

***HYPERICUM OLYMPICUM* L. ve *HYPERICUM*  
*ADENOTRICHUM* SPACH. TÜRLERİNİN  
GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN KISA  
SÜRELİ *in vitro* TEST YÖNTEMLERİ ile ARAŞTIRILMASI**

**NECMİYE BALIKÇI**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HYPERICUM OLYMPICUM L. ve HYPERICUM ADENOTRICHUM SPACH.***  
**TÜRLERİNİN GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN KISA**  
**SÜRELİ *in vitro* TEST YÖNTEMLERİ ile ARAŞTIRILMASI**

**NECMİYE BALIKÇI**

**Doç. Dr. Serap Çelikler**

**(Danışman)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GENEL BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA-2013**

**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Necmiye Balıkçı tarafından hazırlanan '*Hypericum olympicum* L. ve *Hypericum adenotrichum* Spach. Türlerinin Genotoksik/Antigenotoksik Etkilerinin Kısa Süreli *in vitro* Test Yöntemleri ile Araştırılması' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

- Danışman:** Doç. Dr. Serap Çelikler  
Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Genel Biyoloji Anabilim Dalı  
İmza
- Üye** : Prof. Dr. Engin Ulukaya  
Uludağ Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı  
İmza
- Üye** : Doç. Dr. Ferda Arı  
Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı  
İmza

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Kadri ARSLAN**  
**Enstitü Müdürü**  
.../.../2013

## **BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ**

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı **beyan ederim.**

.../.../....

**İmza**

**Necmiye BALIKÇI**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

*HYPERICUM OLYMPICUM* L. ve *HYPERICUM ADENOTRICHUM* SPACH.  
TÜRLERİNİN GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN KISA SÜRELİ  
*in vitro* TEST YÖNTEMLERİ ile ARAŞTIRILMASI

**Necmiye BALIKÇI**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Genel Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Serap ÇELİKLER

Bu çalışmada *Hypericum adenotrichum* Spach. ve *Hypericum olympicum* L. türlerinin genotoksik/antigenotoksik etkileri insan lenfosit kültürlerinde kısa süreli *in vitro* genotoksisite test yöntemleri ile belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla *in vitro*, Kromozom Aberasyonu (CA), Kardeş Kromatid Değişimi (SCE), Mikronükleus (MN) ve Komet Testleri gerçekleştirildi.

Çalışmada *Hypericum adenotrichum* türünün gövde+çiçek, gövde ve çiçek kısımları ayrı ayrı % 10 DMSO ve % 50 DMSO'da çözülerek steril koşullarda 125, 250 ve 500 µg/ml dozlarda lenfosit kültürlerine verildi. Kültürlere uygulanan klasik harvest yöntemi ile elde edilen preparatlarda kromozom aberasyonları ve mitotik indeks değerlendirildi. *Hypericum adenotrichum* türünün gövde+çiçek, gövde ve çiçek kısımlarının uygulanan hiçbir dozunda çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalış belirlenmedi. Kültürlere uygulanan klasik harvest yöntemi ile elde edilen preparatlarda SCE'ler değerlendirildi. *Hypericum adenotrichum* türünün gövde+çiçek, gövde ve çiçek kısımlarının her birinin çözücü kontrole göre 250 ve 500 µg/ml dozlarında meydana getirdiği SCE oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$ ,  $p < 0,001$ ). Bu ekstraktlar proliferasyon indeksi (PRI) açısından değerlendirildiğinde ise ekstraktların hiçbir dozunda anlamlı bir artış ya da azalış gözlenmedi. Ekstraktların aynı dozlarının meydana getirdiği mikronükleus oranları değerlendirildiğinde yalnızca gövde+çiçek ekstraktının çözücü kontrole göre 250 µg/ml dozunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldi ( $p < 0,05$ ). Nükleer bölünme indeksi (NDI) sonuçlarında ise sadece gövde ekstraktının üç dozunun da NDI'yı anlamlı olarak arttırdığı sonucuna ulaşıldı ( $p < 0,005$ ). Komet testi verilerine göre, komet alanı, komet uzunluğu, komet yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzunluğu ve olive moment uzunluğu oranlarında her üç doz grubunda da çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışın, kafa %

DNA'da ise anlamlı bir azalışın olduğu belirlendi. Genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi oranları çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında yine üç doz grubunda istatistiki olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,005$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  sırasıyla).

