

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

Yüksek Lisans Tezi

**İNSAN PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİNDE
HYPERICUM HETEROPHYLLUM VENT. TÜRÜNÜN
MİKRONÜKLEUS, MİTOTİK İNDEKS VE
REPLİKASYON İNDEKSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Afide ÖCAL

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Halil Erhan EROĞLU

Yozgat 2012

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

Yüksek Lisans Tezi

**İNSAN PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİNDE
HYPERICUM HETEROPHYLLUM VENT. TÜRÜNÜN
MİKRONÜKLEUS, MİTOTİK İNDEKS VE
REPLİKASYON İNDEKSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Afide ÖCAL

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Halil Erhan EROĞLU

**Bu çalışma, Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından I.F.E-2011/49 kodu ile desteklenmiştir.**

Yozgat 2012

T.C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAYI

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı 7011030011 numaralı öğrencisi Afide ÖCAL'ın hazırladığı “İnsan periferik kan lenfositlerinde *Hypericum heterophyllum* Vent. türünün mikronükleus, mitotik indeks ve replikasyon indeksi üzerine etkileri” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezi ile ilgili TEZ SAVUNMA SINAVI, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca 09/05/2012 Çarşamba günü saat 13:00'te yapılmış, tezin onayına OY ÇOKLUĞU / OY BİRLİĞİYLE karar verilmiştir.

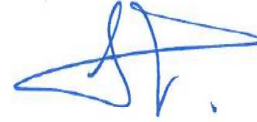
Başkan : Doç. Dr. Dilek PANDIR



Üye : Yrd. Doç. Dr. Halil Erhan EROĞLU (Danışman)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Fahriye ERCAN



ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 23/5/2012 tarih ve 5... sayılı kararı ile onaylanmıştır.



23/5/2012

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Hidayet ÇETİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Hypericum</i> L.	3
2.1.1. <i>Hypericum</i> Cinsinin Kullanım Alanları ve Amaçları.....	3
2.1.2. <i>Hypericum</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	5
2.2. <i>Hypericum heterophyllum</i> Vent.	5
2.2.1. <i>Hypericum heterophyllum</i> Türünün Genel Özellikleri.....	5
2.2.2. <i>Hypericum heterophyllum</i> Türünün Taksonomik Durumu.....	5
2.2.3. <i>Hypericum heterophyllum</i> Türü ile Yapılan Çalışmalar.....	5
2.3. Toksikoloji	6
2.3.1. Toksikolojinin Tarihçesi.....	7
2.3.2. Toksisite.....	8
2.3.3. Toksikolojinin Bölümleri.....	9

2.3.4. Toksik Etki Mekanizmaları.....	10
2.4. Genotoksisite.....	11
2.4.1. Genotoksik Etmenler	12
2.4.2. Genetik Toksisite Testlerinin Kullanım Alanları	13
2.4.3. Genetik Toksisite Testleri	14
2.4.3.1. Comet Testi.....	14
2.4.3.2. Ames Testi.....	15
2.4.3.3. Kromozom Anormallikleri (KA) Testi	15
2.4.3.4. Gen (Nokta) Mutasyonları	16
2.4.3.5. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE).....	16
2.4.3.6. Mitotik İndeks (MI).....	16
2.4.3.7. Replikasyon İndeksi (RI).....	17
2.4.3.8. Mikronükleus (MN).....	17
2.4.3.8.1. Mikronükleus (MN) Testi.....	18
2.4.3.8.2. Mikronükleus (MN) Tekniğinin Gelişimi.....	20
2.4.3.8.3. Mikronükleus (MN) Oluşumu.....	21
2.4.3.8.4. Mikronükleusun Yapısı.....	22
2.4.3.8.5. Mikronükleus Testinin Avantajları.....	23
2.4.3.8.6. Mikronükleus Testinin Kullanım Alanları.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	25
3.1. Gereçler.....	25
3.1.1. Demirbaş Malzemeler	25
3.1.2. Sarf Malzemeler.....	25
3.2. Çalışmada Kullanılan Madde ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	26

3.2.1. Kùltür Medyumunun İçeriği.....	26
3.2.2. Hipotonik Solüsyonunun Hazırlanması	26
3.2.3. İbrainov Solüsyonunun Hazırlanması	27
3.2.4. Fiksatifin Hazırlanması	27
3.2.5. Gurr Tamponunun Hazırlanması	27
3.2.6. %5'lik Giemsa Boyasının Hazırlanması	27
3.3. <i>Hypericum heterophyllum</i> Ekstraktlarının Eldesi	27
3.4. Periferel Kanların Alınması	27
3.5. Periferel Kan Kùltürü	28
3.5.1. Kùltürün Sonlandırılması (Çıkarım).....	28
3.5.2. Preparat Hazırlanması ve Boyanması	29
3.5.3. Mikroskop Değerlendirmesi ve Hesaplama	29
3.5.3.1. Mitotik İndeks Sayımı ve Hesaplanması	29
3.5.3.2. Replikasyon İndeksi Sayımı ve Hesaplanması.....	29
3.5.3.3. Mikronùkleus Sayımı ve Değerlendirmesi.....	30
3.6. Fotoğraflama	30
3.7. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
5.TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	61

**İNSAN PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİNDE *HYPERICUM
HETEROPHYLLUM* VENT. TÜRÜNÜN MİKRONÜKLEUS, MİTOTİK
İNDEKS VE REPLİKASYON İNDEKSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Afide ÖCAL

**Bozok Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

2012; Sayfa: 61

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Halil Erhan EROĞLU

ÖZET

Hypericum türleri binlerce yıldır Türkiye’de geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Hypericum heterophyllum*’un genotoksik etkilerini belirlemek için su ekstraktları ile insan lenfositleri inkübe edildi. Artan ekstrakt konsantrasyonları mikronükleus oranını indükledi. Mikronükleus oranındaki artış, yüksek konsantrasyonlarda *Hypericum heterophyllum* türünün karsinojenik ve genotoksik olabileceğini göstermiştir. Mitotik indeks ve replikasyon indeksi değerleri de *Hypericum heterophyllum*’un artan ekstrakt konsantrasyonları ile yükselmiştir. Bu sonuçlar *Hypericum heterophyllum* türünün proliferatif özellikler ve proliferatif etkiler kadar sitotoksik özellikler ve sitotoksik etkiler gösterebileceğini işaret etmektedir. Mikronükleus ile yaş arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Ayrıca bayanların ve erkeklerin mikronükleus oranları arasında da pozitif korelasyon gözlenmiştir. Yaş ile mitotik indeks ve replikasyon indeksi değerleri arasında ise negatif korelasyon gözlenmiştir. Mikronükleus, mitotik indeks ve replikasyon indeksi üzerine bu türden izole edilen ana bioaktif bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: *Hypericum heterophyllum*, Genotoksik, Mitotik İndeks, Replikasyon İndeksi, Mikronükleus

**THE EFFECTS OF *HYPERICUM HETEROPHYLLUM* VENT. ON
MICRONUCLEUS, MITOTIC INDEX AND REPLICATION INDEX IN
PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES**

Afide ÖCAL

**Bozok University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master of Science Thesis**

2012; Page: 61

Thesis Supervisor: Assit. Prof. Halil Erhan EROĞLU

ABSTRACT

Hypericum species have been used in traditional medicine in Turkey for thousands of years. In this study, in order to determine the genotoxic effect of *Hypericum heterophyllum*, human lymphocytes was incubated with the aqueous extracts. The increasing extract concentrations of *Hypericum heterophyllum* induced micronucleus rate. The rise of micronucleus shows that *Hypericum heterophyllum* at high concentrations may become carcinogenic and genotoxic. Mitotic index frequencies and replication index values increased with increasing extract concentrations of *Hypericum heterophyllum* too. The results indicate the cytotoxic effects as well as proliferative effects and suggest that the extracts of the compounds exhibit cytotoxic properties as well as mitotic and proliferative properties. The positive correlation was observed between micronucleus and age. Also, the positive correlation was observed between micronucleus rates of female and male. The negative correlations were observed between mitotic index and age, replication index and age. Further studies will be needed to determine the effects of the main bioactive components isolated from this species on micronucleus, mitotic index and replication index.

Keywords: *Hypericum heterophyllum*, Genotoxic, Mitotic Index, Replication Index, Micronucleus

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde, beni yönlendiren, fikir ve bilgisini paylaşan, zamanını vererek tezin oluşumunda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Halil Erhan EROĞLU' na, çalışmam sırasında bölümümüzdeki imkanlardan yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı değerli hocam Doç. Dr. Dilek PANDIR' a teőekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman sorgu sualsiz yanımda olan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Suna ÖCAL' a, sevgili babam Halil ÖCAL' a, sevgili kardeşlerime özellikle de bana güç ve moral veren sevgili kardeşim Amine ÖCAL' a sonsuz sevgilerimi ve teőekkürlerimi sunarım.

Bu alışma Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen "İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde *Hypericum heterophyllum* Vent. Türünün Mikronükleus, Mitotik İndeks ve Replikasyon İndeksi zerine Etkileri" başlıklı I.F.E-2011/49 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Desteklerinden dolayı Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu yetkililerine teşekkür ederim.

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1: <i>Hypericum heterophyllum</i> Ekstraktlarının Mitotik İndeks Değerleri	34
Tablo 4.2: <i>Hypericum heterophyllum</i> Ekstraktlarının Replikasyon İndeksi Değerleri..	36
Tablo 4.3: <i>Hypericum heterophyllum</i> Ekstraktlarının Mikronükleus Değerleri.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1: Mitotik İndeks Değerlendirmesinde Kullanılan Metafaz Alanı.....	31
Şekil 4.2: Mononükleat Lenfosit Hücrelerinin Genel Görünümü.....	32
Şekil 4.3: Binükleat Lenfosit Hücrelerinin Genel Görünümü.....	32
Şekil 4.4: Trinükleat Lenfosit Hücrelerinin Genel Görünümü.....	33
Şekil 4.5: Lenfosit Hücreleri Yanında Görülen Bir Mikronükleus.....	33
Şekil 4.6: Artan <i>Hypericum heterophyllum</i> ekstrakt konsantrasyonları ve genel MI ortalamaları arasındaki pozitif korelasyon.....	35
Şekil 4.7: Artan <i>Hypericum heterophyllum</i> ekstrakt konsantrasyonları ve deneklerin MI değerleri arasındaki pozitif korelasyon.....	35
Şekil 4.8: Artan <i>Hypericum heterophyllum</i> ekstrakt konsantrasyonları ve genel RI ortalamaları arasındaki pozitif korelasyon.....	37
Şekil 4.9: Artan <i>Hypericum heterophyllum</i> ekstrakt konsantrasyonları ve deneklerin RI değerleri arasındaki pozitif korelasyon.....	37
Şekil 4.10: Artan <i>Hypericum heterophyllum</i> ekstrakt konsantrasyonları ve genel MN ortalamaları arasındaki pozitif korelasyon.....	39
Şekil 4.11: Artan <i>Hypericum heterophyllum</i> ekstrakt konsantrasyonları ve deneklerin MN değerleri arasındaki pozitif korelasyon.....	39
Şekil 4.12: MI ve MN değerleri arasındaki pozitif korelasyon.....	40
Şekil 4.13: RI ve MI değerleri arasındaki pozitif korelasyon.....	41
Şekil 4.14: RI ve MN değerleri arasındaki pozitif korelasyon.....	41
Şekil 4.15: MN değerleri ve yaş arasındaki pozitif korelasyon.....	42
Şekil 4.16: MI değerleri ve yaş arasındaki negatif korelasyon.....	43

Şekil 4.17: RI değerleri ve yaş arasındaki negatif korelasyon.....	43
Şekil 4.18: MN değerleri bakımından bayanlar ve erkekler arasındaki pozitif korelasyon.....	44
Şekil 4.19: MI değerleri bakımından bayanlar ve erkekler arasındaki pozitif korelasyon.....	45
Şekil 4.20: RI değerleri bakımından bayanlar ve erkekler arasındaki negatif korelasyon.....	45

KISALTMALAR VE SİMGELER

ANOVA	: Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi
ATP	: Adenozintrifosfat
C	: Sitozin
CA	: Kromozom Anomalileri (Chromosomal Aberration)
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
CVS	: Trofoblast
Cyt-B	: Sitokalazin-B
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
E	: Doğu
EBV	: Epstein-Barr Virüsü
FCS	: Sığır Fetüsü Serum (Fetal Calf Serum)
FISH	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
g	: Gram
G	: Guanin
<i>H.</i>	: <i>Heterophyllum</i>
KCl	: Potasyum Klorür
km	: Kilometre
m	: Metre
M	: Molar
MAK	: Uzun süre maruz kalmada zararsız olabilecek en yüksek doz
mg	: Miligram
M1	: Mononükleat Hücreler
M2	: Binükleat Hücreler
M3	: Trinükleat ve Polinükleat Hücreler
M.Ö.	: Milattan Önce
M.S.	: Milattan Sonra
MI	: Mitotik İndeks
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MN	: Mikronükleus

N	: Kuzey
NaCl	: Sodyum Klorür
PHA	: Phytohemaglutinin
RI	: Replikasyon İndeksi
rpm	: Devir / Dakika
SCE	: Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange)
SS	: Standart Sapma
subsp.	: Alttür
TC	: Hücre Siklusunun Toplam Süresi
TLV	: Eşit limit değeri
TM	: Mitoz Fazının Süresi
UV	: Ultraviyole
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma
%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
n	: Haploit
2n	: Diploit
°	: Derece
μ L	: Mikrolitre
<	: Küçük
>	: Büyük

1. GİRİŞ

Bitkilerin yalnızca besin maddesi olarak değil, pek çok hastalığın tedavisinde kullanılması insanlık tarihi kadar eskidir. Bitkiler içerdikleri maddelerle insan ve hayvan sağlığı yönünden önem taşırlar [1]. Dünya nüfusunun artması ve endüstrinin gelişmesi sonucu doğal kaynaklı bitkilerden elde edilen etken maddelerin kullanılabilirliğinin artması sonucunda bu ürünlere olan talepte çok hızlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir [2].

Tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de yıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Tıbbi bitkilerin yaygın olarak kullanılmaya başlanmasının bazı önemli nedenleri şunlardır:

- 1- Yeterli düzeyde bir kimya endüstrisine sahip olmayan kalkınmakta olan ülkelerde, bitkilerden yararlanarak kolay ve ucuz bir tedavi olanağı sağlanmaktadır. Bu açıdan Mısır, Hindistan ve Pakistan gibi ülkeler büyük gayretler sarf etmekte ve olumlu sonuçlar almaktadırlar.
- 2- Tedavi alanına sokulan yeni sentetik maddelerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkiler.
- 3- Bazı bitkisel ilaç ham maddelerinin, sentetik olanlardan daha ucuza ve daha basit elde edilebilme olanakları. Steroid bileşikler, kına kına alkaloidleri, afyon alkaloidleri, atropa alkaloidleri, digitalis glikozitleri bu yöndeki uygulamalara örnek verilebilir.
- 4- Bitkisel ilaçların diğer bir üstün yanı da etki alanlarının daha geniş olmasıdır. Sentetik bileşikler genellikle bir tek etkiye sahiptirler ve bunların bazılarının yan etkilerini önlemek için diğer bazı ilaçlara ihtiyaç duyulur [3].

Bitkisel droglarda, etkili saf bileşiklere oranla, efektif doz ile letal doz arasındaki mesafe oldukça geniştir. Bu nedenle, bitkisel droglar ile zehirlenerek ölüm ihtimali saf etkili maddelere oranla daha azdır. Bu da halk arasında, etkili madde yerine bitkisel drogların kullanılmasının tercih edilmesine neden olmaktadır.

Bünyelerinde çok değişik yapıda kimyasal maddelerin bulunduğu bitkisel droğların insan sağlığı açısından oluşturabileceği risklerin araştırılması gerekmektedir. Bu konuda yapılan çalışmaların önemli bir bölümünü de bitkisel droğların mutajenik ve genotoksik aktivitelerinin araştırılması teşkil etmektedir [4,5].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Hypericum* L.

Hypericum cinsinin kullanım alanları ve amaçları ile genel özellikleri şöyledir.

2.1.1. *Hypericum* Cinsinin Kullanım Alanları ve Amaçları

Geçmişten günümüze bitkiler ilaçların bileşiminde kullanılmış, insan sağlığı açısından birçok olumlu sonuçları ortaya çıkmıştır. Bitkilerin ilaç yapımında oynadığı iki rol vardır;

- 1) İlaç yapımının temelinde yer alabilirler, yani doğal olarak üretimde kullanılırlar,
- 2) Bitkisel bir ilaç olarak tedavide kullanılırlar [6].

Tıbbi açıdan önem kazanan bu bitkilerden en önemlilerinden biride *Hypericum* cinsidir. Çok eski zamanlardan beri yaygın olarak tedavide kullanılan *Hypericum* cinsinin adı Yunanca'da 'hayalet, kötü ruh defeden' anlamındadır. Bu bitkinin şeytani ve kötü düşünceleri kovduğu ve koruyucu gücünün bulunduğu inanılırdı. Ayrıca *Hypericum*, Hıristiyan azizlerinden biri olan St. John'la ilişkilendirilmiştir. *Hypericum*'un çiçeklenmeye başladığı 21-24 Haziran döneminde St. John'un doğduğuna *Hypericum*'un yapraklarında kırmızı beneklerin belirginleştiği Ağustos döneminde ise St. Jhon'nun öldürüldüğüne ve bu nedenle de bitkinin kanadığına inanılırdı. St. John's Wort olarak adlandırılan bu bitki St. John günü adı verilen özel günlerde toplanır [7].

Tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye'de de yıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır [3]. Türkiye yüzyıllar boyunca çeşitli medeniyetlerin gelip yerleşmesinden dolayı zengin bir kültüre, flora ve kendine özgü bir halk tıbbına sahip olmuştur. Akdeniz, İran-Turan, Avrupa-Sibirya gibi üç farklı fitocoğrafik alanın içerisinde zengin bir bitki florasını kapsamaktadır [8].

Hypericum cinsinin birçok türü ülkemizde bazı bakteriyal hastalıklarının, mide ve bağırsak iltihaplarının tedavisinde halk ilacı olarak kullanılır [9]. Geleneksel tedavide; yapraklı, çiçekli ve meyveli dalları ile kökleri kullanılmaktadır [10,11].

Hypericum cinsine dahil taksonlar yara iyileştirici [12], bakterisit [13], idrar söktürücü [14], iltihap giderici ve yatıştırıcı [15] etkilerinden dolayı yüzyıllardan beri tedavi maksatlı olarak kullanılmaktadırlar. Son yıllarda, farklı biyolojik özelliklere sahip birçok sekonder metabolit içeren *Hypericum* cinsi bilimsel dikkatleri üzerine çekmektedir [16]. Dünyanın ılıman bölgelerinde doğal yayılış gösteren 400 kadar *Hypericum* türü vardır. Ülkemiz *Hypericum* türleri bakımından önemli bir merkezdir ve mevcut 89 türün 43'ü endemiktir [17]. *Hypericum* cinsi ülkemizde kantaron, kantarum, koyun kıran ve bin bir delik otu adlarıyla bilinir [3].

Tıbbi özelliği olan *Hypericum* depresyona bağlı sinir sistemi bozukluklarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. *Hypericum* türlerinden elde edilen hiperisin, depresyon septomlarını ortadan kaldırdığı, anlama ve algılama gücünü artırdığı, yorgunluk, donukluk ve uyku halini giderdiği bildirilmiştir [18-20]. Anti-depressan özelliği ile önemli bir etkiye sahip olan bu bileşiğin hiçbir yan etkisi saptanmamıştır [21-23].

