR

Sağlıklı ,sigara içmeyen ve alkol kullanmayan üniversite öğrencilerinden alınan heparize edilmiş kan örnekleri ile laboratuvarımızda kromozom analizi yapılmıştır. Normal bir bireye ait kromozomlar şekil 7’de görülmektedir.



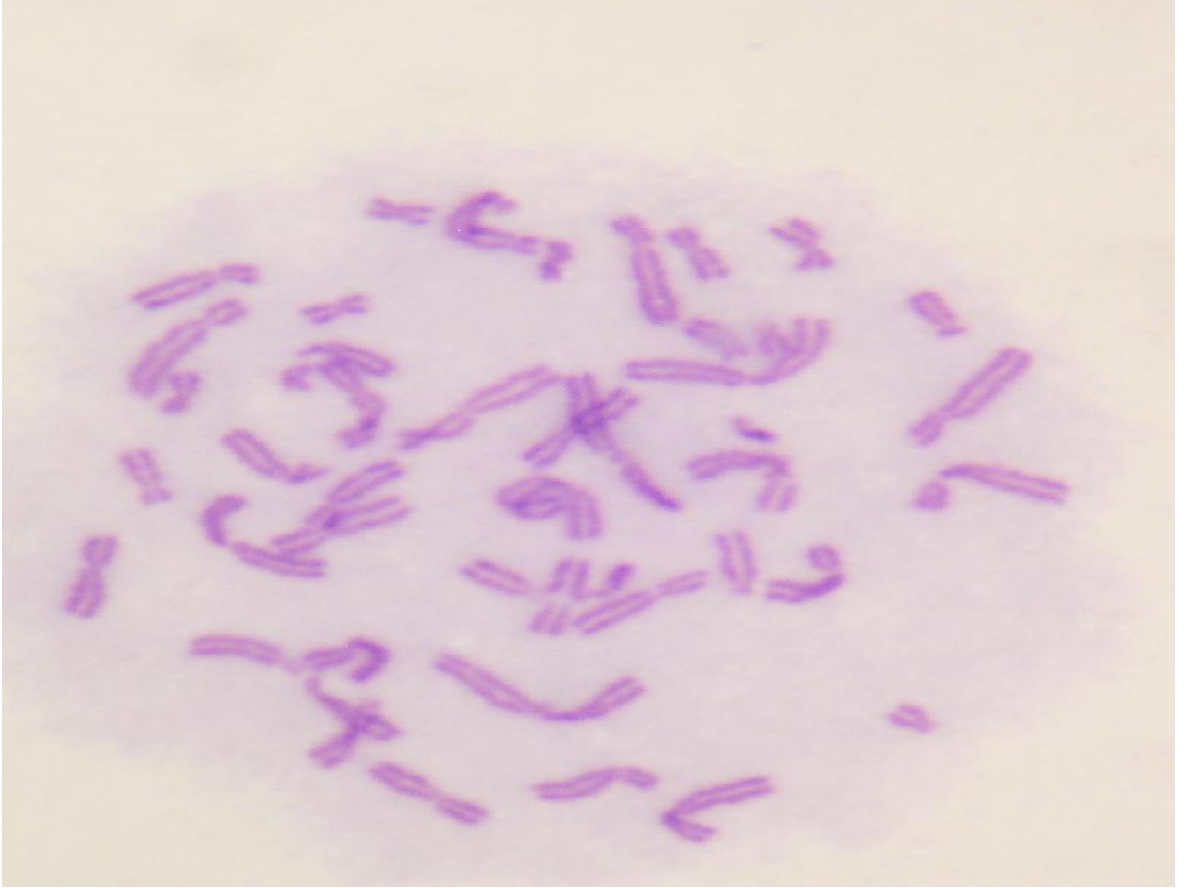
A



B

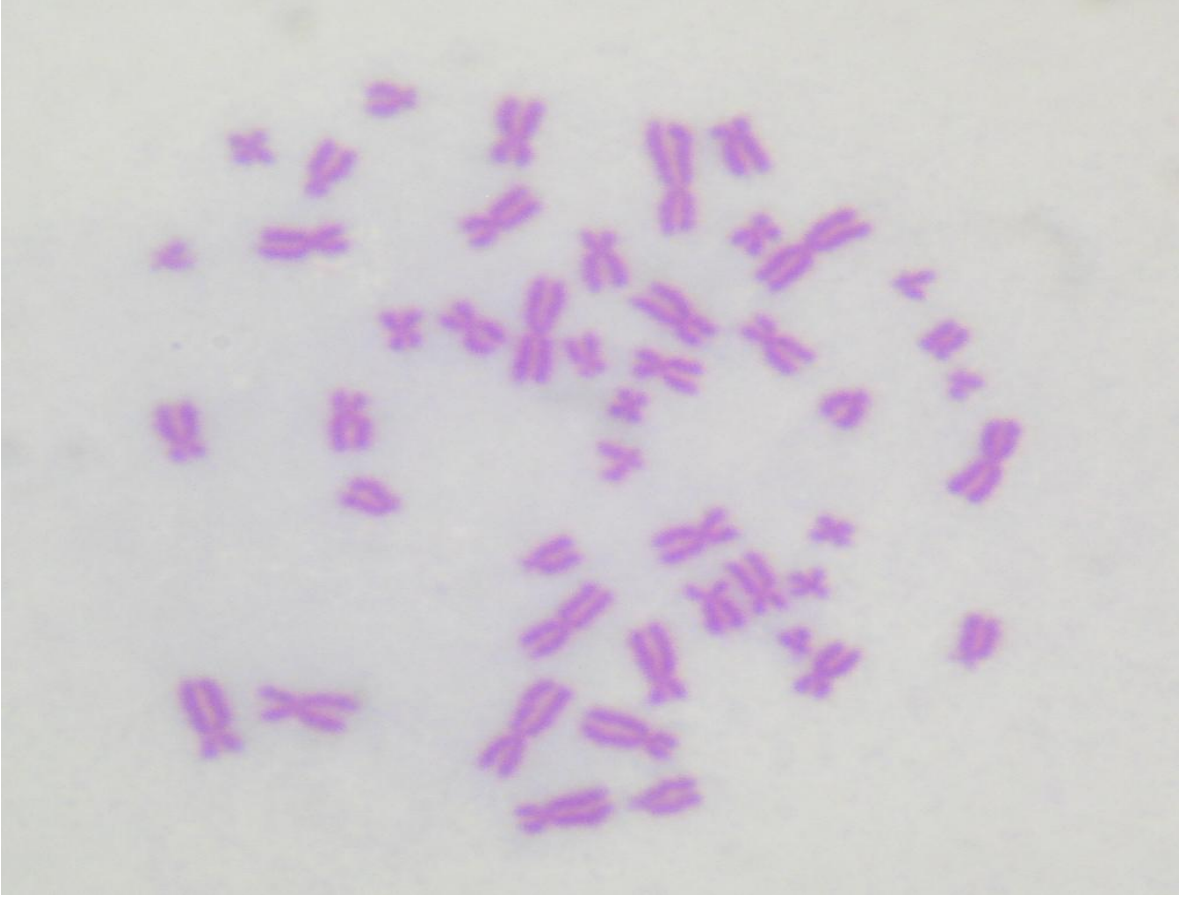
Şekil 7: A,B. Normal bir bayana ait kromozomlar.

Kromozomlar öncelikle pozitif kontrol olarak kullanılan Mitomisin-C ile etkileşime bırakılmıştır (0.3 µg/ml). Mitomycin-c'in kromozomlarda kromozom kırıkları, kromatid kırıkları, poliploidi kromatid birleşimi gibi hasarlara neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 8)



Şekil 8: Mitomisin-C'nin insan kromozomlarına etkisi.

Test kontrolü olarak DMSO ile muamele altında kalan kromozomlar da herhangi bir yapısal değişikliğin, kromozom kırıklarının, kromozom ve kromatit birleşmelerinin olmadığı görülmüştür. DMSO ile etkileşim altında kalan ve herhangi bir bozukluğunun olmadığı kromozomlar şekil 9’da görülmektedir.