*Hypericum olympicum* türünün de gövde+çiçek, gövde ve çiçek kısımları ayrı ayrı % 10 DMSO ve % 50 DMSO'da çözülerek steril koşullarda 250, 500 ve 750 µg/ml dozlarda lenfosit kültürlerine verildi. Yine kültürle uygulanan klasik harvest yöntemi ile elde edilen preparatlarda kromozom aberasyonları ve mitotik indeks değerlendirildi. *Hypericum olympicum* türünün gövde+çiçek, gövde ve çiçek kısımlarının uygulanan hiçbir dozunda çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalış belirlenmedi. Kültürlere uygulanan klasik harvest yöntemi ile elde edilen preparatlara SCE için fluoresan plus giemsa boyama yapılarak SCE'ler değerlendirildi. *Hypericum olympicum* türünün gövde+çiçek, gövde ve çiçek kısımlarının yine her birinin çözücü kontrol ile karşılaştırıldıklarında 250 ve 500 µg/ml dozlarında meydana getirdiği SCE oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ( $p<0,05$ ,  $p<0,005$ ,  $p<0,001$ ). Bu ekstraktlar proliferasyon indeksi (PRI) açısından değerlendirildi ve ekstraktların hiçbir dozunda anlamlı bir artış ya da azalış gözlenmedi. Mikronükleus testi sonuçları değerlendirildiğinde ise mikronükleus oranına bakıldığında yalnızca gövde ekstraktının 750 µg/ml dozunun çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir MN artışı meydana getirdiği gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Her bir ekstraktın hiçbir dozunda nükleer bölünme indeksi (NDI) üzerine bir anlamlılık gözlenmedi. Komet testi verilerine göre, komet alanı, komet uzunluğu, komet yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzunluğu ve olive moment uzunluğu oranlarında her üç doz grubunda da çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışın, kafa % DNA'da ise anlamlı bir azalışın olduğu belirlendi. Genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi oranları çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında yine üç doz grubunda istatistiki olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  sırasıyla).

Sonuç olarak, çalışmada *Hypericum adenotrichum* ve *Hypericum olympicum* türlerinin insan lenfosit kültürlerinde Kromozom Aberasyonu (KA), Kardeş Kromatid Değişimi (SCE), Mikronükleus (MN) ve Komet testlerinden elde edilene göre önemli genotoksik etkilerinin olabileceği belirlendi.

**Anahtar Kelime:** *Hypericum adenotrichum*, *Hypericum olympicum*, Kardeş Kromatid Değişimi, Mikronükleus, Kromozom Aberasyonu, Komet, Genotoksik Etki, Nükleer Bölünme İndeks, Proliferasyon İndeksi

**2013, xvii + 145 sayfa**

## ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC/ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF  
*HYPERICUM OLYMPICUM* L. and *HYPERICUM ADENOTRICHUM* SPACH.  
SPECIES WITH SHORT TERM *IN VITRO* TEST METHODS

**Necmiye BALIKÇI**

Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Doç. Dr. Serap ÇELİKLER

In this study, genotoxic/antigenotoxic effects of *Hypericum adenotrichum* Spach. and *Hypericum olympicum* L. species are investigated with *in vitro* test methods in human lymphocyte culture. For that purpose, *in vitro* Sister Chromatid Exchange and Micronucleus (MN) assays were performed.

*Hypericum adenotrichum* was separated to trunk+flower, trunk and flower parts. 10% DMSO and 50% DMSO were used as solvent control. *Hypericum adenotrichum* extracts (HAE) were added to lymphocyte cultures at 125, 250 and 500 µg/ml doses. Slides were prepared with routine harvesting method then chromosome aberrations and mitotic index were evaluated. None of HAE extracts were statistically significant compared to solvent control. Slides were prepared with routine harvesting method and SCEs were scored for each culture. In SCE ratio, when compared to control group, there was a statistically significant increase at 250 and 500 µg/ml doses of trunk+flower, trunk and flower parts of *Hypericum adenotrichum* ( $p<0,05$ ,  $p<0,005$ ,  $p<0,001$  respectively). These extracts were evaluated to determine proliferation index (PRI) and none of the PRI values were statistically significant. The same doses were evaluated for micronucleus ratio and it was found that there was a statistically significant increase in only trunk+flower extract at 250 µg/ml dose ( $p<0,05$ ). For Nuclear Division Index (NDI), trunk extract at all three doses, increased NDI significantly ( $p<0,005$ ). According to data of comet assay, comet square, comet length, comet density, tail length, tail DNA percentage, tail moment length ve olive moment length rates increased significantly at all three doses compared to solvent control. For head DNA percentage, there was a statistically significant decrease at all three doses compared to solvent control. It was also found that DNA damage index and percentage of damaged cells rates compared to solvent control in all three doses were statistically ( $p<0,005$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  respectively).