Günümüzde yaygın olarak gastrit, ülser gibi mide rahatsızlıklarında, iştah açıcı olarak, sarılıkta, dıştan yaralarda iltihap kurutucu olarak, ayak mantarında, diş eti iltihabında, balgam söktürücü olarak, sünizitte, barsak iltihabında, basurda, ateşli hastalıklarda ateş düşürücü ve kan yapıcı olarak dahilen basura ve kabızlığa karşı kullanılmaktadır [3].

Hypericum türlerinden antifungal [24], antibakteriyal [25], antiviral [26] ve antikanser [27] özellikler gösteren hiperisin ve bunun türevleri ile flavonoid, floroglusinol ve ksanton gibi bileşikler izole edilmiştir. Ksantonlar antiinflammatör, antihepatotoksik, antiviral, antimikrobiyal ve antitümöral gibi birkaç önemli farmakolojik özellik göstermektedir [28,29]. Floroglusinol ve filisinik asit türevleri antibakteriyal, antifungal ve sitotoksik aktiviteler göstermektedir [27,30].

2.1.2. *Hypericum* Cinsinin Genel Özellikleri

Hypericum bitkisi genellikle kuru, kalkerli veya eski kalker taşlı topraklarda, ışıklı ormanlarda, çayırlarda, bataklık ve sahillerde, kayalık yerlerde, yol kenarlarında, ekim yapılmayan tarlalarda ve 2000-2400 m yüksekliklerde yayılış göstermektedir. Dünyada; Avrupa, Kuzey Afrika, Sibiryaya, Asya, İran, Kuzey Irak, Kıbrıs ve Batı Suriye’de de adı geçen bitki doğal olarak yetişmektedir. Türkiye’de ise hemen her bölgede yayılış göstermelerine rağmen genelde İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde daha çok yayılış gösterir [31,32].

Çok yıllık otsu bitkiler sınıfından olan bu cinse ait taksonların yaprakları basit veya tam kenarlı çoğunlukla şeffaf noktalıdır. Çiçekler ersellik olup 5 çanak ve 5 taç yapraktan oluşur ve genellikle sarı renklidir ve üzerinde siyah noktalar içerir. Stamenler 5’li demetler halinde taç yaprakların karşısında yer alır, her birinde 3 ile 125 arası stamen vardır, ender olarak steril demetlere değişirler. Ovaryum, her birinde 2 veya daha çok tohum taslağı 3-5 adet serbest veya ince bitişiktir. Meyve, kapsül tipinde olup septisid olarak açılır [33].

2.2. *Hypericum heterophyllum* Vent.

H. heterophyllum’un genel özellikleri, taksonomik durumu ve bu türle yapılan çalışmalar şöyledir.

2.2.1. *Hypericum heterophyllum* Türünün Genel Özellikleri

Koyun kıran otu olarak bilinen *H. heterophyllum* Guttiferae familyasına ait bir bitkidir. Sık çam ormanlarındaki kuru orman açıklıklarında, 1200-1600 m. yüksekliklerde görülür. Özellikle kahverengi kireçsiz toprakları tercih eden ve Türkiye için endemik olan kamefit bir bitkidir [34,35].

2.2.2. *Hypericum heterophyllum* Türünün Taksonomik Durumu

- Division: Magnoliophyta
- Classis: Magnoliopsida
- Subclassis: Dilleniidae
- Ordo: Theales

- Family: Guttiferae (Clusiaceae)
- Genus: Hypericum
- Species: *Hypericum heterophyllum* Vent. [17,36].

2.2.3. *Hypericum heterophyllum* Türü ile Yapılan Çalışmalar

H. heterophyllum türünün de içinde bulunduğu 22 bitki türü antibiyotik etki yönünden incelenmiştir. *S.faecalis*, *S.aureus*, *B.anthraxis*, *E.coli*, *N.gonorrhoeae*, *P.aeruginosa*, *Sh.dysenteriae* ve *S.typhosa* isimli mikroorganizmalar üzerinde denemeler yapılmıştır. *H. heterophyllum*'un *E. Coli* ve *Sh. dysenteriae* dışında diğer tüm test mikroorganizmalarına karşı etkili olmuştur. Kullanılan bitki türleri arasında en kuvvetli antibiyotik etki *H. heterophyllum*'da görülmüştür. Bu etkiye flavonoit heterozit etken maddesinin etkili olduğu saptanmıştır [37].

Türkiye florasında doğal olarak yetişen 25 bitki türünün, 10 bakteri ve 1 fungus türünden oluşan test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada, *H. heterophyllum* türünün antimikrobiyal ve güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [38].

Bazı *Hypericum* türlerinin esansiyal yağlarının antifungal etkilerinin belirlenmesi için bazı mantar türleri üzerine yapılan çalışmada *H. heterophyllum* türünün antifungal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [39].

2.3. Toksikoloji

Toksikoloji kelime anlamı olarak zehir bilimini ifade eder ve maddelerin canlı organizmalar üzerine istenmeyen, zararlı ve olumsuz etkilerini inceleyen bir bilim dalı olarak tanımlanır [40]. Tıpta teşhis ve tedavi amacı ile kullanılan bileşikler, gıda katkı maddeleri, tarım ilaçları, kimya endüstrisinde kullanılan pek çok bileşik, ara ürünler, metaller, petrol ürünleri, hava, su ve toprak kirleticileri ile hayvan ve bitki toksinlerini içeren geniş bir yelpazede yer alan bileşiklerin, canlı organizma üzerindeki toksik etkileri ve mekanizmaları ile uğraşan bilime toksikoloji denir [41].

Her yıl endüstriyel, ilaç, kozmetik ve gıda katkısı maddesi olarak üretilen pek çok kimyasal madde bir yandan yaşamımız için avantaj sağlarken bir yandan da daha çok kimyasal maddeye maruz kalmamıza neden olmaktadır. Bu maddeler az veya çok

oranda toksik etki meydana getirebilir ve sağlığımız için tehlikeli sonuçlar oluşturabilirler. Bu kimyasal maddelerin etkilerini bilmek ve onlara toksik düzeyde teması önlemek toksik etki oluşum riskini azaltmaktadır. Bu anlamda zararlı etkenlerden korunmak, olası riskleri belirlemek ve bilgilendirmek ve zehirlenmelerde yeni tedavi yöntemleri geliştirmek toksikolojinin uğraş alanları arasında sayılabilir [40].

2.3.1. Toksikolojinin Tarihçesi

Bazı ilaçların ilk olarak anlatıldığı kaynaklar, M.Ö. 1500 yıllarındaki Mısır papirüslerinde yer alan bilgilerdir. M.Ö. 400-250 yılları arasında ise Hippocrates, Aristotle ve Theophrastus'un çalışmalarında zehirlerin bazı özelliklerinden bahsedilmiştir. İlk Yunan'lı şairlerden Nicander şiirsel çalışmalarının ikisinde toksinlerden bahsetmiştir. Bunlardan "Therica" isimli eserinde hayvansal toksinlerden, "Alexipharmica" isimli eserinde ise bitkisel ve hayvansal toksinlerden bahsetmiştir. Bitkilerin toksik ve terapötik etkilerine göre sınıflandırılması ile ilgili ilk çalışmayı M.S. 50 yılında Roma imparatoru Nero tarafından görevlendirilen Yunan'lı Dioscorides yapmıştır. Galen (M.S. 131-200) ve Paracelsus (M.S. 1493-1541) tıp ve toksikoloji alanında çok önemli çalışmalar yapmışlardır. Özellikle toksikoloji denilince akla ilk olarak Paracelsus gelir. 16. yüzyılda Paracelsus'un zehiri tanımlarken kullandığı "her madde zehirdir, zehir olmayan madde yoktur, zehir ile ilacı ayıran dozdur" şeklindeki ifade, bugünkü modern toksikolojinin de çıkış noktasıdır. Toksikoloji alanında 18. yüzyılda da önemli gelişmeler olmuştur. Ramazini 1700'de yayınladığı "Diseases of Workers" isimli eseri ile mesleki toksikolojinin kurucusu olarak kabul edilir. Modern toksikolojinin kurucusu olarak ise İşpanyol Orfila kabul edilir. Orfila 1915 yılında yayınladığı "A general system of toxicology or, a treatise on poisons, found in the mineral, vegetable and animal kingdoms, considered in their relations with physiology, pathology and medical jurisprudence" isimli eserinde toksikolojiyi bir bilim olarak ayırmış ve tanımlamıştır [42].

2.3.2. Toksikite

Toksikoloji'nin belirlemeye çalıştığı zehirlilik tanımlanacak olursa; tüm maddelerin yeterli miktarda alındığında ve uygun sürelerde maruz kalındığında zehirli oldukları söylenebilir. Bir başka deyişle zehirlilik maruz kalınan maddenin miktarına, kan akışına absorpsiyonunun hız ve derecesine, yan ürünlere metabolizasyonunun hızı ve derecesine, vücuttan atılma hızı ve ölçüsüne bağlıdır. Su bile uzun süre ve yüksek miktarlarda alındığında insan vücudunda zehirlenme etkileri gösterir.

Toksikite bir maddenin zarara sebep olabilme potansiyelidir ve bir zararın oluşup oluşmadığını belirleyen faktörlerden biridir. Bir kimyasalın ise zararlı olması aşağıdaki faktörlere bağlıdır;

- **Doz:** Vücuda giren madde miktarı ile vücudun etkilenme derecesi arasındaki ilişkiye doz-tepki ilişkisi denir. Bir kimyasalın etkisi toplam doz kadar maruz kalma süresine bağlıdır.
- **Maruz kalma süresi:** Bir kimyasal ne kadar uzun süre maruz kalınırsa etkilenme olasılığı ve derecesi o kadar artar. Yüksek konsantrasyonlara kısa süreli maruz kalmalarda etki görülmeyebilir, fakat takip eden maruz kalmalarda zarar etkisi oluşabilir. Bir kimyasala uzun süre maruz kalmak genellikle tehlikelidir.
- **Reaksiyon ve Etkileşim:** Birden fazla kimyasala maruz kalma durumunda bunlar arasındaki reaksiyon ve etkileşimleri bilmek gerekir. İki kimyasalın reaksiyonu sonucu oluşan yeni madde daha zararlı olabilir.
- **Hassasiyet:** İnsanların bir kimyasalın etkilerine tepki ve hassasiyetleri farklı olabilmektedir. Bu tepkiler yaş, cinsiyet, kalıtsal özellikler, yeme-içme alışkanlıkları, hamilelik, sağlık durumu ve ilaç kullanılıp kullanılmadığı, alkol alışkanlıkları gibi faktörlere bağlıdır.

Tüm maddeler toksik olmasına rağmen tüm insanlar aynı maddeye aynı reaksiyonu göstermezler. Bu farklılıkları oluşturan faktörler;

- Genetik özellikler
- Vücuda alınma şekli

- Cinsiyet
- Yaş
- Doz oranı
- Kimyasal etkileşimler olarak sıralanmaktadır [43].

2.3.3. Toksikolojinin Bölümleri

Toksikoloji henüz gelişme süreci içinde olan bir bilim olduğu için alt dalları da gerek sayıca ve gerekse kapsam açısından değişme göstermektedir. Toksikolojinin alt dalları aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir.

- **Endüstriyel toksikoloji:** Meslekleri ve uğraşları nedeni ile insanların toksik maddelere maruz kalmasını konu almaktadır.
- **Çevre toksikolojisi:** Çevrede bulunan kirleticilerin toksisitelerini, toksik etkileşimlerini inceleyerek; hava, su, toprak ve besinlerdeki MAK (Uzun süre maruz kalmada zararsız olabilecek en yüksek konsantrasyonu) veya TLV (eşit limit değeri) değerlerini belirleyerek halk sağlığını korumaya yardımcı olmaktadır.
- **Forensik toksikoloji:** Orfila ile başlamış olup toksikolojinin en eski dallarındandır. Kimyasal maddelerin insanlar üzerindeki zararlı etkilerinin teşhis ve tedavileri ile uğraşır, zehirlenmeleri adli tıp açısından inceler.
- **Analitik toksikoloji (kimyasal toksikoloji):** Zehirlerin biyolojik materyalden izolasyonları, tanımları, nitel ve nicel analizleri için gerekli yöntemleri araştırır, geliştirir.
- **Klinik toksikoloji:** İnsan zehirlenmelerinin tanı ve tedavisi ile uğraşır. Veteriner toksikoloji hayvan zehirlenmelerinin tanı ve tedavisi ile ilgilenir.
- **Beslenme toksikolojisi:** Diyetteki toksikanlarla ilgilenip bunların beslenme ile ilgisini ve toksik etki mekanizmalarını araştırır.

- **Ekonomik toksikoloji:** Kimyasal maddelerin biyolojik dokulardaki seçici etkilerinden yararlanarak ilaçların, besin katkı maddelerinin ve pestisitlerin geliştirilmesini konu almıştır [44].

2.3.4. Toksik Etki Mekanizmaları

Genel olarak kimyasal maddeler canlılarda fizikokimyasal veya kimyasal yolla normal hücre biyokimyasını ve fizyolojisini bozarak toksik etkilerini gösterirler [44]. Bu toksik cevapların çoğu hücre ölümü ve kritik bir organın tahribi şeklinde olduğu gibi, hücre ölümüne neden olmayan fakat normal fizyolojik süreçlerdeki biyokimyasal ve farmakolojik dengenin bozulması şeklinde de ortaya çıkabilir [40].

Zehirlilik etkileri ortaya çıktıkları süreye ve tehlikeli maddeye maruz kalma sürelerine bağlı olarak iki çeşittir. 24 saatlik bir maruz kalma süresinde belirtiler ortaya çıktığı takdirde bunlar akut etkiler olarak tanımlanır. Genellikle kısa sürelerde maruz kalınan orta ve üzeri dozlarda gözlemlenirler. Akut etkilerin çoğu geçicidir [45]. Tehlikeli bir maddeye uzun süre maruz kalma sonucu oluşan etkiler ise kronik etkilerdir. Söz konusu etkiler genellikle kalıcıdır. Maruz kalma ve etkinin ortaya çıkması yıllar sürebilir. Kanserojen maddeler bu etkilerin en iyi örneğidir. Kimi zaman etkileri 20-30 yıl sonra görülmektedir [43].

Kimyasal maddelerin ya da ilaçların dönüşümsüz toksik etkileri mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olarak ortaya çıkmaktadır [46].

Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri, hücre çekirdeğinde DNA molekülünü bozarak hücre fenotipi değiştirmeleri olayıdır. Mutasyonlar, mutajenlere bağlı olarak ya da spontan olarak meydana gelebilmektedir. Mutajen etkenler, DNA çift zincirinin yapısında nokta mutasyon ya da geniş alanda değişiklik oluşturabilir [46].

Kimyasal maddelerin karsinojen etkileri değişik basamaklar içermektedir. Kimyasal maddelerle temas süresi, dozu ve sıklığı önemlidir. Toksik maddeler tarafından kanser indüksiyonunda bir başlatma süreci oluşturmaktadır. Bu başlatma döneminde normal hücrelerin, DNA üzerinde meydana gelen bir etkiyle neoplastik hücrelere dönüşmesi söz konusudur. Bununla birlikte ikincil başka olaylar da hücreleri kanser hücreleri şekline dönüştürebilmektedir. Karsinojen kimyasal maddeler genotoksik ya

da epigenetiktirler. Genotoksik karsinojenler genetik mutasyonlar oluşturabilmek için DNA ile kovalent bir şekilde etkileşirler. Genotoksik maddelerin çoğu prokarsinojenlerdir. Epigenetik bir madde genotoksik karsinojenlerin etkisini artırır [46].

Kimyasal maddelerin teratojen etkisi, embriyonal gelişim sırasında gebelerin dışardan aldıkları bazı kimyasal maddelerin plasentadan fetal dolaşıma geçerek fetüste oluşturdukları yapısal bozukluklardır [46].

Genetik materyale kromatit ve kromozom kırıkları ve dolayısıyla meydana gelen yapısal kromozom anomalileri şeklinde zarar veren ajanlar klastojenik ajanlardır. Klastojenik etki bazen, memelilerdeki hücrel metabolizma sonucu da meydana gelmektedir. Diğer yandan *in vitro* koşullarda herhangi bir fiziksel ya da kimyasal etken ile muamele edilen kan hücrelerinde klastojenik etki meydana gelebilmektedir [47].

2.4. Genotoksisite

Toksikolojinin, kimyasal ve fiziksel ajanların genetik materyal üzerindeki etkisini inceleyen alt dalına genotoksikoloji adı verilmektedir. Genetik toksikoloji çalışmaları, insanlar başta olmak üzere, tüm canlıların doğal genetik bütünlüğüne zarar veren tüm etkenleri saptamak suretiyle, bu konuda bilgilenmeyi ve risk analizi yaparak gerekli korunma önlemlerinin alınmasını sağlar [48].

Fiziksel ve kimyasal etmenlerin canlılar üzerindeki zararlı etkileri araştırmacıların son derece ilgisini çekmektedir. Toksik, mutajenik, kanserojenik veya teratojenik etkili olabilen bu etmenlerin zararlarını tespit etmek ve önlemler almak gerekmektedir [49].

Bitkilerden elde edilen ekstratlarda da bulunan bazı bileşikler, sitotoksik, mutajenik veya antimutajenik etkiye sahiptir [50,51]

Genotoksinler, genlerde değişime ya da yeniden düzenlenmeye sebep olan ajanlardır. DNA hasarına yol açan bu değişimler mutasyon olarak adlandırılır. Mutasyonlar hücre ya da organizma için kalıtsal değişimlerdir. Genotoksinler; kansere sebep olurlar, genetik birikime yol açarlar. Oluşturdukları mutasyonların kalıtılması genetik

hastalıkların artışını sağlar. Genotoksinlerin yarattığı sağlık hasarları nedeniyle, onları saptayabilen birçok yöntem geliştirilmiştir. İdeal bir test yöntemi; hızlı, ucuz, hassas, etik kurallara uygun, insan biyolojisi ile ilgili olmalı ve doğru sonuçlar vermelidir.

Genotoksik ya da mutajenik etkiyi araştıran test yöntemleri;

- Çevresel ya da mesleki olarak belirli ajanlara sürekli maruz kalan bireylerin genetik yapılarının izlenmesi ve hasar tipinin belirlenmesinde [52],
- Çevresel kaynaklardan izole edilen her çeşit yapay madde ya da kirletici ajanın mutajenik etkilerinin araştırılmasında [53],
- Sentez edilerek, gıda, sağlık, kozmetik, temizlik ve sanayi gibi farklı alanlarda kullanıma sunulan ya da sunulacak olan, kimyasal bileşiklerin mutajenik ve karsinojenik potansiyellerinin ya da antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklerinin tespit edilmesinde [54],
- Çeşitli hastalıkların, özellikle de kanser olgularının genetik hasarla ilişkilendirilmesinde [55],
- Son yıllarda giderek yaşamın bir parçası haline alan biyoteknolojik ürünlerin risk değerlendirmelerinin yapılmasında kullanılabilmesi bakımından önem taşımaktadır [56].

2.4.1. Genotoksik Etmenler

Genotoksik etmenler şu şekilde sıralanır.

1. Kromozomal ve Genetik Etmenler

2. Çevresel Etmenler

a. Enfeksiyon Ajanlar

- Virüsler
- Parazitler
- Bakteriler

b. Fiziksel Etmenler,

- Radyasyon ve Yüksek Enerjili Işıklar (UV, X, α , β , γ ışınları)

c. Kimyasal Maddeler

- Anorganik Kimyasallar
- Organik Kimyasallar
- d. Keyif Verici Etmenler
 - Alkol
 - Tütün ve Sigara
 - Uyuşturucu Maddeler
- e. Bazı Farmakolojik Ajanlar
- f. Pestisitler
- g. Doğal Etmenler
 - Bitkiler [57].