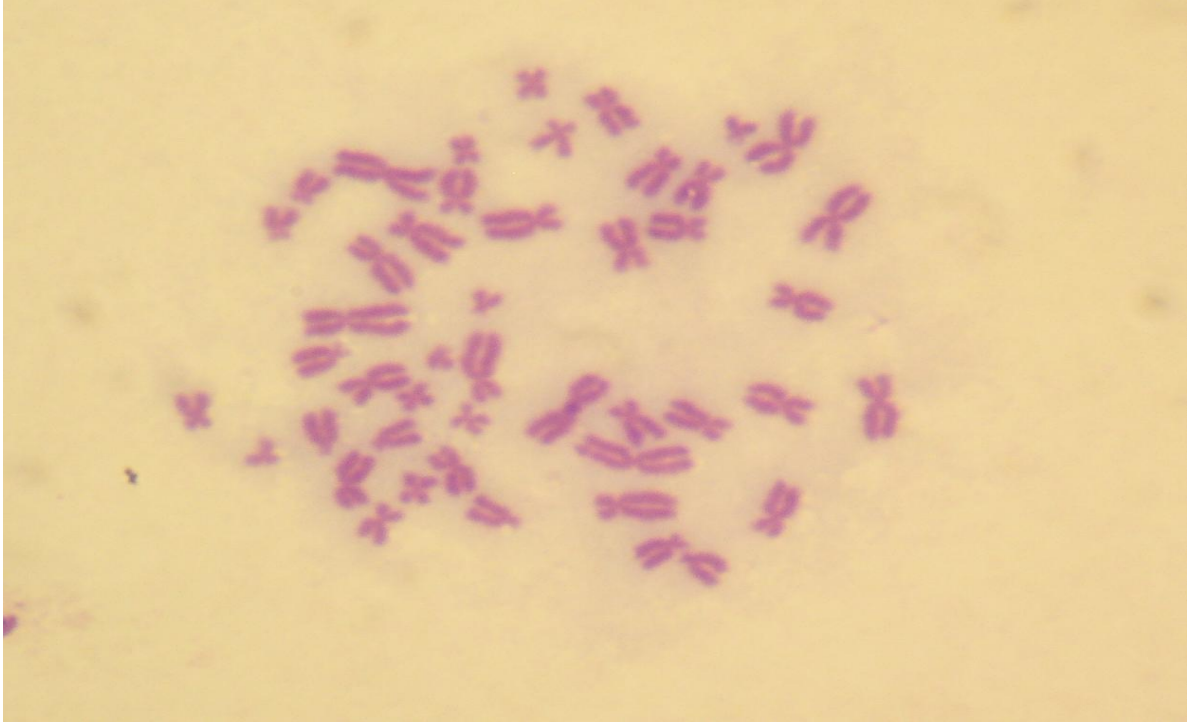


Şekil 9: DMSO ile etkileşim içinde kalan kromozomlar

4.1. Kapsaisin'in İnsan Kromozomlarına Etkisi

Kapsaisin önceden hazırlanmış 5ml'lik besiyeri tüplerine 80,120,160 μM 'lık dozlarda verilmiştir. Verilen dozların 24 ve 48 saatlik etkilerine bakılmıştır. 160 μM 'lık dozda üremenin durduğu ve metafaz sayısının çok az olduğu gözlemlenmiştir. 80 μM 'lık dozda 24 saatlik etkinin kromozomlarda kırıklara veya yapı bozukluklarına yol açmadığı, fakat 48 saatlik etkinin kromozom kırıklarına, kromozom birleşmesine (kromozom exchanges) yol açtığı görülmüştür. Buda etkileşim süresinin uzunluğuna bağlı olarak anomalileri arttırdığı gözlemlenmiştir. 120 μM 'lık dozun hem 24 hemde 48 saatlik etkisinde kromozomların bantlandığı ve pek çok kromozom kırığının olduğu görülmüştür. Burdan çıkarılan sonuç ise hem etkileşim süresinin hemde madde miktarının kromozomların yapısında bozukluklara neden olduğu anlaşılmaktadır.

80 μM 'lık dozun 24 saatlik etkisinin kromozomlarda herhangi bir yapı bozukluğuna yolaçmadığı ve kromozomların normal görüntüsünde olduğu şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10: 80 μM 'lık dozun 24 saatlik etkisinin kromozomlara zarar vermediği görülmektedir.

80 μM 'lık dozun 48 saatlik etkisinde kromozomlarda çok belirgin kırıkların olduğu ve kromozom birleşmelerinin (kromozom exchanges) olduğu şekil 11'de net olarak görülmektedir.



A



B

Şekil 11. A,B: 80 μM 'lık dozun 48 saatlik etkisinde meydana gelen kromozom kırıkları ve kromozom birleşmeleri.