*Hypericum olympicum* was separated to trunk+flower, trunk and flower parts. 10% DMSO and 50% DMSO were used as solvent control. *Hypericum olympicum* extracts (HOE) were added to lymphocyte cultures at 250, 500 and 750 µg/ml doses. Slides were prepared with routine harvesting method then chromosome aberrations and mitotic index were evaluated. None of HOE extracts were statistically significant compared to solvent control. Slides were prepared with routine harvesting method and SCEs were scored for each culture. In SCE ratio, when compared to control group, there was a statistically significant increase at 250 and 500 µg/ml doses of trunk+flower, trunk and flower parts of *Hypericum adenotrichum* ( $p<0,05$ ,  $p<0,005$ ,  $p<0,001$  respectively). These extracts were evaluated to determine proliferation index (PRI) and none of the PRI values were statistically significant. As a result of micronucleus assay, only trunk extract at 750 µg/ml dose increased MN significantly ( $p<0,05$ ). HOE extracts were evaluated to determine nuclear division index (NDI) and none of the NDI values were statistically significant. According to result of comet assay, comet square, comet length, comet density, tail length, tail DNA percentage, tail moment length ve olive moment length rates increased significantly at all three doses compared to solvent control. For head DNA percentage, there was a statistically significant decrease at all three doses compared to solvent control. It was also found that DNA damage index and percentage of damaged cells rates compared to solvent control in all three doses were statistically ( $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  respectively).

In conclusion, it has been suggested in this study that *Hypericum adenotrichum* and *Hypericum olympicum* extracts have induced sister chromatid exchanges, chromosome aberration, micronucleus formation and DNA damage in human lymphocytes. So they may have significant genotoxic effects.

**Key Words:** *Hypericum adenotrichum*, *Hypericum olympicum*, Sister Chromatid Exchange, Chromosome Aberration, Micronucleus, Comet, Genotoxic Effect, Nuclear Division Index, Proliferation Index

**2013, xvii + 145 pages**



## TEŞEKKÜR

ÇalıŐtıĐımız projenin hayata geçirilmesini sağlayan ve bana bu konuda çalışma olanağı veren, tez çalıŐmamın her aşamasında bilgisini ve desteğini esirgemeyen danıŐmanım Doç. Dr. Serap ÇELİKLER'e, çalıŐmalarımnda her ihtiyacım olduğunda yardımcı olan bütün yüksek lisans arkadaşlarıma ve bu uzun süreçte her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi'nce (Proje No: UAP(F)-2009/28) desteklenmiŐtir.

Necmiye BALIKÇI  
.../.../....

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	İ
ABSTRACT.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Genetik Toksikoloji Test Sistemleri ve Bazı Genotoksik Ajanlarla Gerçekleştirilmiş Test Çalışmaları.....	4
2.1.1. Bakteriyel Test Sistemleri.....	7
2.1.1.1. Ames Testi.....	7
2.1.1.2. UMU Testi.....	8
2.1.1.3. VITOTOX® Testi.....	9
2.1.1.4. SOS-Kromotest.....	9
2.1.2. Sitogenetik Test Sistemleri.....	10
2.1.2.1. Kardeş Kromatid Değişimi Testi (SCE).....	10
2.1.2.2. Kromozom Aberasyonu Testi (CA).....	11
2.1.2.3. Mikronükleus Testi (MN).....	13
2.1.2.4. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi).....	15
2.2. Halk Tıbbında Tedavi Amaçlı Kullanılan Bitkiler ve Genotoksik/Antigenotoksik Araştırmaları.....	16
2.3. Halk Tıbbında <i>Hypericum</i> 'un Tedavi Amaçlı Kullanımı ve Genotoksisite Araştırmaları.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	35
3.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri.....	35
3.2. <i>Hypericum adenotrichum</i> ve <i>Hypericum olympicum</i> Türlerinin İçerik Analizi....	38
3.3. Ekstraksiyon.....	38
3.4. Evaporasyon.....	38