2.4.2. Genetik Toksikite Testlerinin Kullanım Alanları

Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir [58].

Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar [44,59,60]. Genotoksisite testleri ile mutajenlerin tanımlanması, insanda risk tayininin yapılması ve bu maddelere gereksiz maruziyetin önlenmesi genetik toksikolojinin başlıca amaçlarını oluşturmaktadır. Genellikle kısa dönem mutajenite testleri tarama amaçlı kullanılırken, memeli testleri ise insanda risk tayini için kullanılmaktadır [44].

Genotoksisite testleri esas olarak genomu etkileyebilecek UV ve irradyasyon gibi fiziksel etkenlerin, parazitik enfeksiyonların, sigara, pestisitler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateryaller gibi birçok kimyasal ajanın genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların hem piyasaya sürülmeden önce hem de ilaç kullanan kişilerdeki genetik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarının tespitinde, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kanserden korunmada, kansere duyarlılığın tayininde ve takibinin yapılmasında biyoizleme testleri olarak kullanılmaktadır [59,61-63].

Bileşiklerin genotoksik etkisinin saptanmasında tek bir testin tek başına yeterli olmadığı, bu nedenle bileşiklerin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test sisteminin kullanılması gerektiği vurgulanmıştır [59,64-66].

2.4.3. Genetik Toksikite Testleri

Genetik sistemler ile genotoksitesi test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri şunlardır;

- Comet Testi
- Ames testi
- Kromozom Anomalileri (CA) Testi
- Gen (Nokta) Mutasyonları
- Kardeş Kromatid Değişimi (SCE)
- Mitotik İndeks (MI)
- Replikasyon İndeksi (RI)
- Mikronükleus Testi (MN) [67].

2.4.3.1. Comet Testi

Bu yöntem, DNA iplik kırılmaları ve çapraz bağlanma gibi DNA hasarları ile DNA onarım bölgelerindeki hataları, bir mikrojel sistemi kullanarak belirleyebilmektedir [68,69]. Uygulamada, kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücrelerindeki DNA hasarını belirlemek amacıyla *in vivo* ya da *in vitro* olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda, özellikle endüstriyel ürünlerde de kullanımı hızla artan bir test sistemidir. Hücreler erimiş agarozda süspansiyon edilerek lam yüzeyine yayılarak, yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltisi ve deterjan ile lizis edilmektedir. Serbest kalan DNA nötral ya da alkali koşullarda elektroforeze tabi tutulmaktadır. DNA'nın elektroforez ortamında anoda doğru olan göçü taşıdığı hasar ölçüsünde farklılık gösterir. DNA'daki hasar büyük ise, zerrecikler şeklinde yaygın bir göç sergiler. DNA'nın jel üzerindeki konumu uygun bir boyama yapılarak, flouresan ya da ışık

mikroskobu kullanılarak görüntülenmekte ve oluşan DNA kuyruklarının ölçülmesi ile maruz kalınan ajanın genotoksik potansiyeli hakkında fikir edinilmektedir [65].

2.4.3.2. Ames Testi

Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom mutajenite testi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılan, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen/karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallarla geçerliliği en fazla kabul edilmiş bakteriyel test sistemlerinden biridir. Ayrıca hızlı, ucuz ve uygulanabilirliğinin kolay olması nedeniyle çok yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu test, insanlarda ve deney hayvanlarında tümör oluşumunda somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonların saptanmasında ve kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyerek mutajenik ve karsinojenik etkilerini ortadan kaldıran antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tayininde de sıklıkla kullanılmaktadır [59,70,71].

Bu testin temeli, yapay *Salmonella typhimurium*' ın histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (his=oksotrof) olan suşların test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip his+ hale geri dönüşmesine dayanır. Geri dönüşen (revertant) bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde de mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakteriler olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan revertant koloni sayılması gerekir [71].

2.4.3.3. Kromozom Anormallikleri (KA) Testi

Kromozomal anormallikler DNA düzeyindeki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından, yeni yapıya sahip kromozomlar ise DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır. Genetik materyalde oluşan bu tip hasarlar tamir edilemediğinde ortaya çıkan yüksek KA frekansı ise, artmış kanser riskini göstermektedir [65,72-74]. Bu test kısaca hücreler metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir [75].

KA testi mutajenler tarafından indüklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin saptanması amacıyla sıklıkla kullanılan standart bir yöntemdir. *In*

vitro KA testi ile memeli hücre kültürlerinde, *in vivo* KA testi ile genellikle kemik iliği hücrelerinde kromozom anormalliği frekansı değerlendirilebilmektedir. Ayrıca *in vivo* KA testi, özellikle mutajenik hasarın belirlenmesinde türe ve dokuya göre değişebilen metabolizma, farmakokinetik ve DNA onarım mekanizmaları gibi faktörlerin değerlendirilmesine de olanak sağlamaktadır [59,62,76].

2.4.3.4. Gen (Nokta) Mutasyonları

Bu tip mutasyonlar DNA üzerindeki bazlarda ya da genlerde ortaya çıkan değişimlerdir. Bunlar bir gende bir veya birkaç bazın değişmesi, ilavesi veya delesyonu şeklinde ortaya çıkabilir. Nokta mutasyonlarına da bir genin mutant alleli ile normal olan yabancı tipi arasında sadece bir baz çifti bakımından farklılık olabilir [77].

2.4.3.5. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE)

Hücre mitoz bölünme geçireceği zaman, kromozomlar metafaz evresinde hücrenin ekvator düzleminde dizilmekte ve kardeş kromatidler anafazda zıt kutuplara doğru ayrılmaktadırlar. Yani kardeş kromatidler arasında bir parça değişimi söz konusu değildir. Ancak bazı kimyasallar özellikle DNA'ya bağlanan ya da DNA replikasyonunu etkileyen kimyasallarla DNA'nın her iki zincirinde de kırıklar meydana gelir ve kırılan kromatidler karşılıklı olarak yer değiştirir. Bu olaya kardeş kromatid değişimi (KKD) veya sister chromatid exchange (SCE) denir [78,79].

Bu test, çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin, özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimlerin araştırılmasında önemli bir yere sahiptir. Mutajen ve karsinojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan hücrelerde ve kromozom kırılabilirliği ve yatkınlığı ile karakterize edilen çeşitli kalıtsal hastalıklarda KKD frekansının arttığı ve artmış KKD frekansı ile tümör oluşumu arasında lineer bir ilişkinin olduğu saptanmıştır [65,80-82].

2.4.3.6. Mitotik İndeks (MI)

Aynı cins hücrelerden oluşan bir hücre popülasyonundaki bütün hücrelerin, hücre siklusu süreleri tam olarak aynı değildir. Birçok değişik ve karmaşık faktörlere bağlı olarak, bu hücrelerin hücre siklusu süreleri arasında oldukça büyük varyasyonlara

rastlanır. Bir hücre popülasyonundaki hücrelerin hücre siklusları ile ilgili kantitatif verilerin elde edilmesi amacı ile çeşitli ölçümler yapılabilir. Bunlardan birisi de, popülasyondaki mitoz bölünme yapan hücrelerin sayısının saptanması ve bu sayının tüm hücrelere oranının hesaplanmasıdır. Bu değere mitotik indeks (MI) adı verilir [83].

Mitotik indeks, hücre bölünme frekansını yansıtır ve büyüme gelişme oranını belirlemede önemli bir parametre olarak kullanılır. Mitotik indeksteki azalmaya paralel olarak büyüme ve gelişme olayları da yavaşlar. Hücrelerin mitoz girme hızıdır. Uygulanan kimyasalın toksisitesi arttıkça mitotik indeks değeri düşmektedir. Mitotik indeks 1000 hücre arasından mitoz girmiş olanların sayısıdır. Mitoza girmiş olanlar için metafaz plakları esas alınır [84].

2.4.3.7. Replikasyon İndeksi (RI)

Replikasyon indeksi (RI) hücre bölünme kinetiğinin ölçülmesidir. Her bir doz veya örnek için en azından 400 hücre sayılarak ve 1, 2, 3 veya daha fazla nükleus içeren hücrelerin yüzdelikleri belirlenerek hesaplanmaktadır. Bazı hücreler çekirdek bölünmesi geçirmekte fakat sitoplazma bölünmesi geçirmemektedir. Bunun sonucu olarak bir kez bölünme geçiren hücreler 2 nükleusa, 2 bölünme geçiren hücreler 3 veya 4 nükleusa sahip olmaktadır. Henüz bir bölünmesini tamamlamamış PHA (mitoz indükleyici) ile uyarılmaya cevap veren hücreler sadece bir nükleusa sahiptir. Mitoz indükleyiciye maruz kalmayan hücreler sayıma dahil edilmemektedir [85].

2.4.3.8. Mikronükleus (MN)

MN'ler genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalan insanlarda, kanser ve

genomik düzensizlik ile karakterize edilen çeşitli hastalıklarda MN frekansının önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur [59,66,86,87].

Ayrıca multipolar anafaz ve telofazda MN oluşumuna sebep olmaktadır [88]. MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ iplikçiklerinde ve sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır [89]. Böylece, MN testi ile hem klastojenik hem de aneujenik etkiler belirlenebilmektedir [90,91]. Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur [92-94].

MN oluşumunu indükleyen her ajan klastojen olmayabilir. MN oluşumuna iğ ipliklerinin inhibisyonu ve apoptozis gibi diğer etkenlerde yol açabilmektedir. Eğer oluşuma kromozomlardan kopan bir parça neden olmuşsa (asentrik bir kromozom parçası), bu klastojenik bir olayın sonucu iken eğer oluşuma neden olan olgu anafazda geri kalma ya da iğ ipliklerinin hasarından dolayı oluşmuşsa, bu duruma anojenik bir ajanın neden olduğu belirtilmektedir [95].

Bölünebilme yeteneği olan her hücrede MN meydana gelebilmektedir. Bu olay herhangi bir kimyasala maruz kalmadan da oluşabilmektedir. Yani *in vitro* bölünme safhasında olmayan bir nükleuslu bir hücreye bakıldığında bir mikronükleusun kendiliğinden mi oluştuğunu yoksa uygulanan bir kimyasalın etkisiyle mi oluştuğu anlaşılmaz. Fakat bölünme esnasında karyokinezden sonra sitokinezden önce; kendiliğinden oluşan MN kaybolur, kimyasalın etkisiyle oluşanlar kalır. İki nükleuslu bir hücreye bakıldığında MN gözlenmişse bu verilen kimyasalın genotoksitesinin bir göstergesidir [96].

2.4.3.8.1. Mikronükleus Testi

MN testi, mutajenler ve karsinojenler tarafından indüklenen DNA hasarını belirlemede hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak kullanılan sitogenetik bir testtir. MN analiz yöntemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemek için kullanılır [97]. İlk olarak memeli sistemler için geliştirilmiş olan MN testi, farklı etmenlerin

genotoksik etkilerinin araştırılmasında oldukça yaygın olarak kullanılan bir test metodu haline gelmiştir [95].

Bu test, genotoksik etkiyi belirlemede en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bazı kromozom anormalliklerinin tespit edilmesinin zor olduğu diğer metotlara göre daha uygun olması, daha çok sayıda hücrenin incelenebilmesi ve istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajlar sağlaması nedeni ile hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak farklı ajanların mutajenik etkilerini değerlendirmek amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır [98]. MN testi ile genotoksik ajanların mutajenik etkileri tespit edilirken, kullanılan test gruplarındaki MN oranı kontrol gruplarından daha fazla çıkar ise test edilen maddenin mutajenik olduğuna, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bir farklılık meydana gelmemişse mutajenik olmadığına karar verilir. Eğer uygulanan madde mevcut MN oranında azalmaya sebep oluyorsa maddenin anti-mutajenik olduğu anlaşılır. Ayrıca uygulanan maddenin toksik dozunun artmasıyla birlikte artan MN oluşumuna karşın, sonradan bir azalma meydana geliyorsa o zaman da aşırı toksik dozdan hücre ölümlerinin gerçekleşmeye başladığı düşünülebilir [99].

MN testi daha çok kan hücrelerinde ve kemik iliği hücrelerinde uygulanan bir yöntemdir. Fakat bunların yanı sıra çeşitli çalışmalarda karaciğer, akciğer, solungaç, böbrek, bağırsak, embriyo, ağız epitel hücreleri, üriner epitel hücreleri, deri fibroblastları ve yumurtalık hücreleri de kullanılmıştır. Farklı hücre çeşitlerinde uygulanabilen MN testi, farklı organizmalar üzerinde de kullanılmaktadır. Bu amaçla insan lenfositleri, fare, sıçan, balık, kurbağa, midye, salyangoz ve bitkiler test organizması olarak kullanılmıştır [100].

MN testi insanlarda genotoksiteyi belirlemek amacıyla çoğunlukla periferik kan lenfositlerinde uygulanır. Çünkü yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur. Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniği, eksfoliyatif hücrelere de uygulanmıştır. Bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş ve ürotelyal eksfoliyatif hücrelerde kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur [101].

MN testi, mitoz ile oluşan tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir test haline gelmiştir [102]. *In vitro* MN testinde, uygun ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde sitokalasin-B maddesi ilave edilmektedir. Bu madde sitokinezi inhibe etmekte ve bir hücre siklusunu tamamlayan binükleat (çift nükleuslu) hücrelerin oluşumunu sağlamaktadır. İnkübasyon süresi sonunda kültürler protokollere uygun şekilde hasat edilmekte ve preparatlarda MN bulunduran binükleat hücrelerin oranı tespit edilmektedir [59,95]. *In vivo* MN testinde ise, sitokinezi bloke edilmemiş memeli eritrosit hücrelerindeki MN sıklığı belirlenmektedir. Bu test ile genellikle kemik iliğinde veya periferik kan hücrelerindeki olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin MN oluşumu bakımından analizi yapılmakta ve test edilen bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı saptanmaktadır [95,103].

2.4.3.8.2. Mikronükleus Tekniğinin Gelişimi

MN'lar ilk kez Howell tarafından eritrosit sitoplazmasında görülmüş ve bu yapılar "nükleer materyal fragmenti" denmiştir. Bunlar 1900'lü yılların başlarında Jolly terminolojisinde "intraglobuler korpusküller" olarak tanımlanmıştır. Bu yapılar "Howell-Jolly cisimcikleri" olarak bilinir. Benzer yapılar 1937'de Brenneke tarafından fare, sıçan embriyolarında ve 1951'de Thoday tarafından *Vicia faba*'da da görülmüştür. Bunlara "fragment nükleuslar" veya "mikronükleuslar" denmiştir. Evans 1959'da *Vicia faba* kök uçlarında MN'ları radyasyona maruz kalan hücrelerde gördüklerini, asentrik fragmentlerden orjinlendiklerini ve mitozun son safhasında iki yavru nükleustan ayrılarak oluştuklarını bildirmişlerdir. *Vicia faba* kök uçlarında nötron ve gamma ışınlarının etkisini karşılaştırdıkları çalışmada, sitogenetik hasarın belirteci olarak MN'ların kullanılabilirliğini tespit etmişlerdir. MN test yöntemini ilk olarak önerenler Boller ve Schmid (1970) ve Heddle'dir (1973). Bu araştırmacılar ajanların genotoksik potansiyellerini ölçmek için kemik iliği eritrositlerinde MN'u test yöntemi olarak kullanmışlardır [104]. Daha sonra 1980'de MacGregor ve arkadaşları tarafından bu metot periferik kanda dolaşan polikromatik eritrositlerde denenmiş ve en az kemik iliği metodundaki kadar hassas olduğu gözlenmiştir. Bu metot hayvanları öldürmeden fazla sayıda örnek alınmasına olanak verdiği için daha

avantajlı sayılmıştır [105]. Countryman ve Heddle 1976 yılında yaptıkları çalışmada, lenfositlerde MN oluşumunu belirleyerek, kromozom hasarının meydana çıkarılmasında diğer bir uygulanabilir hücresel sistem ileri sürmüşlerdir [104]. Von Ledebur ve Schmid 1973'te, Högstedt ve Karlsson 1985'te geliştirdikleri modifiye metotlarla, aneuploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada, MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'ların asentrik kromozom fragmentleri içeren küçük, aneujenlerce uyarılan MN'ların tam kromozomlar içerdiğini ve daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir [106]. Daha sonraları 1985 ve 1986 yıllarında Fenech ve Morley tarafından Sitokinez-Blok (Cytokinesis-Block) Metodu geliştirilmiştir [106]. MN tekniği, en çok çeşitli kimyasallara ve fiziksel ajanlara maruz kalmış bireylerin taranması amacı ile bireyler arasında genetik hasarın temel seviyesini anlamak ve çeşitli ajanların klastojenik ve aneujenik potansiyellerini değerlendirmek amacı ile insan lenfositlerini de içeren farklı tip hücrelerde geniş çapta kullanılmaktadır [107].

2.4.3.8.3. Mikronükleus Oluşumu

MN ana kromozomdan kopmuş olan parçacıklardan ya da anafaz esnasındaki hatalara bağlı olarak ana nükleusa dahil olamayan tam kromozomlardan oluşan ve sitoplazma içerisinde ana nükleusa ilaveten görülebilen küçük nükleustur. Metafaz kromozomlarındaki kırılmalar sonucunda oluşan fragmentler ve deforme kromozomlar mitoz bölünme sonunda oluşan hücrelerde MN oluşumlarına yol açmaktadırlar [108]. Başka bir ifade ile doğrudan DNA'da ya da iğ ipliğinde meydana gelen hasar ile hücre bölünmesi sonunda ana nükleusa dahil olmayan kırık kromozom fragmentlerinden ya da tüm kromozomun kromatin haline dönüşmesi ile oluşur. Bir hücrede görülen MN o hücredeki sayısal veya yapısal bir genetik hasarı işaret eder [103].

Hücre bölünmesi sırasında meydana gelen kromozom anomalileri ya uzunlamasına bölünen kromozomların birbirlerinden ayrılmayarak aynı kutba gitmesi (nondisjunction) ya da kromozomların anafazda geri kalması (anafaz lagging) şeklinde olmaktadır [109]. MN anafazda kromozom ya da kromozom parçalarının geri kalmasından oluşur. Bir membran içinde kromatin materyali içeren MN, hücrelerin sitoplazmasında bulunur ve normal hücre nükleusundan ayrılır [110].

Kromozomların anafazda geri kalmalarının nedeni, sentriollerden oluşan mikrotübüllere sentromerlerinden bağlanamamalarıdır. Herhangi bir sebepten dolayı kromozomlardaki bir kırılma sonucu oluşan kromozom parçaları sentromerden yoksun olabilirler ve bundan dolayı mikrotübüllere bağlanmaları mümkün olmayabilir [111]. Kromozomların anafazda geri kalmasının diğer bir nedeni de sentromerin özel bir bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonu sonucunda, kinetokorun fonksiyonunun değişmesidir. Bu değişiklik sonucunda kromozomlar mikrotübüllere bağlanamaz. Sentromer içinde yer alan bu bölgede CCG bazlarından oluşan zincir, özellikle kinetokor fonksiyonu için önemli bir bölgedir. Anafazda geri kalan kromozomlar, hücre bölünmesi sonunda sitoplazmada membranla çevrili MN'ları oluştururlar. MN'lar kromozom parçaları içerdikleri için nükleus boyaları ile boyanabilmektedir. Eritrositler olgunlaşırken hücre çekirdeği ile MN'lar atılmazlar, sitoplazmada kalırlar [112].