120 μM 'lık dozun 24 saatlik etkisinde genelde kromozom birleşmeleri (kromozom exchanges) olduğu görülmüştür. Ayrıca belirgin olarak kromozom kırıklarında görülmüştür . (Şekil 12,13)

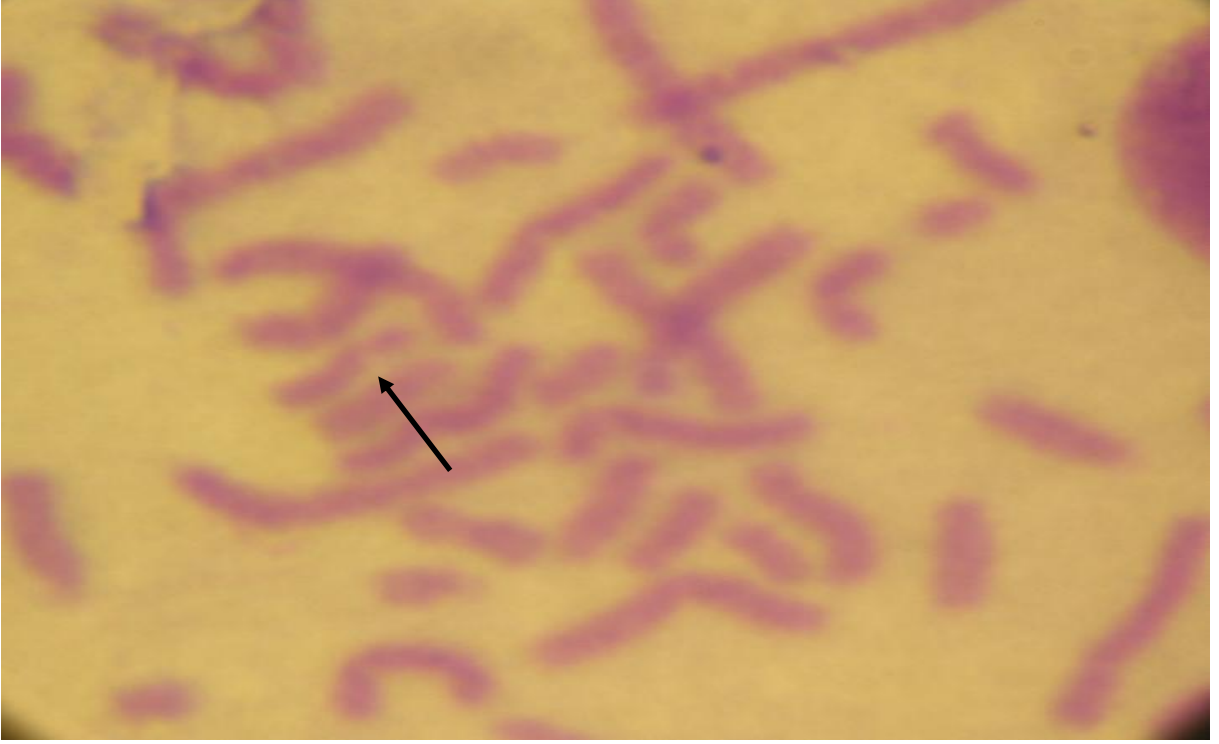


Şekil 12: 120 μM 'lık dozun 24 saatlik etkisinde meydana gelen kromozom birleşmesi.



Şekil 13:120 μM 'lık dozun 24 saatlik etkisinde meydana gelen kromozom kırığı.

120 μM 'lık dozun 48 saatlik etkisinde kromozom birleşmeleri kromozom kırıkları şekil 14 ve 15'de açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 14: 120 μM 'lık dozun 48 saatlik etkisinde meydana gelen kromozom kırıkları.