Hücrede spontan olarak da MN oluşabilir. Spontan MN sayısı hücre bölünmesinin ve asentrik kromozom parçalarının oluşma sıklığına bağlıdır. Spontan MN oluşumuna iki tip mutasyon neden olmaktadır. Bunlardan birincisi, kinetokor proteinlerinde, sentromerde oluşan mutasyonlar ve anafazda kromozom kaybı ya da eşit olmayan kromozom dağılımına yol açan iğ iplikçiklerindeki mutasyonlardır. İkincisi ise, asentrik kromozomların oluşumuna neden olan, çevresel mutajenlere maruz kalmanın bir sonucu olarak tamir edilemeyen DNA zincir kırıklarıdır [113].

2.4.3.8.4. Mikronükleusun Yapısı

Hücresinin ana çekirdeğinden ayrıdır. Işık kırılma gücü yoktur ve çekirdekle aynı renkte boyanır. Çapı esas çekirdeğin çapının 1/3'ünden daha azdır. Genel olarak yuvarlak şekilde olan MN'lar bazen badem ya da hilal şeklinde de olabilirler. MN'ları oluşturan kromozom parçaları, DNA'da doğrudan çift zincir kırılmaları, tek zincirdeki kırıkların hücre replikasyonundan sonra çift zincir kırıklarına dönüşmesi veya DNA sentezinin inhibisyonu sonucu ortaya çıkabilir. Genel olarak bir hücre içinde bir MN oluşmasına karşın, genotoksinin etkisine bağlı olarak bazen bu sayı iki ya da daha fazla olabilir [61,114].

2.4.3.8.5. Mikronükleus Testinin Avantajları

MN test yöntemini sitogenetik anormallikleri belirlemede etkili bir metot yapan; farklı hücre tiplerinde *in vitro* şartlarda yaygın uygulanabilirliği ve sayım kolaylığıdır. Ayrıca elde edilen verilerin çok sayıda olması istatistiksel dayanağının güçlü olmasını sağlar [107].

Yapımı kolay, ucuz ve hızlıdır. Pek çok farklı hücre tipinde uygulanabilir. Rutin uygulama için uygundur. Hücreler doğru tanımlanır. Kromozom ve genom mutasyonları tek işlemde tanımlanabilir [95].

Kirsch-Volders ve arkadaşlarının 1997'de, Fenech ve arkadaşlarının 1999'da yaptıkları çalışmaların sonuçlarına göre; bu yöntem klastojenik ve aneujenik etkileri birbirinden ayırabilmekte; Elhajouji ve arkadaşlarının 1997 yılı çalışma sonuçlarına göre de doz-cevap eğrisi, tam kromozom ve kromozom ayrılmaması sonuçlarına uygulanabilmektedir. Bundan dolayı *in vitro* MN test yöntemi bilimsel olarak yeterli ve güçlü kabul edilmektedir [104].

2.4.3.8.6. Mikronükleus Testinin Kullanım Alanları

1980'den sonra özellikle deney hayvanlarıyla gerçekleştirilen kontrollü çalışmalarda, kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu sitogenetik harabiyetin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısı çok hızlı bir şekilde artmıştır. Günümüzde MN testi genotoksik, sitotoksik ve karsinojenik ajanların hücre genomu ve viabilitesi üzerine etkilerinin analizinde başarıyla kullanılmaktadır [106]. MN testi başlıca; kromozomları etkileyebilecek fiziksel etkenlerin (UV ve irradyasyon gibi) ve her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, kanserden korunmada ve kanserin izlenmesinde bir biyoizlem testi olarak yaygın kullanılmaktadır (59,106). Kullanım alanlarından biri olan kanser genetiğinde de hastalığın tanısının konulması ve takibinin yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu teknik hücrelerin morfolojik bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve kanseri gösterebildiğinden bir biyomarker olarak değerlendirilebilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir (115,116). Tedavinin yanı sıra

hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkan ikincil kromozomal değişikliklerin tespiti için oldukça kullanışlı bir yöntemdir [59,93,116]. Ayrıca iyonize radyasyonun ve mikro dalga ışınların klastojenik etkisinin ortaya çıkarılmasında da geniş bir yer tutmaktadır. MN testi sigara, pestisitler, nanomateryaller, gıda katkı maddeleri ve diğer birçok kimyasal maddeler, parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için de kolaylıkla kullanılmaktadır.

İlaçların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bu test, hem yeni üretilen ilaçların mutajenik etkilerinin önceden gözlenebilmesini hem de ilaç kullanan kişilerdeki genotoksik etkilerin belirlenmesini sağlamasından dolayı ilaç şirketleri ve farmakolojik çalışmalar için giderek değeri artan bir test haline gelmiştir. Ayrıca ilaçların genotoksik bakımdan güvenilirliğini gösterdiğinden insan sağlığı için de önemi büyüktür [101].

Bu çalışmada *Hypericum* cinsine ait *H. heterophyllum* türünün çeşitli konsantrasyonlardaki su ekstraktlarının insan periferel kan lenfositlerinde MN, MI ve RI oranlarına bakılarak genotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu araştırma; Bozok Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sitogenetik Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereçler

Laboratuvarında ve tez çalışmasında kullanılan malzemeler şunlardır.

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. CO₂'li İnkübatör (HERA Cell 150)
2. Etüv (Nüve FN500)
3. Santrifüj (Nüve NF800)
4. Araştırma Işık Mikroskobu (Olympus BX51)
5. Işık Mikroskobu (Olympus CX21)
6. Dijital Fotoğraf Makinesi (Olympus C 5050 Z)
7. Bilgisayar (HP Compaq 610)
8. Derin Dondurucu (Arçelik)
9. Buzdolabı (Indesit)
10. Hassas Terazî (VİBRA)
11. Otomatik Pipet (Capp 0.2-2, 5-50, 10-100 µL – Microlit 10-100, 100-1000 µL)
12. Saf Su Cihazı (Millipore)

3.1.2. Sarf Malzemeler

1. Kültür Medyumu (RPMI 1640) (Biological Industries, Katalog Numarası 01-201 1B)
2. Hücre Kültür Tüpü (Greiner bio-one CELLSTAR[®], Katalog Numarası 164 160)
3. Kolşisin (Biological Industries, Katalog Numarası 12-003-1C)
4. Potasyum Klorür (MERCK Katalog Numarası 104936.1000)
5. Glasiyal Asetik Asit (MERCK, Katalog Numarası 1.00063.2500)
6. Metanol (MERCK, Katalog Numarası 1.06009.2500)
7. Giemsa (MERCK, Katalog Numarası 1.09204.0500)
8. Gurr Buffer Tablet (GIBCO, Katalog Numarası 10582-013)

9. İmmersiyon Yağı (MERCK, Katalog Numarası 09403569)
10. Lam (ISOLAB)
11. Plastik Pastör Pipet (ISOLAB, Katalog Numarası 108-04-001)
12. Cam Pastör Pipet (ISOLAB, Katalog Numarası 108-03-001)
13. Pipet ucu (Beyaz, 0.1-10 µL) (Corning Incorporated, Katalog Numarası 10807006)
14. Pipet ucu (Sarı, 1-200 µL) (Corning Incorporated, Katalog Numarası 00907001)
15. Pipet ucu (Mavi, 100-1000 µL) (Corning Incorporated, Katalog Numarası 27906031)
16. Kurutma Kağıdı (Macherey-Nagel, Katalog Numarası 751-75)
17. Enjektör (10 mL) (Set[®], Katalog Numarası C03306)
18. Enjektör (5 mL) (Set[®], Katalog Numarası C03306)
19. Cam Malzemeler (Mezür, Beher, Erlen, Şale)
20. Eppendorf Tüpü (LP Italiana SPA)

3.2. Çalışmada Kullanılan Madde ve Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan madde ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri şöyledir.

3.2.1. Kültür Medyumunun İçeriği

Çalışmada kullanılan 100 mL RPMI 1640 Peripheral Blood Karyotyping Medium;
Serum; FCS (%20),

Mitoz uyarıcı; PHA,

Antibiyotik, Gentamisin,

L-Glutamin içerir.

Ticari olarak satılan medyum derin dondurucuda -20°C'de son kullanma tarihine kadar muhafaza edilir. Derin dondurucudan çıkarılarak çözünen medyum ise buzdolabında +4°C'de 10 gün saklanabilir.

3.2.2. Hipotonik Solüsyonunun Hazırlanması

2.796 g potasyum klorür (KCl) 500 mL distile su içerisinde çözünür.

Elde edilen hipotonik solüsyonu (0.075 M KCl) oda sıcaklığında muhafaza edilir.

3.2.3. İbrainov Solüsyonunun Hazırlanması

92 mL Distile Su

5 mL Glasial Asetik Asit

3 mL Metanol içerir.

Solüsyon her kullanımda yeni hazırlanmalıdır.

3.2.4. Fiksatifin Hazırlanması

3 Hacim Metanol : 1 Hacim Asetik Asit ile karıştırılır.

3.2.5. Gurr Tamponunun Hazırlanması

1 tablet Gurr Buffer Tablet (pH: 6.8) 1000 mL distile su içerisinde çözünür.

Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

3.2.6. %5'lik Giemsa Boyasının Hazırlanması

5 mL Giemsa Gurr Tamponu ile 100 mL'ye tamamlanır.

3.3. *Hypericum heterophyllum* Ekstraktlarının Eldesi

H. heterophyllum örneklerinin toprak üstü kısımları doğal şartlarda oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulmuş bitki parçaları 1 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde saf su içerisinde kaynatıldı ve ekstere elde edildi. Elde edilen ekstrakt renkli ve kapaklı cam şişelerde kullanılıncaya kadar buzdolabında 4°C'de saklandı.

3.4. Periferel Kanların Alınması

Çalışmada; sigara ve alkol kullanmayan ve herhangi bir viral enfeksiyonu bulunmayan sağlıklı kişilerin kanları kullanıldı. İdeal olarak kan örneği heparinli steril bir tüpe alınır ve karıştırılarak pıhtılaşması önlenir. Tüpteki heparinize kan buzdolabında +4°C'de 5 güne kadar bekletilebilir ve kültür için kullanılabilir. Ancak kanın kültüre edilmeden bekletilmesi hücrelerin canlılığını etkilemekte ve dolaylı olarak kimi kromozom kusurlarına neden olabilmektedir. Bunun için kanın alındığı andan itibaren en geç 24 saat içinde kültürü yapılmalı ve daha uzun süreli beklemelemlerden sakınılmalıdır. Çalışmamızda kullanılan periferel kan örnekleri ekim yapılacak gün alınarak, aynı gün içerisinde kullanıldı.

3.5. Periferel Kan Kùltürü

Periferel kan kùltürü ekimi aşamaları aşğıdaki gibidir.

1. Her hasta için 37°C’de ısıtılmış 5 mL medyum kullanıldı.
2. Kùltür ortamlarına heparinize 0.4 mL kan ilave edildi.
3. MN değerlendirmesinde kullanılacak tüplere sitokalazin-B, RI değerlendirmesinde kullanılacak tüplere BrdU ilave edildi.
4. Kùltür ortamlarına 24. saatte farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/mL) bitki ekstraktları ilave edildi. Kontrol grubunu oluşturacak tûp sadece medyum ve kandan oluştu.
5. Tûplerin kapağı kapatılarak altûst edildi ve 37°C’de 72 saat CO₂’li inkûbatöre kaldırıldı. Ekim yapılan tûpler çıkarım tarihine kadar günde birkaç kez altûst edildi.

3.5.1. Kùltürün Sonlandırılması (Çıkarım)

Kùltürün sonlandırılması aşamaları aşğıdaki gibidir.

1. Ekim yapılan kùltür tûplerine 70. saatte 100 µL kolşisin ilave edildi ve altûst edilerek etûve kaldırıldı. Tûpler etûvde 2 saat bekletildi.
2. 2000 rpm’de 4 dakika santrifûj edildi.
3. Süpernatant atılarak pellet resûspanse edildi.
4. 10 mL 37°C’de ısıtılmış hipotonik solûsyonu ilave edilen tûpler 4 dakika oda ısısında bekletildi.
5. 2000 rpm’de 4 dakika santrifûj edildi.
6. Süpernatant atılarak pellet resûspanse edildi.
7. Pellet üzerine oda ısısında bekletilmiş ibrainov solûsyonundan 5 mL ilave edildi.
8. Hemen 2000 rpm’de 4 dakika santrifûj edildi.
9. Süpernatant atılarak pellet resûspanse edildi.
10. Pellet üzerine 5 mL metanol ilave edildi.
11. Hemen 2000 rpm’de 4 dakika santrifûj edildi.
12. Süpernatant atılarak pellet resûspanse edildi.
13. Pellet üzerine derin dondurucuda bekletilmiş fiksatiften 5 mL ilave edildi.
14. Elde edilen hücreler preparasyon aşamasına kadar –20°C’de bekletildi.

3.5.2. Preparat Hazırlanması ve Boyanması

Preparat hazırlanması ve boyanması aşamaları aşağıdaki gibidir.

1. Çıkarım işleminden sonra -20°C 'de muhafaza edilen rezervler, derin dondurucudan çıkarılarak 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi.
3. Metanol içerisinde buzlukta saklanan ıslak soğuk lamalar alınarak, üzeri soğuk fiksatif ile yıkandı.
4. Farklı yerlere gelecek şekilde 2-3 damla hücre süspansiyonundan lam üzerine damlatıldı. 2-3 saniye beklendi ve sonra üzeri tekrar soğuk fiksatif ile yıkandı.
5. Hazırlanan preparat ışık mikroskopunda incelendi. Metafaz alanının miktarı ve düzgün dağılıp dağılmadığı kontrol edildi.
6. Preparatlar %5'lik giemsa ile 7 dakika boyandı.
7. Preparatlar 2 kez saf sudan geçirilerek boyanın fazlası alındı.

3.5.3. Mikroskop Değerlendirmesi ve Hesaplama

Mikroskop değerlendirmesi ve hesaplaması şu şekilde yapılmıştır.

3.5.3.1. Mitotik İndeks Sayımı ve Hesaplanması

MI değerlendirmesinde 1000 hücre sayılarak metafaza giren hücre sayısına oranlandı. MI (%) oranları aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{MI (\%)} = \text{Mitoz (metafaz) Geçiren Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı} \times 100$$

3.5.3.2. Replikasyon İndeksi Sayımı ve Hesaplanması

RI değerlendirilmesinde 500 hücre sayılarak RI aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{RI (\%)} = (\text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3}) / \text{Toplam Hücre Sayısı (=500)}$$

M1: Mononükleat Hücreler

M2: Binükleat Hücreler

M3: Trinükleat ve Polinükleat Hücreler [117, 118].

3.5.3.3. Mikronükleus Sayımı ve Değerlendirmesi

MN değerlendirmesinde, 500 hücrenin MN sayıları belirlendi. Sonuçlar %MN şeklinde elde edildi. MN değerlendirilmesi aşağıdaki kriterler dikkate alınarak yapıldı.

1. MN rengi çekirdek rengi ile aynı olmalıdır.
2. Değerlendirilecek hücrenin sitoplazması içerisinde nükleusun görünmesi gerekir.
3. MN genellikle yuvarlak olmalıdır.
4. Çekirdeği olmayan dejenere hücreler değerlendirmeye alınmamalıdır.
5. Mikroskop incelemesi 40 veya 60'lık objektif kullanılarak yapılır [119].

3.6. Fotoğraflama

Fotoğraflama işlemi Olympus BX51 araştırma mikroskobuna bağlanabilen Olympus C 5050 Z dijital fotoğraf makinesi kullanılarak yapıldı. Fotoğraflama işleminde 100X objektif kullanıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

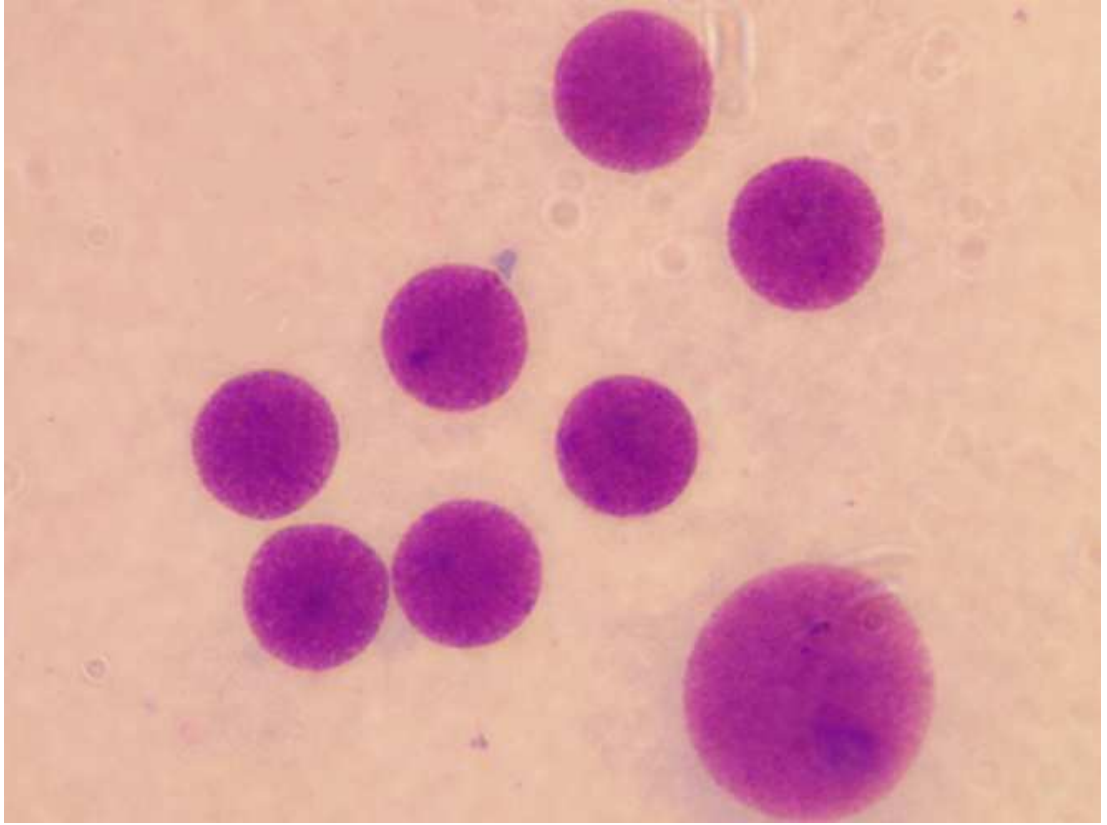
Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 10.0 bilgisayar yazılım programı kullanıldı. MI, RI ve MN üzerine *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının istatistiksel önemi tekrarlı ölçümlerde varyans analizi (ANOVA) kullanılarak belirlendi. Gruplar arasındaki farklılıklar LSD (Least Significant Differences) testi ile $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ önem derecesinde belirlendi.