Şekil 15: 120 μM 'lık dozun 48 saatlik etkisinde meydana gelen kromozom birleşmeleri ve kromozom kırıkları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kars bölgesi, Türkiye'nin kuzey doğusunda yer almaktadır. Bölgede sanayi tesislerinin az oluşu gibi etkenler nedeniyle doğal flora büyük oranda bozulmamıştır. Bu nedenle söz konusu bölgenin bitki varlığı açısından oldukça zengin olduğu gözlenmektedir. Botanik alanında yapılan çalışmalar, bölgenin endemik bitki türü bakımından da oldukça zengin olduğunu göstermektedir. Bitki türleri sınıflandırıldığında 21 familyaya ait 73 adet Kars bölgesine endemik tür olduğu görülmektedir. Yapılmış çalışmalar incelendiğinde özellikle iki familyanın aktif madde içeriği yönünden zengin türleri kapsamakta olup bunlar *Asteraceae* and *Fabaceae* familyalarıdır. Bölgemizde bu iki familyaya ait 32 endemik tür bulunmaktadır. Benzer türlerle dünyanın değişik yerlerinde yapılan çalışmalarda, bu türlerin özellikle antimikrobiyal, antioksidan, antimitojenik, mitojenik ve antiparazitik özellikleri ile ön plana çıktıkları görülmektedir. Ancak, bitkilerin yetiştikleri coğrafya ve iklim şartlarına göre bio aktif özelliklerinin derecelerinde değişiklik olduğu bilinmektedir. Bunun yanısıra farklı bio aktif maddeler ihtiva ettikleri de sıklıkla gözlenmektedir. Ülkemizde bu türler ile ilgili çalışmalar yapılmamış olup, bu bitkilerin potansiyelleri ve elde edilebilecek ürünler hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bitki özütlerinin hücreler üzerine çok büyük etkiler yapabildiğini Kolsişin ve Fitohemaglutinin örneklerinden ayrıntılı olarak biliyoruz. İncelenmesi amaçlanan kırmızı biberin yapısında bulunan capsaicin'in 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 antimitojenik 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 ve antikarsinojenik, antiplazmoidal, antitoksijenik gibi ilginç aktiviteler gösterdikleri saptanmıştır. 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 [29-39].

Origanum majorana'nın antimutajenik potansiyeli *Vicia faba* kök meristematik hücrelerinde **Qari** [33] 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 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 saptamıştır. 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.

Kanserin tedavisi için geleneksel ilaç olarak kullanılan yedi *Plantago* türünün metanolik ekstraktlarını üç insan kanser hücresine karşı sitotoksik etkilerini **Gálvez ve arkadaşları** [35] 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.

Velasco-Lezama ve arkadaşları [36] yaptıkları çalışmada, *Plantago major*'un havalı parçalarından (yaprak ve tohumlar) su, metanol, kloroform ve hekzan ekstraktları kemik iliği CD1 ve dalak, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Candida albicans* kültür ortamları içine ve metanol ekstraktlarında HTC-15, OVCAR, UISO ve KB kültür ortamları içine eklenmiştir. Sulu ekstrakt *B.subtilis*, hekzan ekstraktı *E.coli*'nin üremesini inhibe etmiştir. Metanol ve kloroform ekstraktları *B.subtilis* ve *E.coli* gelişimlerini zayıf oranda inhibe etmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre ilk kez *Plantago major*'un in vitro olarak önemli hematopoietik aktivitesi olduğunu göstermiştir.

Marques S., ve arkadaşları Kapsaisin'in mikronükleus ve kardeş kromatid değişimi üzerine yaptığı etkiyi araştırmışlar ve Kapsaisin'in mikronükleus ve kardeş kromatid değişimi oranını belirgin bir şekilde artırdığını saptamışlardır [40].

Chanda S., ve arkadaşları trans kapsaisin'in mutajenik etkilerini araştırmışlar ve zayıf bir mutajenik aktivite bulduklarını rapor etmişlerdir [41].

Sonuç olarak, bütün deneme grupları, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 24-48 saat sonunda kapsaisin konsantrasyonuna ilaveten kromozom aberasyon sıklığında önemli derecede bir artış göstermiştir. Ayrıca Mitomisin-C denemesi aberant hücrelerin sıklığında artışa neden olmuştur. Kromozom ve kromotid kırıkları, kardeş kromotid birleşimi ve kromotid değişimi bütün konsantrasyon denemelerinde gözlemlenmiştir. Çalışmamız sonucunda, kullandığımız Kapsaisin'in 80 μ M dozun 48 saatlik etkisinde ve 120 μ M dozun hem 24 hemde 48 saatlik etkisinde kromozomlarda ve kromatitlerde kırıklara neden olurken, 160 μ M de hücre bölünme indeksini düşürdüğü gözlemlenmiştir.çalışmamız İn-vitro bir çalışma olduğundan kapsaisin içeren besinlerin tüketilmesinde herangi bir zararın olup olmadığı bilinmemektedir. Bunun anlaşılması için daha kapsamlı in-vivo çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Kayacıoğlu, A., Öner, C., Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimutajenik Etkilerinin Amest-Salmonella Test Sistemi ile Araştırılması. Tr. Botany, 18; s.117-122 (1994).
2. Başer, K.H.C. The Turkish *Origanum Species*, In; Oregano, The Genera *Origanum* and *Lippia*, Ed. S.E. Kintzios, Taylor and Francis, UK (2002).
3. www.odevforum.com (2010).
4. <http://www.havuzsauna.com/kromozom> (2010).
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. Steinegger, E., Haensel, R., Lehrbuch der Pharmakognosie-Auf Phytochemischer Grundlage, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin. s. 533 (1972).