4. BULGULAR

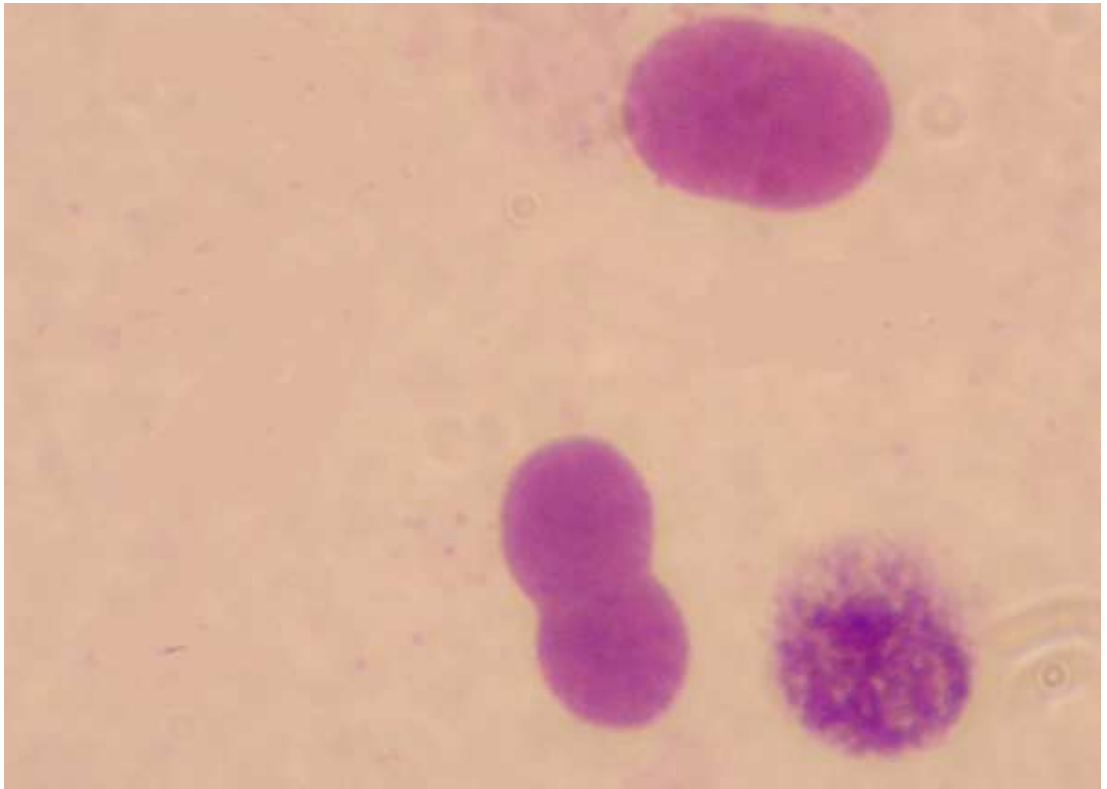
Türkiye’de doğal yayılış gösteren *H. heterophyllum* türünün genotoksik ve antikarsinojenik etkileri araştırıldı. Kültür ve çıkarım işlemlerinden sonra hazırlanan preparatlardan MI, RI ve MN oranları belirlendi. MI değerlendirilmesinde, preparatlardaki mitozda girmiş metafaz alanları sayıldı (Şekil 4.1.). Preparatlardaki toplam lenfosit hücre sayıları da belirlendi (Şekil 4.2.). Hücre ve metafaz sayıları değerlendirilerek sonuçlar % MI şeklinde elde edildi. RI değerlendirilmesinde, preparatlardaki mononükleat (Şekil 4.2.), binükleat (Şekil 4.3.) ve trinükleat hücreler (Şekil 4.4.) sayılarak RI verileri elde edildi. MN değerlendirilmesinde ise MN’lar (Şekil 4.5.) sayılarak toplam hücrelere oranlandı ve sonuçlar % MN şeklinde elde edildi.



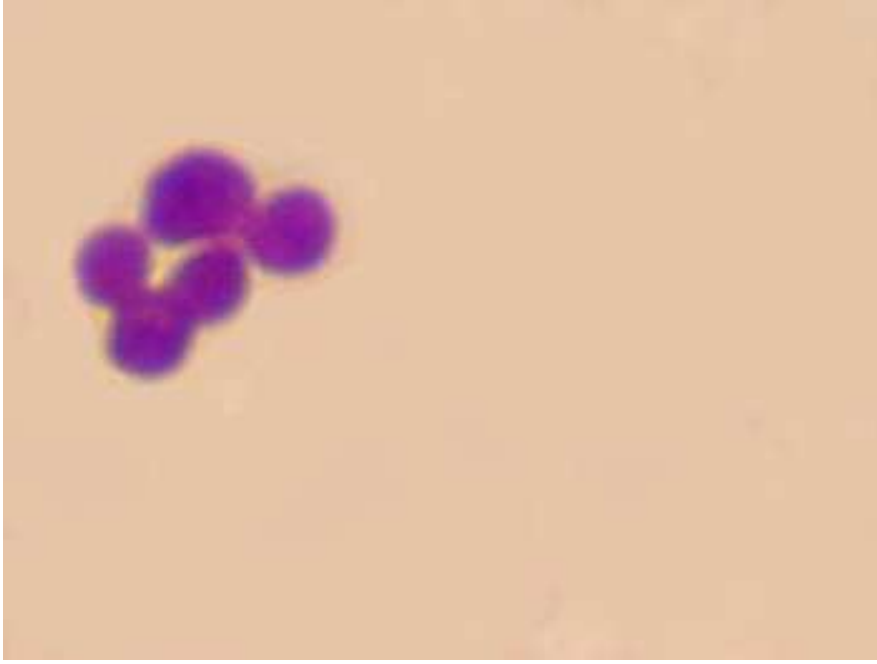
Şekil 4.1. Mitotik İndeks Değerlendirmesinde Kullanılan Metafaz Alanı



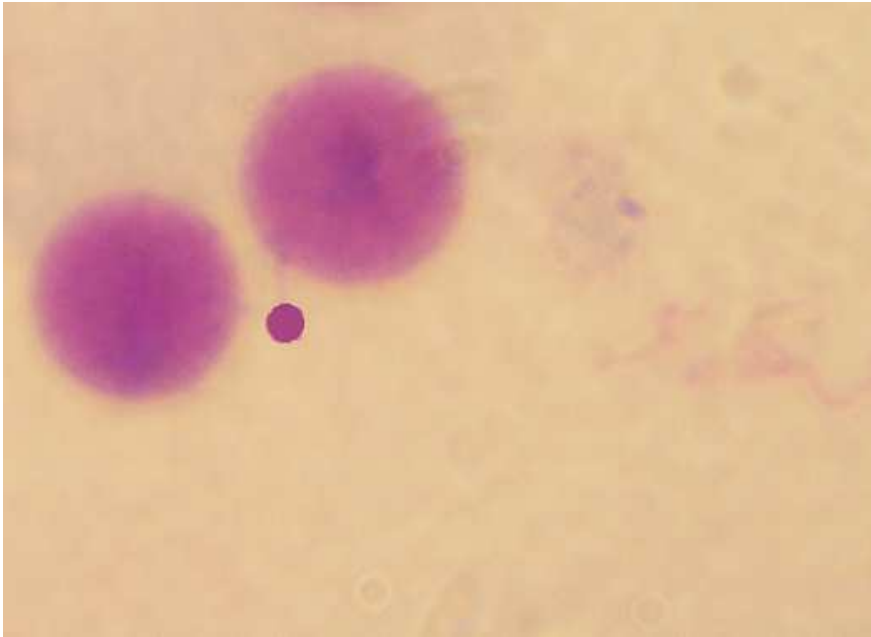
Şekil 4.2. Mononükleat Lenfosit Hücrelerinin Genel Görünümü



Şekil 4.3. Binükleat Lenfosit Hücrelerinin Genel Görünümü



Şekil 4.4. Trinükleat Lenfosit Hücrelerinin Genel Görünümü



Şekil 4.5. Lenfosit Hücresi Yanında Görülen Bir Mikronükleus

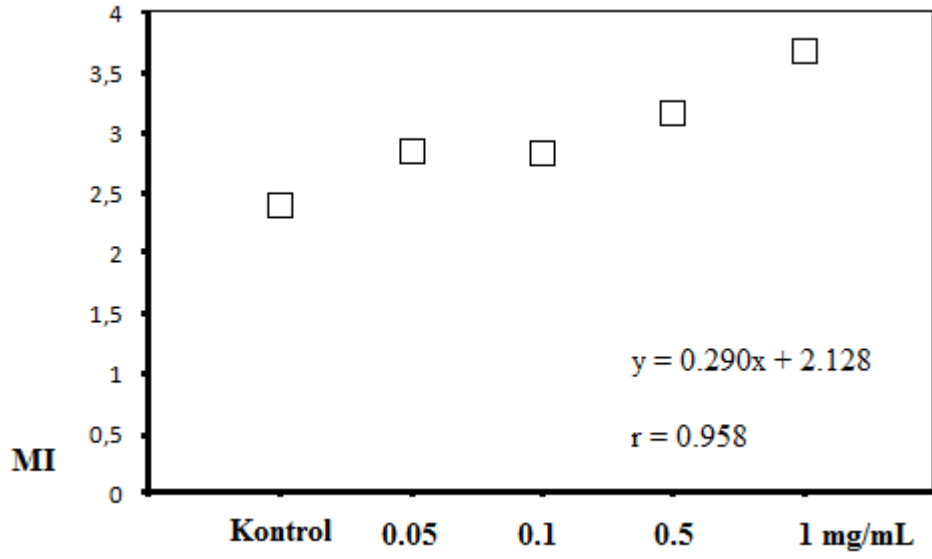
H. heterophyllum ekstraktı uygulanan lenfositlerdeki MI oranları % 2.41-3.70 arasında değişmektedir. Kontrol grubunun MI oranı % 2.41; *Hypericum* ekstraktlarının (0.05, 0.1, 0.5 ve 1 mg/mL) MI oranları ise sırasıyla % 2.86, 2.84, 3.18 ve 3.70 olarak bulunmuştur. MI oranı bakımından kontrol grubu ile 1 mg/mL'lik konsantrasyon arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$ ve $p<0.05$). Artan ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak MI oranlarında da artış meydana gelmiştir (Tablo 4.1.) ve konsantrasyonlar ile MI değerleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.958$). (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7)

Tablo 4.1. *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının mitotik indeks değerleri

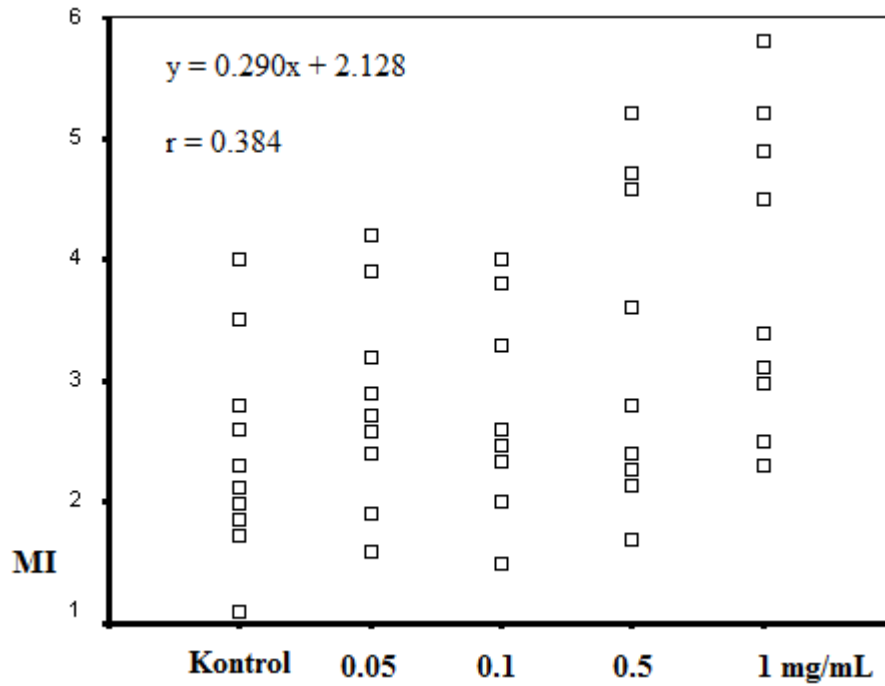
Denek		Dozlar (mg/mL)				
Cinsiyet	Yaş	Kontrol	0.05	0.1	0.5	1
Bayan	18	2.6	3.2	3.8	4.6	5.8
Bayan	25	2.1	2.6	2.6	2.4	3.4
Bayan	30	2.3	2.9	3.3	2.8	3.1
Bayan	40	1.8	3.2	2.4	3.6	4.5
Bayan	50	1.9	2.4	2.5	2.2	2.5
Erkek	22	4.0	4.2	4.0	5.2	5.2
Erkek	27	2.8	2.7	2.5	2.3	2.3
Erkek	38	3.5	3.9	3.8	4.7	4.9
Erkek	56	2.0	1.6	1.5	1.7	3.0
Erkek	73	1.1	1.9	2	2.3	2.3
MI (%)						
Ortalama ± SS		2.41 ± 0.86	2.86 ± 0.81	2.84 ± 0.84	3.18 ± 1.25	3.70 ± 1.29 *

* $p<0.05$, $p<0.01$

SS: Standart Sapma



Şekil 4.6. Artan *Hypericum heterophyllum* ekstrakt konsantrasyonları ve genel MI ortalamaları arasındaki pozitif korelasyon



Şekil 4.7. Artan *Hypericum heterophyllum* ekstrakt konsantrasyonları ve deneklerin MI değerleri arasındaki pozitif korelasyon

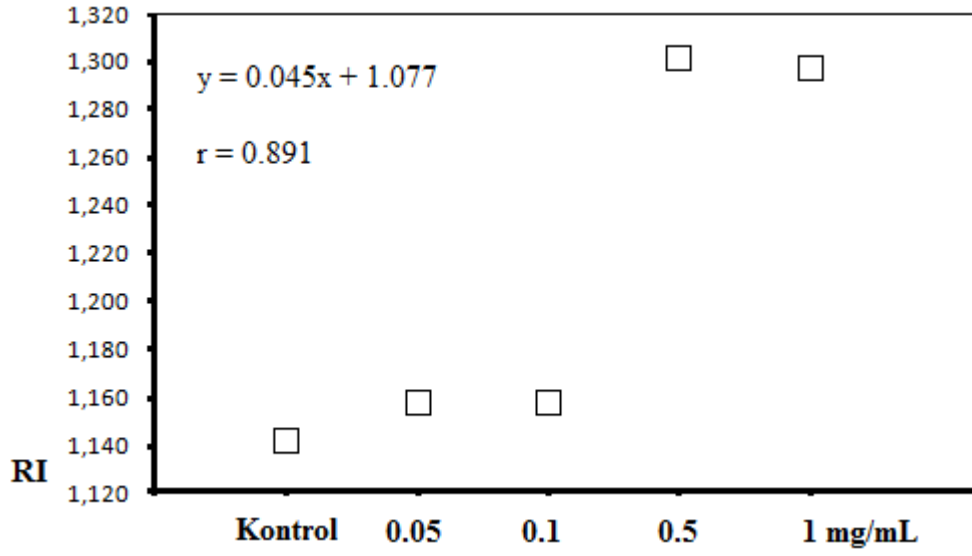
H. heterophyllum ekstraktı uygulanan lenfositlerdeki RI oranları 1.143-1.302 arasında değişmektedir. Kontrol grubunun RI oranı 1.143; *Hypericum* ekstraktlarının (0.05, 0.1, 0.5 ve 1 mg/mL) RI oranları ise sırasıyla 1.159, 1.159, 1.302 ve 1.298 olarak bulunmuştur. RI oranı bakımından kontrol grubu ile tüm konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca kontrol grubu ile 0.5 ve 1 mg/mL'lik konsantrasyonlar arasında da istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur ($p<0.01$). Artan ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak RI oranlarında da artış meydana gelmiştir (Tablo 4.2.) ve konsantrasyonlar ile RI değerleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.891$). (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

Tablo 4.2. *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının replikasyon indeksi değerleri

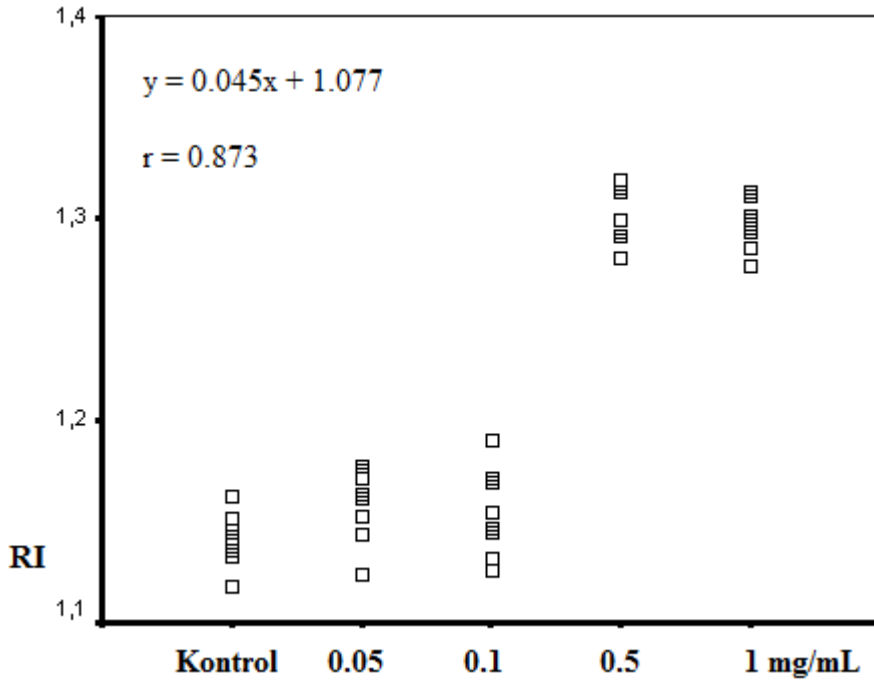
Denek		Dozlar (mg/mL)				
Cinsiyet	Yaş	Kontrol	0.05	0.1	0.5	1
Bayan	18	1.162	1.17	1.146	1.292	1.286
Bayan	25	1.150	1.174	1.168	1.312	1.312
Bayan	30	1.134	1.144	1.132	1.290	1.314
Bayan	40	1.136	1.170	1.190	1.312	1.310
Bayan	50	1.118	1.176	1.148	1.312	1.298
Erkek	22	1.142	1.164	1.172	1.314	1.294
Erkek	27	1.138	1.162	1.170	1.292	1.292
Erkek	38	1.162	1.160	1.190	1.318	1.300
Erkek	56	1.144	1.152	1.154	1.298	1.302
Erkek	73	1.148	1.124	1.128	1.280	1.276
RI						
Ortalama ± SS		1.143 ±	1.159 ±	1.159 ±	1.302 ±	1.298 ±
		0.013	0.015*	0.021*	0.013**	0.011**

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

SS: Standart Sapma



Şekil 4.8. Artan *Hypericum heterophyllum* ekstrakt konsantrasyonları ve genel RI ortalamaları arasındaki pozitif korelasyon



Şekil 4.9. Artan *Hypericum heterophyllum* ekstrakt konsantrasyonları ve deneklerin RI değerleri arasındaki pozitif korelasyon

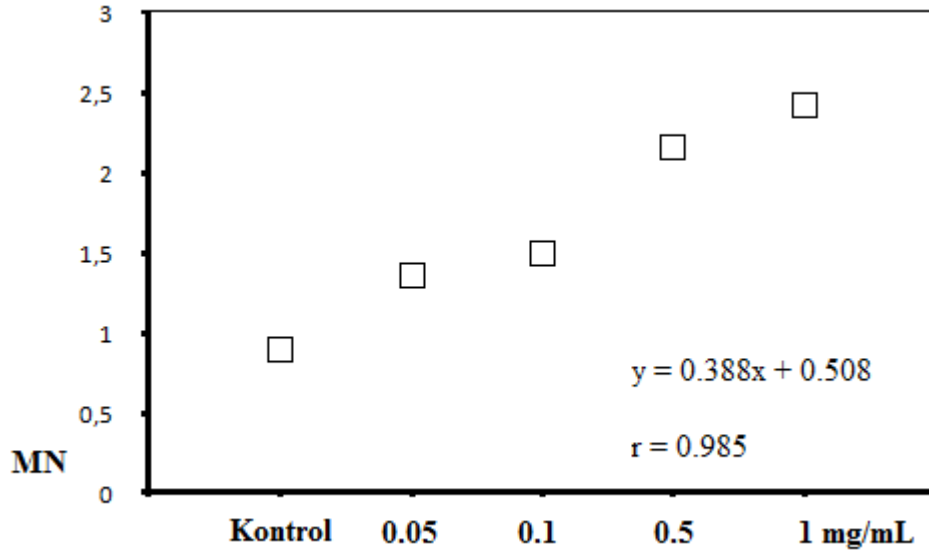
H. heterophyllum ekstraktı uygulanan lenfositlerdeki MN oranları % 0.90-2.44 arasında değişmektedir. Kontrol grubunun MN oranı % 0.90; *Hypericum* ekstraktlarının (0.05, 0.1, 0.5 ve 1 mg/mL) MN oranları ise sırasıyla % 1.36, 1.50, 2.16 ve 2.44 olarak bulunmuştur. MN oranı bakımından kontrol grubu ile tüm konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (p<0.05). Ayrıca kontrol grubu ile 0.1, 0.5 ve 1 mg/mL'lik konsantrasyonlar arasında da istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (p<0.01). Artan ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak MN oranlarında da artış meydana gelmiştir (Tablo 4.3.) ve konsantrasyonlar ile MN değerleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir (r = 0.985). (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).