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. Schorm.ller, Alkaloidhaltige Genusmittel, Gew.rze, 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 Nutritiomm, Especially Phosporus Nutrition. Bulletin of the Faculty of Agriculture. Hİrosaki Üniversitesi, 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. www.wikipedial.org/wiki/kromozom (2010).
20. Surrales, J. , Autio, K., Nylund, L., Jarventaus, H., Norppa, H., Veidebaum, T., Sorsa, M., Peltonen, K. Moleculer Cytogenetic Analysis of Buccal Cells and Lymphocytes from Benzene-exposed Workers. Carcinogenesis, 18: 817-823 (1997).
21. Connor, J. M., Ferguson-Smith, M.A. Essential Medical Genetics. Blackwell Scientific Puplikation (1993).
22. Soffritti M, Belpoggi F, Lenzi A, Maltoni C. Results of long term carcinogenicity studies of chlorine in rats. Ann. NY Acad. Sci. 1997; 26: 189–208.
23. Soffritti M, Belpoggi F, Lenzi A, Maltoni C., Results of long term carcinogenicity studies of chlorine in rats. Ann. NY Acad. Sci, 26: 189–208 (1997).
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. Passarge, E. Color Atlas of Genetics. Georg Thieme Verlag KG Rüdigerstraße 14, D-70469 Stuttgart, Germany. P. 195 (2007).
29. 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).
30. Aydin S., Öztürk Y., Beis R. and Baser K.H.C. Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. *Phytother. Res.*10: 342–344 (1996).
31. Azcan N., Kara M., Asilbekova D.T., Özek T. and Baser K.H.C. Lipids and essential oil of *Origanum onites* L. *Khim. Prir. Soedin.* 2: 106–109. Didry N., Dubreuil L. and Pinkas M. (1994) Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta Helv.* 69(1): 25–28 (2000).
32. Zeytinoglu M., Aydin S., Öztürk Y. and Baser K.H.C. Inhibitory effects of carvacrol on DMBA induced pulmonary tumorigenesis in rats. *Acta Pharm. Turcica.* 40(2): 93–98 (1998).
33. Sameer H. Qari “*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. N. Mezzoug, A. Elhadri, A. Dallouh, S. Amkiss, N.S. Skali, J. Abrini, A. Zhiri, D. Baudoux, B. Diallo, M. El Jaziri, M. Idaomar” Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents *Mutation Research* 629 100–110 (2007).
35. 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).

- 36.** 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).
- 37.** Myrna Déciga-Campos, Isabel Rivero-Cruz, Myriam Arriaga-Alba, Gabriela Castañeda-Corral, Guadalupe E. Angeles-López, Andrés Navarrete, Rachel Matab "Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine" *Journal of Ethnopharmacology* 110 334–342 (2007).
- 38.** Aruna, K., and V. M. Sivaramakrishnan. Anticarcinogenic effects of some indian plant-products. *Food and Chemical Toxicology* 30 953-956 (1992).
- 39.** Beetstra, S., Thomas, P., Salisbury, C., Turner, J., Fenech, M. Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei. *Mutation Research* 578 317–326 (2005).
- 40.** Marques S, Oliveira NG, Chaveca T, Rueff J. Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 517 (1-2): 39-46, (2002)
- 41.** Chanda S, Erexson G, Riach C, Innes D, Stevenson F, Murli H, Bley K. Genotoxicity studies with pure trans-capsaicin. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557(1):85-97, (2004).

7. ÖZGEÇMİŞ

Mesut TAŞKIRAN; 1985 yılında Ağrı'nın Eleşkirt ilçesinde doğdu. İlk ve ortaokulu İbrahim Çeçen İlköğretim okulunda tamamladı.1999 yılında Ağrı Anadolu Lisesini kazandı. 2003 yılında bu liseden mezun oldu. 2004 yılında Kars Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girmeye hak kazandı. 2008 yılında mezun oldu ve aynı sene Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. Halen Yüksek Lisansına devam etmektedir.