Tablo 4.3. *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının mikronükleus değerleri

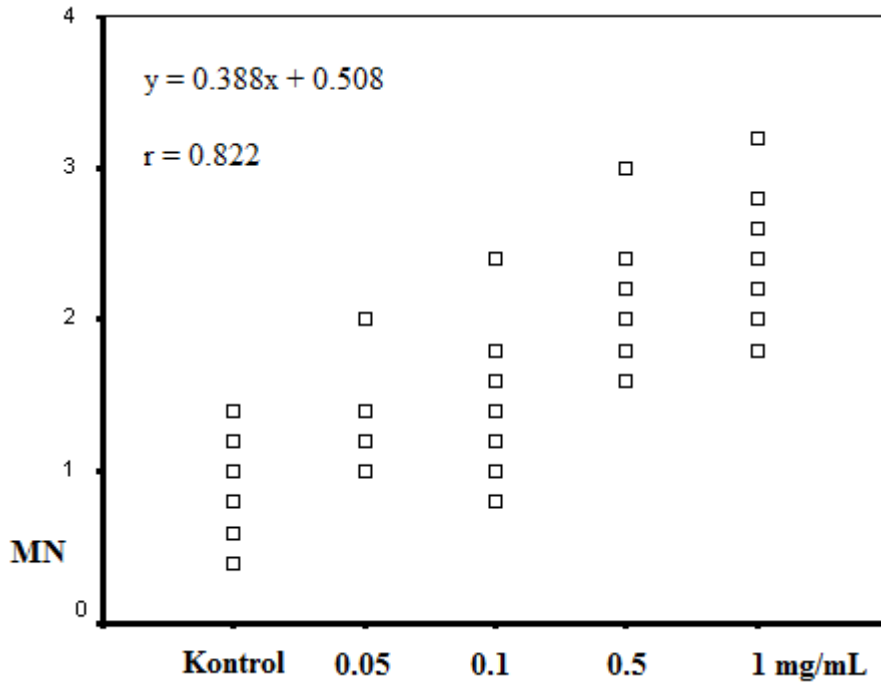
Denek		Dozlar (mg/mL)				
Cinsiyet	Yaş	Kontrol	0.05	0.1	0.5	1
Bayan	18	0.8	1.4	1.4	2.4	2.4
Bayan	25	0.8	1.2	1.6	2.2	2.0
Bayan	30	1.0	1.4	1.6	2.2	2.6
Bayan	40	1.0	1.2	1.2	1.6	2.4
Bayan	50	1.4	2.0	2.4	3.0	3.2
Erkek	22	0.4	1.0	0.8	1.8	1.8
Erkek	27	0.6	1.0	1.4	2.0	2.2
Erkek	38	0.6	1.2	1.0	1.8	2.4
Erkek	56	1.2	1.2	1.8	2.4	2.8
Erkek	73	1.2	2.0	1.8	2.2	2.6
MN (%)						
Ortalama ± SS		0.90 ± 0.32	1.36 ± 0.36 *	1.50 ± 0.45**	2.16 ± 0.40**	2.44 ± 0.40**

* p<0.05, ** p<0.01

SS: Standart Sapma

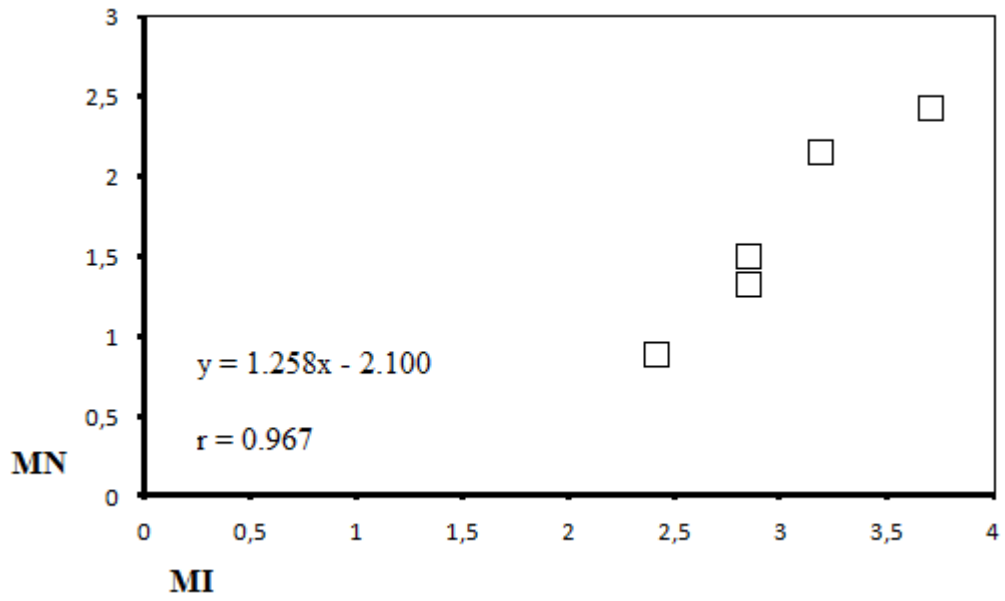


Şekil 4.10. Artan *Hypericum heterophyllum* ekstrakt konsantrasyonları ve genel MN ortalamaları arasındaki pozitif korelasyon

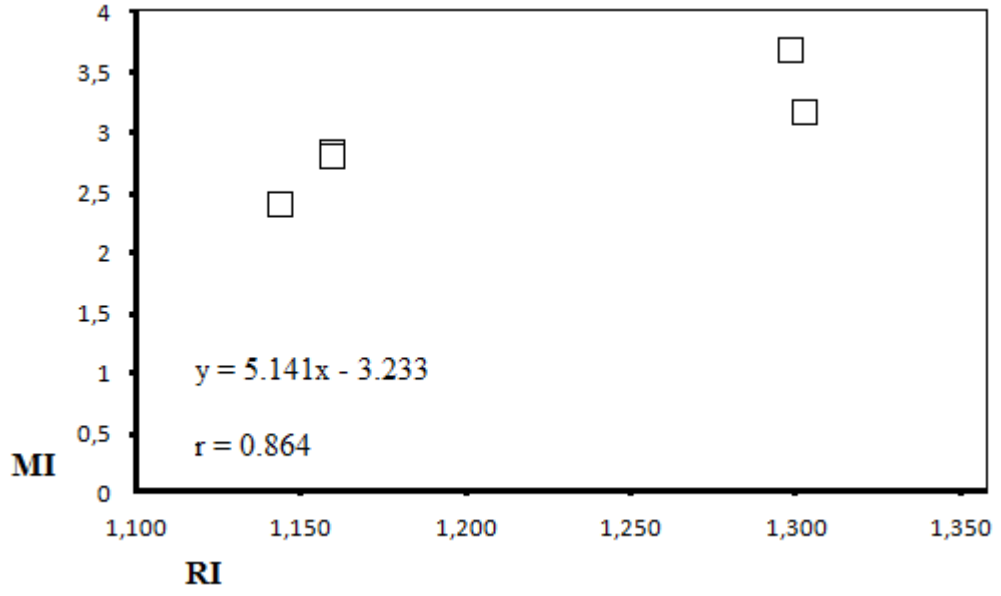


Şekil 4.11. Artan *Hypericum heterophyllum* ekstrakt konsantrasyonları ve deneklerin MN değerleri arasındaki pozitif korelasyon

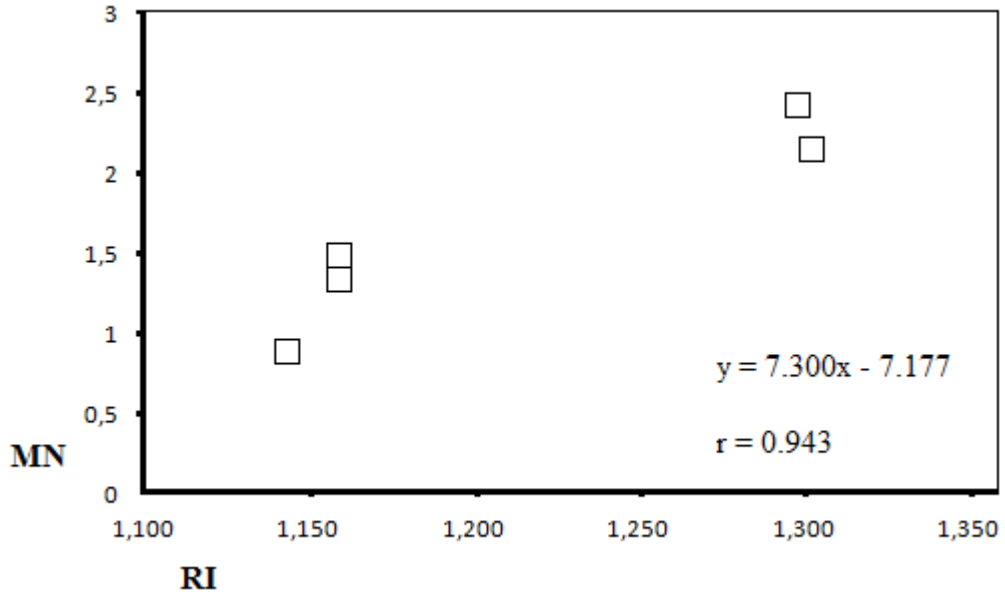
Artan ekstrakt konsantrasyonlarına paralel olarak MI, RI ve MN oranları da artış gösterdiğinden dolayı, üç parametre kendi arasında da pozitif korelasyon göstermiştir. En güçlü pozitif korelasyon MI ve MN arasında gözlenmiştir ($r = 0.967$) (Şekil 4.12). En zayıf pozitif korelasyon ise MI ve RI oranları arasında gözlenmiştir (0.864) (Şekil 4.13). MN ve RI arasındaki korelasyonun derecesi ise diğerlerinin arasında yer almıştır (0.943) (Şekil 4.14).



Şekil 4.12. MI ve MN değerleri arasındaki pozitif korelasyon

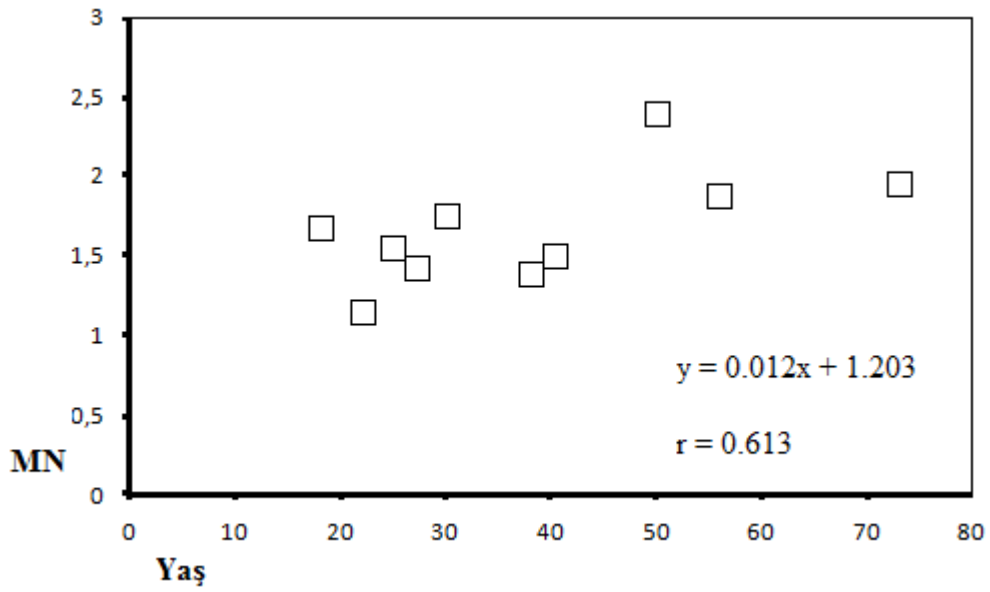


Şekil 4.13. RI ve MI değerleri arasındaki pozitif korelasyon

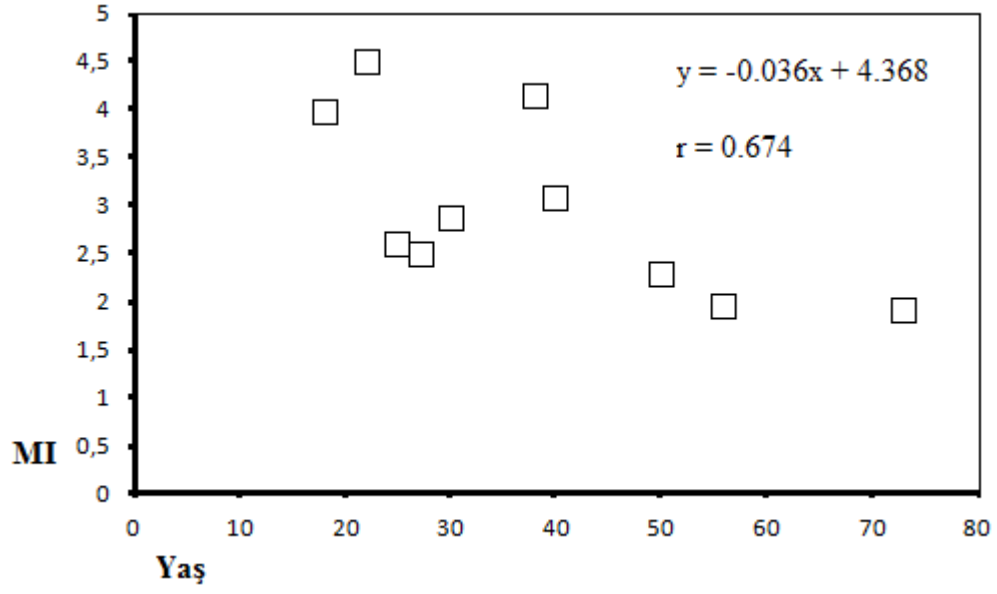


Şekil 4.14. RI ve MN değerleri arasındaki pozitif korelasyon

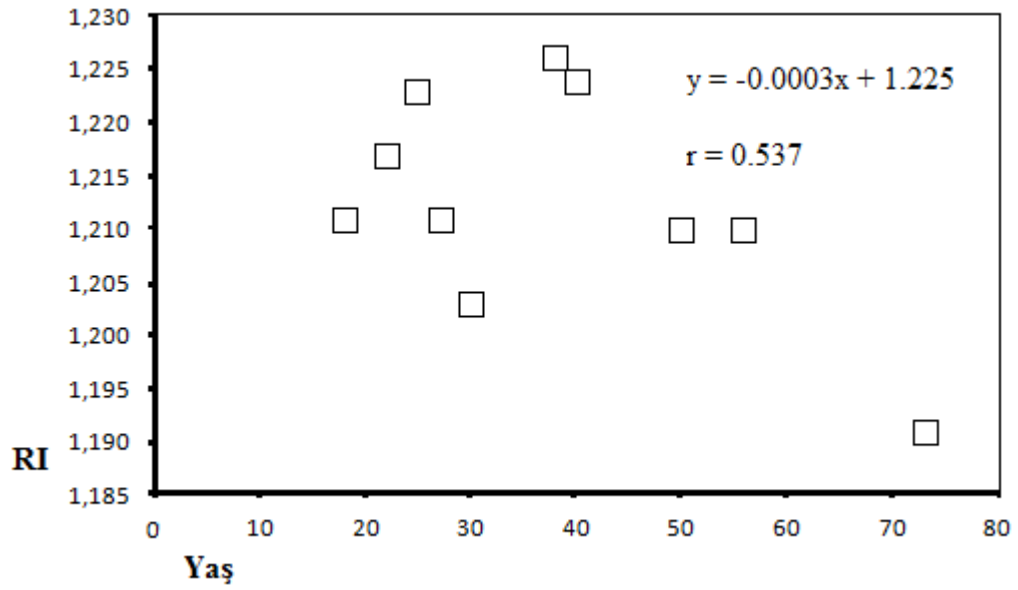
Yaşa bağılı olarak parametrelerdeki değişimler göz önüne alındığında, MN ile yaş arasında pozitif bir korelasyon gözleendiği halde, MI-Yaş ve RI-Yaş arasında negatif korelasyonlar gözlenmiştir. Deneklerin yaşlarının artışına paralel olarak MN ortalamaları da artış göstermiştir ($r = 0.613$) (Şekil 4.15). Aksine deneklerin yaşlarının artışına zıt olarak MI ve RI ortalamaları azalma göstermiştir. MI ve yaş arasındaki negatif korelasyon ($r = 0.674$), RI ve yaş arasındaki negatif korelasyona göre ($r = 0.537$) daha kuvvetlidir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



Şekil 4.15. MN değerleri ve yaş arasındaki pozitif korelasyon.

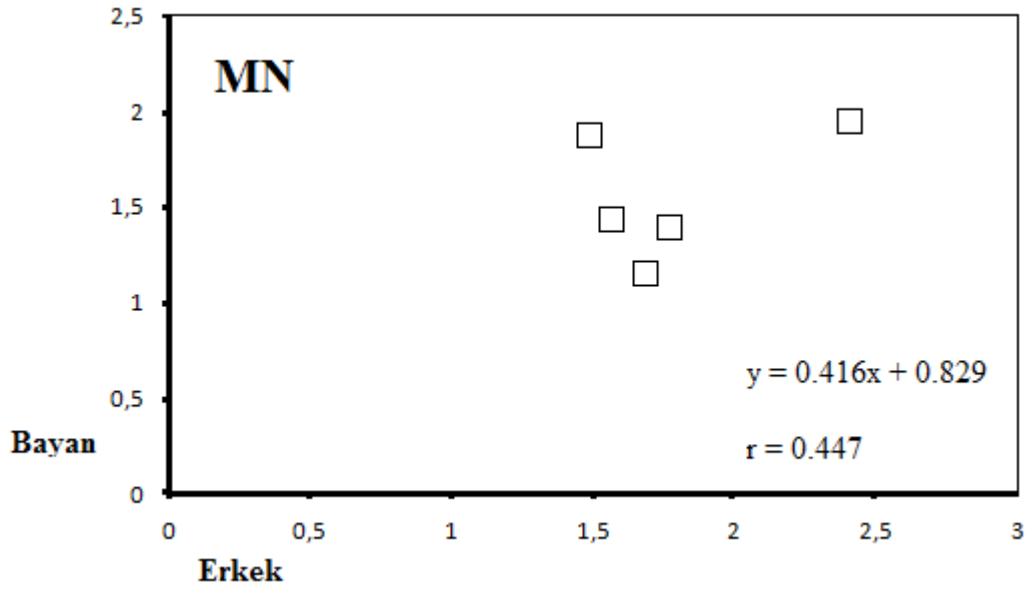


Şekil 4.16. MI değerleri ve yaş arasındaki negatif korelasyon.

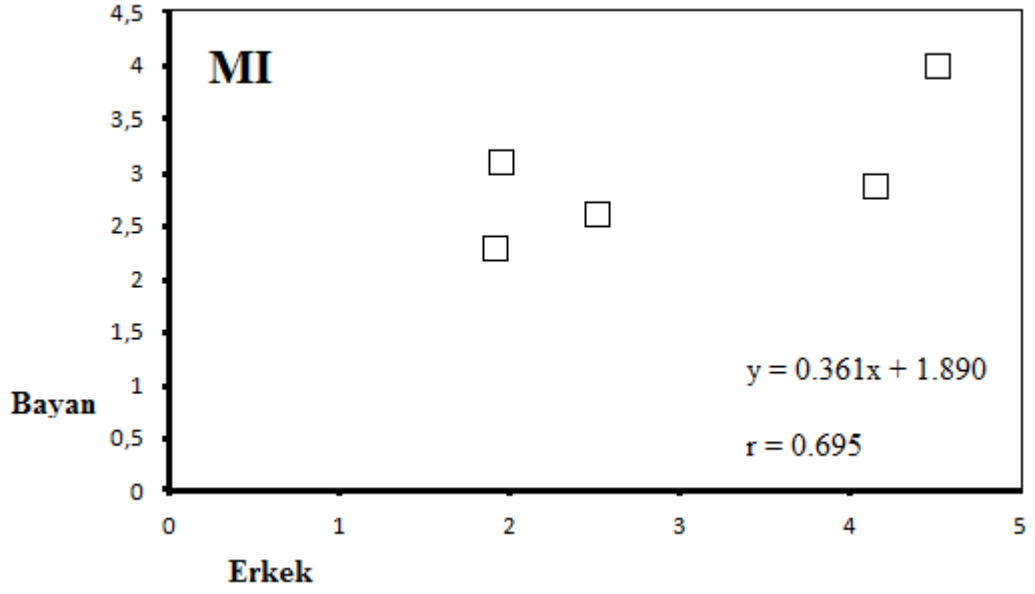


Şekil 4.17. RI değerleri ve yaş arasındaki negatif korelasyon.

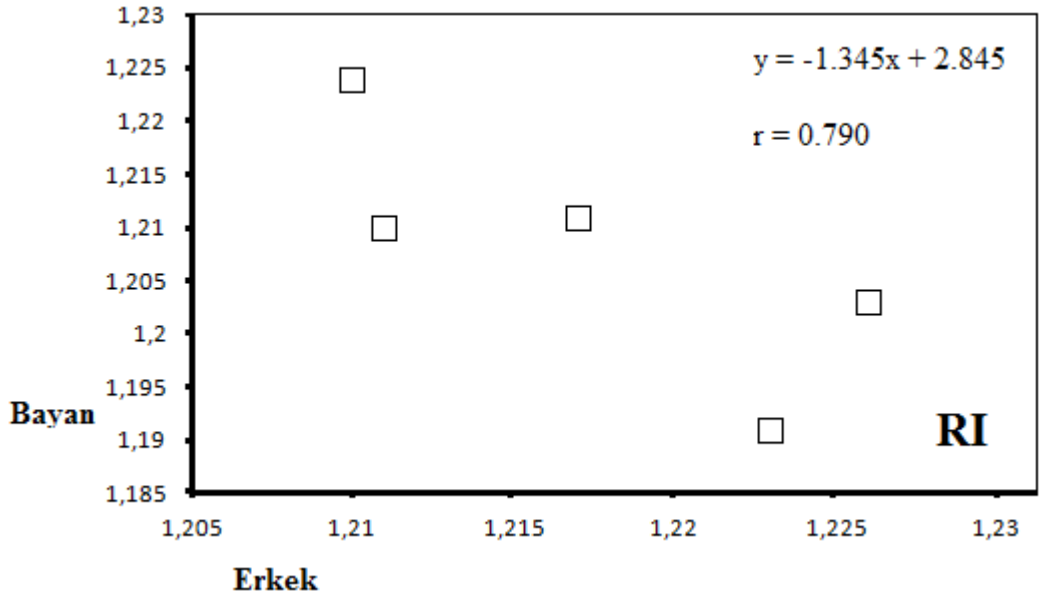
Cinsiyete bağlı olarak parametrelerdeki değişimler göz önüne alındığında, MN verileri bakımından bayanlar ve erkekler arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.447$) (Şekil 4.18). Aynı şekilde MI verileri bakımından da bayanlar ve erkekler arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.695$) (Şekil 4.19). MN ve MI verilerinin aksine, RI bakımından bayanlar ve erkekler arasında korelasyon negatif yöndedir ($r = 0.790$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.18. MN değerleri bakımından bayanlar ve erkekler arasındaki pozitif korelasyon.



Şekil 4.19. MI değerleri bakımından bayanlar ve erkekler arasındaki pozitif korelasyon.



Şekil 4.20. RI değerleri bakımından bayanlar ve erkekler arasındaki negatif korelasyon.

5. TARTIŞMA – SONUÇ VE ÖNERİLER

Çevremizde biyolojik etkileri bilinmeyen ve sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal madde bulunmaktadır [120,121]. Teknolojinin gelişmesiyle tüm canlılar günlük yaşamda sık sık bu doğal ya da yapay kimyasal maddelerle yüz yüze gelmektedir. İnsan popülasyonunu çevredeki kanserojen ve mutajen maddelerin etkisinden korunması için bu özelliğe sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin değerlendirilmesi gereklidir [71,122]. Fiziksel ve kimyasal etmenlerin canlılar üzerindeki zararlı etkileri araştırmacıların son derece ilgisini çekmektedir. Toksik, mutajenik, kanserojenik veya teratojenik etkili olabilen bu etmenlerin zararlarını tespit etmek ve önlemler almak gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli testler geliştirilmiştir. Fiziksel ve kimyasal maddelerin DNA üzerindeki etkilerini görmek için *in vivo* ve *in vitro* testler kullanılır [73,123].

Yapılan araştırmalar, çevremizde sayıları her geçen gün artan çeşitli kimyasal maddelerin küçük miktarlarının bile genotoksik, mutajenik veya karsinojenik olabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır [44,46]. Bu nedenle, bu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan fiziksel ve kimyasal ajanların başlıca insan genomu için mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olup olmadıklarının ortaya çıkarılması son derece önemlidir. Çünkü genetik toksisite testlerinde alınan pozitif sonuçlar mutajenik olan birçok maddenin aynı zamanda karsinojenik de olduğunu göstermektedir [101]. Genotoksik ve mutajenik etkiye doğal ürünler üzerinde de rastlanabilmektedir. Bu nedenlerle son yıllarda yapılan araştırmalar gerek doğal, gerekse insanlar tarafından üretilen bazı kimyasal maddelerin hem kimyasal yapılarını hem de mutajenik etkilerini belirleyici nitelikte olmuştur [71,124-126].

Çeşitli bitkilerden elde edilen ekstraktlar; farklı biyolojik aktivitelerinden dolayı, aromaterapide, kozmatikte, gıda üretiminde, ilaç sanayisinde ve ev ürünleri (deterjanlar, sabunlar, böcek ilaçları) yapımında oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu maddelerin söz konusu biyolojik aktiviteleri arasında antibakteriyal, antifungal ve antioksidan etkiler ilk sırada yer alırlar [127]. Tüketimi çoğu kez kontrolsüz ve bilinçsiz yapılabilen bu bileşiklerin özellikle insan üzerinde yapabileceği akut toksik ve daha ileri boyuttaki genotoksik etkiler çok iyi

bilinmemektedir [56]. Bitkilerden elde edilen bu ekstraktlarda bulunan bazı bileşikler, sitotoksik, mutajenik veya antimutajenik etkiye sahiptir [50,51] ve bu özelliklerinden dolayı da bitki ekstraktları ile birçok sitogenetik çalışma yapılmıştır ve muhtemelen yapılmaya da devam edilecektir. Bitkilerle tedavi tüm dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılmakta ancak tedavi amacıyla kullanılan bu droglar bazen çok ciddi sağlık sorunlarına da yol açabilmektedir [128].

Buna dayanarak bu çalışmada *H. heterophyllum* türünün çeşitli dozlarının insan periferik kan lenfositlerinde sitogenetik harabiyete sebep olup olmadığına MN, MI ve RI'e bakılarak araştırıldı.

MI yeterli hücre proliferasyonu ve sitotoksisiteyi göstermek için kullanılan indikatör bir testtir. MI'deki bir azalma hücre döngüsündeki bir inhibisyonu ve hücrenin proliferasyon kapasitesindeki bir kaybı yansıtır. MI, hücre siklusunda metafazdaki hücre yüzdesini verir. Bu test bazı kimyasalların hücrelerdeki etki mekanizması hakkında önemli bilgiler de vermektedir [101]. Amorim ve arkadaşları çalışmalarında sitotoksisite derecesinin tespit edilmesinin, uygun preparasyon zamanını ve test konsantrasyonlarını seçmek için gerekli olduğunu ve özellikle sonuçların insanların maruz kalabileceği bileşiklerin risk değerlendirmesi için kullanıldığında önem taşıdığını bildirmişlerdir. MI değerlerinin konsantrasyona bağlı olarak paralel azalması, test edilen kimyasalın sitotoksik etki gösterdiği anlamına gelmektedir [128].

H. heterophyllum MI oranına göre değerlendirildiği zaman artan ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak MI oranlarında artış meydana gelmiştir (Tablo 4.1) ve konsantrasyonlar ile MI değerleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.958$). RI sonuçları da MI sonuçları ile paralellik göstermektedir. Artan ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak RI oranlarında artış meydana gelmiştir (Tablo 4.2) ve konsantrasyonlar ile RI değerleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.891$). MI ve RI sonuçlarımıza göre *H. heterophyllum* türünün sitotoksik etkiye sahip olabileceğini söyleyebiliriz. Bunun nedeni ilk hücre bölünmesinde birçok hücrenin apoptoz veya nekroza girmeden canlı kalması veya kontrol edilemeyen hücre çoğalması olabilir. MI ve RI oranlarındaki artışlara dayanarak, yüksek

konsantrasyonlardaki *H. heterophyllum* ekstraktlarının karsinojen etki gösterebileceğini söyleyebiliriz.

MI ile yaş arasında ($r = -0.674$) ve RI ile yaş arasında ($r = -0.537$) negatif korelasyonlar gözlemlendi. İlerleyen yaşlara bağlı olarak MI ve RI oranlarındaki azalmalar bazı faktörlerin ortak etkileri ile açıklanabilir. Birincisi hücre döngüsü kontrol noktası ve DNA tamiri ile ilgili genlerdeki mutasyonların ortak etkileri. İkincisi endojen genotoksinler, yetersiz beslenme, çevresel veya mesleki genotoksinlere maruz kalma ve sağlıksız yaşam tarzı faktörleridir [129]. Pastor ve arkadaşları da çalışmalarında RI ve yaş arasında negatif bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir [130]. Walker çalışmasında ilerleyen yaşa bağlı olarak MI oranında azalma olacağını belirtmiştir [131].

Bayanların MI ve RI oranları erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni bayanlarda bir fazla bulunan X kromozomu veya bayanlardaki MN oranlarının erkeklerden daha yüksek olmasından kaynaklanabilir. İki farklı çalışmada bu durum rapor edilmiştir [132,91].

İnsanlar günlük yaşamlarında veya çalışma ortamlarında genotoksik ajanların mutajenik ve karsinojenik etkileri ile karşılaşmaktadırlar. Gelişen teknoloji ile birlikte üretilen yeni kimyasallar, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, tarım ilaçları ve çevreye verilen atıklar canlıların genetik yapısında mutasyon oluşturma ihtimalini taşımaktadırlar. Bu nedenle genotoksik, mutajenik ve karsinojenik maddelerin etkilerinin araştırılması önem kazanmıştır. Genotoksik ve mutajenik etkiye doğal ürünler üzerinde de rastlanabilmektedir. Buna dayanarak bu çalışmada *H. heterophyllum* ekstraktlarının MN oranları üzerindeki etkileri araştırıldı. Mutajenik, karsinojenik ve klastojenik etkisi olan ajanların MN oranını arttırdığı, antioksidan özellik gösteren ajanların da MN oranını azalttığı bilinmektedir [66]. Literatürde MN oranını etkileyen birçok faktörden bahsedilmektedir. Yaş, cinsiyet, sigara ve alkol tüketimi, viral enfeksiyon, X ışınları gibi [133]. Çalışmamızda kullanılan kanlar, alkol ve sigara kullanmayan, sağlıklı (herhangi bir viral enfeksiyonu bulunmayan) bireylerden alınmıştır. Böylece genotoksik etkiyi arttırabilecek bu etmenlerin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır.

H. heterophyllum MN oranına göre değerlendirildiği zaman artan ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak MN oranlarında da artış meydana gelmiştir ve konsantrasyonlar ile MN değerleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.985$). MN oranlarını arttırıcı etki gösteren *H. heterophyllum* ekstraktlarının DNA'da çapraz bağlar yapmış olabileceği düşünülebilir. DNA'da oluşan çapraz bağlar, muhtemelen daha çok MN oluşumundan sorumludurlar [111].

MN ve yaş arasında ($r = 0.613$) pozitif korelasyonlar gözlemlendi. İlerleyen yaşlara bağlı olarak MN oranlarındaki artışlar, MI ve RI oranlarını azaltan ve yukarıda açıkladığımız bazı faktörlerin ortak etkileri ile açıklanabilir. MN ve yaş arasındaki pozitif korelasyon birçok çalışmada rapor edilmiştir [134,135].

Bayanların ve erkeklerin MN oranları arasında orta derecede bir pozitif korelasyon gözlemlendi ($r = 0.447$). Bayanların MN oranları erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur. Fenech ve Morley'in çalışmalarında kadınlar ve erkekler MN oranı açısından karşılaştırıldığında, yaş ve MN oranı arasındaki ilişki kadınlarda erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur [136].

Sonuç olarak; ülkemizde geleneksel halk tıbbında kullanılan *H. heterophyllum* ekstraktlarının karsinojen ve genotoksik özellikler gösterdiği söylenebilir. *H. heterophyllum* genotoksik etkiler gösterse de bu etkiler yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkmaktadır. Yinede bu türün tüketilmesinde aşırı konsantrasyondan kaçınmanın faydalı olacağı söylenebilir. Diğer taraftan *H. heterophyllum*'un kimyasal yapısında birçok kimyasal bulunmaktadır. Türün gösterdiği karsinojenik ve genotoksik etkilerin hangi kimyasal bileşiklerden ileri geldiğinin araştırılması da önemli bir konudur. Bir türün yapısındaki kimyasalların izole edilerek tek tek sitogenetik testlere tabi tutulması, türün sitogenetik etkilerinin içeriğindeki hangi maddeden veya maddelerden kaynaklandığına dair bilgiler verebilir. Karsinojen veya genotoksik özellikler *H. heterophyllum*'un kimyasal yapısındaki bir veya birden fazla maddenin sinerjistik etkilerinden dolayı ortaya çıkmış olabilir. Bu durum daha ileri çalışmalar için yeni araştırma konuları oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Dimayuga, R.E., Garcia, S.K., Antimicrobial Screening of Medicinal Plants from Baja California Sur, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 31, Issue 2, Pages 181-192, February 1991.
2. Baydar, H., Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tarla Bitkileri Bölümü, no 51, Isparta, 2007.
3. Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, no 3255, İstanbul, 1984.
4. Robisch, G., et al., Aristolochic Acid is a Direct Mutagen in *Salmonella Typhimurium*. *Mutat. Res.*, 105 (4), 201-204, 1982.
5. Schimmer, O., et al., An Evaluation of 55 Commercial Plant Extracts in the Ames Mutagenicity Test., *Pharmazie*, 49, 448-451, 1994.
6. Sevimli, A., Bazı *Hypericum* Türlerinin Antibakteriyal Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 2006.
7. Özgür, K., İn Vitro Şartlarda Yetiştirilen *Hypericum triquetrifolium* Turra. (*Guttiferae*)’ nın Total Hiperisin İçeriğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 2005.
8. Boydağ, I., Üç *Origanum* Türü (*O. majorana* L., *O. minutiflorum*, *O. Schwarz* and *P. H. Davis* ve *O. Onites* L.) Uçucu Yağlarının Fraksiyonlu Distilasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 1996.
9. Sakar, M.K., ve ark., Antimicrobial Activities of Some *Hypericum* Species Growing in Turkey, *Fitoterapia*, 59, 49-52, 1988.
10. Kako, M.D., Al-Sultan IISaleem A.N., Studies of Sheep Experimentally Poisoned with *Hypericum perforatum*, *Veterinary and Human Toxicology*, 35(4), 298-300, 1993.
11. Kumper, H., *Hypericum* Poisoning in Sheep, *Tierarztl*, 17(3), 257-261, 1989.
12. Yazaki, K., Okuda, T., Procyanins in Callus and Multiple Shoots of *Hypericum erectum*, *Planta Med.*, 56, 490-491, 1990.
13. Ishiguro, K., Nagareya, N., Fukumoto, H., A Phloroglucinol Derivative From Cell Suspension Cultures of *Hypericum patulum*, *Phytochemistry*, 47, 1041- 1043, 1998.

14. Dias, A.C.P., et al., Unusual Flavanoids Produced by Callus of *Hypericum perforatum*, *Phytochemistry*, 48, 1165-1168, 1998.
15. Holzl, J., Ostrowski, E., St. John's Wort HPLC Analysis of Main Components and Their Variability in the Populations, *Deutschland Apothekertz*, 127, 1227-1230, 1987.
16. Fornasiero, R.B., Fluorides Effects on *Hypericum perforatum* Plants: First Field Observations, *Plant Sci.*, 165, 507-513, 2003.
17. Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1988.
18. Okpanyi, S.N., Weischer, M.L., Animal Experiments on the Psychotropic Action of a Hypericum Extract, *Arzneimittelforschung Drog Research*, 37 (1), 10-13, 1990.
19. Jhonson, D., et al., Effects of Hypericum Extract LI 160 Compared with Maprotiline on Resting EEG and Evoked Potentials in 24 Volunteers, *J. Geriatr Psychiatry Neurol*, 7 Suppl 1S, 44-46, 1994.
20. Hubner, W.D., Lande, S., Podzuweit, H., *Hypericum* Treatment of Mild Depression with Somatic Symptoms, *J. Geriatr Psychiatry Neurol*, 7 Suppl 1S, 12-14, 1994.
21. Linde, K., et al., St. John's Wort for Depression an Overview and Meta-analysis of Randomised Clinical Trials, *BMJ (Clinical Researchc Ed.)*, 313 (7052), 253-258, 1996.
22. Witte, B., et al., Treatment of Depressive Symptoms with a High Concentration Hypericum Preparation. A Multicenter Placebo-Controlled Double –Blind Study, *Fortschritte Der Medizin*, 113 (28), 404-408, 1995.
23. Sommer, H., Harrer, G., Placebo-Controlled Double–Blind Study Examining the Effectiveness of an Hypericum Preparation in 105 Mildly Depressed Patients, *J. Geriatr Psychiatry Neurol*, 7 Suppl, 1S, 9-11, 1994.
24. Decosterd, L., et al., A new Antifungal Chromene and a Related Dichromene from *Hypericum revolutum*, *Planta Med.*, 55, 429, 1986.
25. Ishiguro, K., Yamaki, M., Takagi, S., Sarothralen A and B, New Antibiotic Compounds from *Hypericum japonicum*, *Planta Med.* 52, 288-290, 1986.
26. Jacobson, M.J., et al., Pharmacokinetics, Safety and Antiviral Effects of Hypericin, a Derivative of St. John' s Wort Plant, in Patientswith Chronic Hepatitis C Virus Infections, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 517-524, 2001.

27. Jayasuriya, H., et al., Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Rottlerin-type Compounds from *Hypericum drumandii*, J. Natural Product, 52(2), 325-331, 1989.
28. Bennet, J.G., Lee, H.H., Xanthonenes from Guttiferae, Phytochemistry, 28, 967-998, 1989.
29. Rocha, L., et al., An Antifungal Gamma-pyrone and Xanthonenes with MAO Inhibitory Activity from *Hypericum brasiliense*, Phytochemistry, 36(6), 1381-1385, 1994.
30. Jayasuriya, H., et al., Synthesis and the Biological Evaluation of the Structural Units of Drummondin, Pharmaceutic Research, 8(11), 1372-1376, 1991.
31. Karamanoğlu, K., Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Bitkilerin Sinonimleriyle Birlikte Yetiştığı Yerler ve Genel Yayılma Alanları, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Cilt 1, Ankara, 1974.
32. Toker, Z., Bazı *Hypericum* Türlerinin Uçucu Yağ Bileşenleri ve Bu Yağların Antimikrobiyal Aktiviteleri, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 2002.
33. Yaltırık, F., Efe, A., Otsu Bitkiler Sistematığı, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1989.
34. Davis, P. H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands vol.5. Edinburgh University Press, 890 s, Edinburgh, 1966.
35. Hamzaoğlu, E., Dinek Dağı Step Vegetasyonu (Kırıkkale). G.U. Fen Bilimleri Dergisi, 18 (1):1-15, 2005.
36. <http://www.gwannon.com/?species=hypericum+heterophyllum>
37. Tanker, N., Gürtürk, S., Kol, Ü., Antibiyotik Aktivite Gösteren Bazı Tohumlu Bitkiler Üzerinde Araştırmalar, Ankara Eczacılık Fakültesi, Mec., 10, 17, 1980.
38. Ünal, E., Türkiye Florasında Doğal Olarak Yetişen Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 2006.
39. Alessandra, B., Cüneyt, Ç., Jaime, T., *Hypericum* Species as Sources of Valuable Essential Oils, Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, Global Science Books, 2011.
40. Ergun, B., Toksikoloji, Besin Güvenliği ve Çevre Sağlığı Kitabı, Anadolu Üniversitesi Yayınları.

41. Millioğlu, Ö., Elektrolize Suyun *Vicia faba* L. Üzerine Genotoksik Etkisinin Kontrolü, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gebze, 2006.
42. Hodgson, E., Introduction to Toxicology (Chapter 1), In: Hodgson, E. (ed.), A Textbook of Modern Toxicology, s. 3-12, John Wiley & Sons, Inc., USA, 2004.
43. Arpat, Ç., İlaç Endüstrisinde İnsan Sağlığı Açısından Tehlikeli Maddelerin Risk Değerlendirmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Ocak 2007.
44. Vural, N., Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, no 73, Ankara, 2005.
45. Spector, W.S., Handbook of Toxicology, Vol.I, Saunders Co., Philadelphia, 1956.
46. Dökmeci, I., Akut Zehirlenmelerinde Tanı ve Tedavi, Toksikoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 547-588, İstanbul, 1994.
47. Emerit, I., Khan, S.H., Cerutti, P., Treatment Oflymphocyte Cultures with Hpoxanthine Xanthine Oxidase System İnduces the Formation of Transferable Clastogenic Material, Free Radical Biol. Med., 1, 51-57, 1985.
48. Jagetia, G.C., et al., Evaluation of Micronuclei Frequency in the Cultured Peripheral Blood Lymphocytes of Cancer Patients Before and After Radiation Treatment, Mutat. Res., 491, 9-16, 2001.
49. Muranlı, F.D., Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, 2006.
50. Eliana, A.V., et al., Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* Measured by the *Salmonella*/microsome Assay and Chromosomal Aberrations in CHO cells, J. Ethnopharm, 81, 257-264, 2002.
51. Murugan, S.S., Balakrishnamurthy, P., Mathew, Y.J., Antimutagenic Effect of Broccoli Flower Head by the Ames *Salmonella* Reverse Mutation Assay, Phytother. Res., 21(6), 545 – 547, 2007.
52. Gomez-Arroyo, S., et al., Cytogenetic Biomonitoring in a Mexican Floriculture Worker Group Exposed to Pesticides, Mutat. Res., 466, 117-124, 2000.
53. Monarca, S., et al., Monitoring Airborne Genotoxicants in the Rubber Industry Using Genotoxicity Tests and Chemical Analyses, Mutat. Res., 490, 159-169, 2001.

54. Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J., Genotoxic Effects of Styrene- 7,8-oxide in Human White Blood Cells: Comet Assay in Relation to the Induction of Sister-Chromatid Exchanges and Micronuclei, *Mutat. Res.*, 491, 163-172, 2001.
55. Griffiths, A.J.F., et al., *An Introduction to Genetic Analysis*, W.H. Freeman and Company, New York, USA, 1996.
56. Kılıç, A., Bitkisel Kaynaklı Bazı Uçucu Yağ ve Monoterpenlerin Olası Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 2005.
57. Zor, D.L., *Kanserojenik, Mutajenik ve Teratojenik Kimyasallar*, Anadolu Üniversitesi, Açık Öğretim Fakültesi, s. 399-434.
58. Bedir, B., ve ark., DNA Hasarı Analizinde μ - FADU ve Comet Yöntemlerinin Karşılaştırılması, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3): 97-103, 2004.
59. Choy, W.N., *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*, Marcel Dekker, 29-187, New York, 2001.
60. Zeiger, E., History and Rationale of Genetic Toxicology Testing: An Impersonal, and Sometimes Personal, *Environ Mol Mutagen*, 44: 363-71, 2004.
61. Mateuca, R., et al., Chromosomal Changes: Induction, Detection, Methods and Applicability in Human Biomonitoring, *Biochimie*, 88: 1515-31, 2006.
62. Preston, R.J. , *Mammalian In Vivo and In Vitro Cytogenetic Assays: A Report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program*, *Mutat. Res.*, 87: 143-88, 1981.
63. Jena, G.B ., Kaul, C.L., Ramarao, P., Genotoxicity Testing, a Regulatory Requirement for Drug Discovery and Development: Impact of ICH Guidelines”, *Indian J. Pharmacol.*, 34: 86-99, 2002.
64. Mortelmans, K., Rupa, S.D., Current Issues in Genetic Toxicology Testing for Microbiologists, *Adv. Appl. Microbiol.*, 56: 379-401, 2004.
65. Albertini, R.J., et al., IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans, *Mutat. Res.*, 463: 11-172, 2000.
66. Demirel, S., Zamani, A., Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3): 123-27, 2002.
67. Cunny, H., Hodgson, E., Toxicity Testing (Chapter 21), In: Hodgson, E. (ed.), *A Textbook of Modern Toxicology*, s. 353-397, John Wiley & Sons, Inc., USA, 2004.

68. Ostling, O., ve Johanson, K.J., Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123, 291-298, 1984.
69. Singh, N.P., et al., A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191, 1988.
70. McCann, J., et al., Detection of Carcinogens as Mutagens in the Salmonella/microsome Test: Assay of 300 Chemicals, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 5135-39, 1975.
71. Maron, D.R., Ames, B.N., Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutat. Res.*, 113: 173-215, 1983.
72. Anderson, D., Human Biomonitoring, *Mutat. Res.*, 204: 353-541, 1988.
73. Carrano, A.V., Natarajan, A.T., Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques, *Mutat. Res.*, 204: 379-406, 1988.
74. Norppa, H., Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk, *Mutat. Res.*, 600 (1-2): 37-45, 2006.
75. Akman, M., Bakteri Genetiği, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, 2.Baskı, Sivas, 1983.
76. Preston, R.J., et al., Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutat. Res.*, 189: 157-65, 1987.
77. Klug, W.S., Cummings, M.R., Genetik Kavramlar, Çeviri Editörü: Prof.Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, 268-271, 2003.
78. Bayel, İ., Terbinafin'in İnsan Lenfosit Kültürlerindeki Etkilerinin Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Yöntemi İle İn Vitro Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi , Tıp Fakültesi, Mersin, 2006.
79. Çelik, A., Petrol İstasyonu Çalışanlarında Kromozom Düzensizliklerinin Ve Kardeş Kromatid Değişiminin İncelenmesi, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, Haziran, 2001.
80. Latt, S.A., et al., Sister Chromatid Exchange, *Adv. Hum. Genet.*, 10: 267-331, 1980.
81. Wolff, S., Sister Chromatid Exchange, *Adv. Hum. Genet.*, 10: 183-201, 1980.
82. Wilson, D.M., Thompson, L.H., Molecular Mechanisms of Sister-Chromatid Exchange, *Mutat. Res.*, 616: 11-23, 2007.

83. Özalpan, A., Temel Radyobioloji, s. 85-87, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 2001.
84. Çelik,A., Ateş,N.A., The Frequency Of Sister Chromatid Exchanges In Cultured Human Peripheral Blood Lymhocte Treated With Metronidazole In Vitro, Drug And Chemical Toxicolgy, 1:85-94, 2006.
85. Holland, N.T., et al., Micronucleus Frequency and Proliferation in Human Lymphocytes After Exposure to Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid In vitro and In vivo, Mutat. Res., 521(1-2), 165-178, 2002.
86. Karaman, A., Keskinler,F., Kronik Böbrek Yetmezliği Olan Hastalarda Genomik Hasar, Türkiye Klinikleri J Med Sci, 29 (6): 1392-97, 2009.
87. Vanparys, P., et al., The Micronucleus Assay as a Test for the Detection of Aneugenic Activitiy, Mutat. Res., 244: 95-103, 1990.
88. Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., Sitogenetik, Genişletilmiş ve Düzeltilmiş 2.Baskı, Nobel Yayınları, 176s., 2010.
89. Dellarco, V.L., Mavournin, K.H., TICE, R.R., Aneuploidy and Health Risk Assessment: Current Status and Future Directions. Environ. Mutagen., 7: 405-424, 1985.
90. Kirsch-Volders, M., et al., The In Vitro Micronucleus Test: A Multi-endpoint Assay to Detect Simultaneously Mitotic Delay, Apoptosis, Chromosome Breakage, Chromosome Loss and Non-disjunction. Mutat. Res., 392 (1-2): 19-30, 1997.
91. Norppa, H., Falck, G.C.M., What Do Human Micronuclei Contain Mutagenesis, 18 (3): 221-233, 2003.
92. Cheng, T.J., et al., Increased Micronucleus Frequency in Lymphocytes from Smokers with Lung Cancer. Mutat. Res., 349: 43-50, 1996.
93. Duffaud, F., Comparison Between Micronucleated Lymphocytes Rates Observed in Healthy Subject and Cancer Patients. Mutagenesis, 12: 227-231, 1997.
94. Bonassi, S., et al., An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. Carcinogenesis, 28: 625-631, 2007.
95. Fenech, M., et al., Human Micronucleus Project. "HUMN Project: Detailed Description of the Scoring Criteria for the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Isolated Human Lymphocyte Cultures', Mutat. Res., 534(1-2):65-75, 2003.

96. Tomanin, R., et al., Influence of Smoking Habit on the Frequency of Micronuclei in Human Lymphocytes by Cytokinesis Block Method, *Mutagenesis*, 6(2):123-126, 1991.
97. Eroğlu, H.E., Mesane Kanserli Hastaların Doku Örneklerinde Propolis ve Mitomisin-C'nin Mikronükleus, Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Analizi ve Mitotik İndeks Parametrelerine Etkisinin Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri 2004.
98. Rajaguru, P., et al, Genotoxicity Studies on the Azo Dye Direct Red 2 Using the In Vivo Mouse Bone Marrow Micronucleus Test, *Mutat. Res.*, 444: 175-180, 1999.
99. Heddle, J.A., et al., Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and, Future, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18: 277-291, 1991.
100. Yırtıcı, Ü., Tartrazinin *Cyprinus carpio* 'daki Genotoksik Etkisinin Mikronükleus Yöntemi ile Araştırılması, Yüksek Lisan Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Ocak 2007.
101. Şekeroğlu, V., Şekeroğlu, Z., Genotoksik Hasarın Belirlenmesinde Mikronükleus Testi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4), 241-252, 2011.
102. Stoper, H., Müler,O.S., Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview, *Toxicol. In Vitro*, 11: 661-67, 1997.
103. Heddle, J., A Rapid In Vivo Test for Chromosome Damage, *Mutat. Res.*, 18: 187-90, 1973.
104. Kirsh-Volders, M., et al., Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group, *Mutat. Res.*, 540, 153-163, 2003.
105. Almassy, Z., et al., , The Present State and Perspectives of Micronucleus Assay in Radiation Protection, A Review. *Appl. Radiat. Isot.*, 38, 241-249, 1987.
106. Demirel, S., Zamani, A.G., Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları, *Genel Tıp Derg.*, 12(3), 123-127, 2002.
107. Fenech, M., et al., The Human Micronucleus Project-An International Collaborative Study on the Use of the Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans, *Mutation Research*, 428, 271-283, 1999.
108. Çavaş, T., Endüstriyel Atıkların Genotoksik Etkilerinin Mikronükleus Testi ve Agnor Analiz Teknikleri Kullanılarak İn-Situ Ve Laboratuar Koşulları Altında Araştırılması, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, Ocak 2004.

109. Guttenbach, M., Schakowski, R., Schmid, R., Aneuploidy and Ageing: X Chromosome Exclusion into Micronuclei, *Hum. Genet.*, 94, 295-298, 1994.
110. Möller, M., et al., Genotoxicity Induced by Furocoumarin Hydroperoxides in Mammalian Cells Upon UVA Irradiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 216, 693-701, 1995.
111. Emecen, G., Ünlü, H., Memelilerde Pestisitlerin Sitogenetik Etkilerinin Mikronükleus Testi ile Araştırılması, *Tr. J. Biology*, 19, 1-9, 1995.
112. Hayes, W.A., *Principles and Methods of Toxicology*, p. 750, Raven New York Press, 1984.
113. Fenech, M., The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique: A Detailed Description of the Method and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations, *Mutat. Res.*, 285, 35-44, 1993.
114. Fenech, M., Morley, A.A., Measurement of Micronuclei in Lymphocytes, *Mutat. Res.*, 147: 29-36, 1985.
115. Moore, L.E., et al., Use of Fluorescent Micronucleus Assay to Detect the Genotoxic Effects of Radiation and Arsenic Exposure in Exfoliated Human Epithelial Cells. *Environ Mol Mutagen*, 27: 176-84, 1996.
116. Stich, H.F., Rosin, M.P., Micronuclei in Exfoliated Human Cells as a Tool for Studies in Cancer Risk and Intervention, *Cancer Lett*, 22: 241-53, 1984.
117. Rojas, E., et al., Mitotic Index and Cell Proliferation Kinetics for the Identification of Antineoplastic Activity, *Anti-Cancer Drug.*, 4, 637-640, 1993.
118. Zotti-Martelli, L., et al., Individual Responsiveness to Induction of Micronuclei in Human Lymphocytes After Exposure *In vitro* to 1800-MHz Microwave Radiation, *Mutat. Res.*, 582(1-2), 42-52, 2005.
119. Scarpato, R., Migliore, R., Comparison of Spontaneous Structural Chromosome Aberration Frequency in 48 h Cultured Human Lymphocytes Mitotically Arrested by Different Colchemid Treatments, *Mutat. Res.*, 361, 35-39, 1996.
120. Bağcı, H., Tübitak, Lisansüstü Yaz Okulu, 1985.
121. Forman, D., Ames, B., The Ames Test and the Causes of Cancer, *Br. Med. J. Vol. 303*, 428-429, 1991.
122. Debnath, A.K., et al., Structure-Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Heteroaromatic Nitro Compounds Correlation Molecular

- with Orbital Energies and Hydrophobicity, *J. Med. Chem.*, 34(2), 786-797, 1991.
123. Natarajan, A.T., Obe, G., *Mutagenicity Testing with Cultured Mammalian Cells, Cytogenetic Assays, Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Copyright 1982 by Academic Press Inc. ISBN:0-12-336180-X, 1982.
 124. Benigni, R., Guliani, A., Computer Assisted Analysis of Inter Laboratory, Ames Test Variability, *J. Tox. and Env. Health*, 1, 135-148, 1988.
 125. McCann, J., Kolder, J., An Evaluation of Salmonella, Ames Test Data in the Published Literature Application of Statistical Procedures and Analysis of Mutagenic Potency, *Mutat. Res.*, 134, 1-47, 1984.
 126. Philipson, E.C., Lonrides, C., Activation of Aromatic Amines to Mutagens by Various Animal Species Including Man, *Mutat. Res.*, 124, 325-336, 1983.
 127. Milos, M., Mastelic, J., Chemical Composition and Antioxidant Effect of Glycosidically Bound Volatile Compounds from Organo, *Food. Chem.*, 71, 79-83, 2000.
 128. Gönen, U., *Aloe vera* L. Jel Ekstraktlarının, *Allium cepa* L. Kök Ucu Hücrelerinde Mitotik İndeks ve Faz İndeksi Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 2007.
 129. Fenech, M., Bonassi, S., The Effect of Age, Gender, Diet and Lifestyle on DNA Damage Measured Using Micronucleus Frequency in Human Peripheral Blood Lymphocytes, *Mutagenesis*, 26: 43-9, 2011.
 130. Pastor, S., et al., Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes and Buccal Epithelial Cells of Polish Farmers Exposed to Pesticides, *Mutat. Res.*, 495: 147-56, 2001.
 131. Walker, P.M.B., The Mitotic Index and Interphase Processes, *J. Exp. Biol.*, 31: 8-15, 1952.
 132. Tucker, J.D., Nath, J., Hando, J.C., Activation Status of the X Chromosome in Human Micronucleated Lymphocytes, *Hum. Genet.*, 97: 471-75, 1996.
 133. Müller, W.U., Micronuclei: A Biological Indicator of Radiation Damage, *Mutat. Res.*, 366, 163-169, 1996.
 134. Garaj-Vrhovac, V., et al., A Survey on the Cytogenetic Status of the Croatian General Population by Use of the Cytokinesis-block Micronucleus Assay, *Mutat. Res.*, vol. 649, no 1-2, pp. 91-100, 2008.

135. Minozzo, R., Deimling, L.I., Santos-Mello, R., Cytokinesis-blocked Micronucleus Cytome and Comet Assays in Peripheral Blood Lymphocytes of Workers Exposed to Lead Considering Folate and Vitamin B12 Status, *Mutat. Res.*, vol. 697, no 1-2, pp. 24-32, 2010.
136. Fenech, M., Morley, A.A., Cytokinesis-block Micronucleus Mehtod in Human Lymphocytes: Effect of In Vivo Aging and Low Dose X-Irradiation. *Mutat, Res.*, 161:193-198, 1986.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Yozgat'ta doğan Afide ÖCAL, orta ve lise öğrenimini sırasıyla Esentepe İlkokulu, Erdoğan Akdağ Ortaokulu ve Atatürk Lisesinde tamamlamıştır. 2002 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2007 yılında başarıyla bitirmiştir.

2010 yılında yüksek lisans eğitimine Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında başlamıştır. Yrd. Doç. Dr. Halil Erhan EROĞLU danışmanlığında hazırladığı “İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde *Hypericum heterophyllum* Vent. Türünün Mikronükleus, Mitotik İndeks ve Replikasyon İndeksi Üzerine Etkileri” başlıklı teziyle 2012 yılında mezun olmuştur.

İletişim Bilgileri

Adres : Bozok Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü Divanlı Yolu 10. km.

66100 YOZGAT

Telefon: (354) 212 50 28

E-posta: afideocal@gmail.com