3.5. Liyofilizasyon.....	38
3.6. Kültür Ortamlarının Hazırlanması.....	38
3.7. Doz Seçimi.....	39
3.8. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	40
3.9. Genotoksisite Çalışmaları.....	40
3.9.1. Lenfosit Kültürü Kromozom Aberasyonu Testi.....	40
3.9.2. Lenfosit Kültürü Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Testi.....	42
3.9.3. Lenfosit Kültürü Mikronükleus Testi.....	43
3.9.4. Lenfosit Kültürü Alkali Komet Testi.....	44
3.10. İstatistiki Değerlendirme.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. <i>Hypericum adenotrichum</i> Türünün İçerik Analizi Sonucu.....	47
4.2. Lenfosit Kültürü Kromozom Aberasyonu Testi (CA) Sonuçları.....	58
4.3. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Test Sonuçları.....	78
4.4. <i>In Vitro</i> Mikronükleus (MN)Test Sonuçları.....	90
4.5. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi) Sonuçları.....	102
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	126
KAYNAKLAR.....	131
ÖZGEÇMİŞ.....	145

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

g	gram
µg	mikrogram
mg	miligram
ml	mililitre

### Açıklama

### Kısaltmalar

CA	Kromozom Aberasyon
CdCl <sub>2</sub>	Kadmiyum kloride
DMSO	Dimetilsulfoxide
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMS	Etilmetansülfonat
EtOH	Etanol
HAE	<i>Hypericum adenotrichum</i> Ekstraktı
HOE	<i>Hypericum olympicum</i> Ekstraktı
MeOH	Metanol
MI	Mitotik İndeks
MN	Mikronükleus
NDI	Nükleer Bölünme İndeksi
PRI	Proliferasyon İndeksi
SCE	Sister Chromatid Exchange
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

### Açıklama

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.1.</b> Genotoksinlerin DNA üzerinde etki mekanizması ve sonuçları (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).....	4
<b>Şekil 2.1.1.1.1.</b> Ames testinin uygulanması ve mutajeniteyi gösteren koloniler (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).....	7
<b>Şekil 2.1.2.1.1.</b> a-BrdU ile kardeş kromatit değişiminin belirlenmesi b-Kardeş kromatit değişimleri içeren metafaz plağı (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).....	10
<b>Şekil 2.1.2.2.1.</b> Kromozom aberasyonları içeren metafazlar a-Fragment, b-Kardeş kromatit birleşmesi, c-Kromatit Kırıkları, d-Kromozom kırığı, e-Poliploidi, f-Endoreduplikasyon (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).....	12
<b>Şekil 2.1.2.3.1.</b> Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki mikronukleuslar (Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu 2011).....	13
<b>Şekil 2.1.2.3.2.</b> Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücre oluşumu (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).....	14
<b>Şekil 2.1.2.4.1.</b> Komet testi sonucu elde edilen hücrelerdeki DNA hasar tipleri A-Tip 0, B-Tip 1, C-Tip 2, D-Tip 3, E-Tip 4, F-Apoptotik hücre (Silva ve ark. 2000).....	16
<b>Şekil 2.3.1.</b> <i>Hypericum</i> türlerinin Dünya üzerindeki dağılımı (Robson 1977).....	27
<b>Şekil 2.3.2.</b> Hiperisin'in kimyasal yapısı (Agostinis 2002).....	29
<b>Şekil 2.3.3.</b> Hiperforin'in kimyasal yapısı (Beerhues 2006).....	30
<b>Şekil 2.3.4.</b> <i>Hypericum adenotrichum</i> 'un genel görünüşü.....	34
<b>Şekil 2.3.5.</b> <i>Hypericum olympicum</i> subsp. <i>olympicum</i> 'un genel görünüşü.....	34
<b>Şekil 3.1.1.</b> <i>Hypericum adenotrichum</i> 'un gövde+çiçek kısmı.....	36
<b>Şekil 3.1.2.</b> <i>Hypericum adenotrichum</i> 'un çiçek kısmı.....	36
<b>Şekil 3.1.3.</b> <i>Hypericum olympicum</i> 'un gövde+çiçek kısmı.....	37
<b>Şekil 3.1.4.</b> <i>Hypericum olympicum</i> 'un çiçek kısmı.....	37
<b>Şekil 4.2.1.</b> HAE(Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları .....	61

<b>Şekil 4.2.2.</b> HAE(Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları.....	61
<b>Şekil 4.2.3.</b> HAE(Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları .....	62
<b>Şekil 4.2.4.</b> HAE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları.....	63
<b>Şekil 4.2.5.</b> HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları .....	64
<b>Şekil 4.2.6.</b> HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları.....	64
<b>Şekil 4.2.7.</b> HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları .....	65
<b>Şekil 4.2.8.</b> HAE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları .....	66
<b>Şekil 4.2.9.</b> HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları .....	66
<b>Şekil 4.2.10.</b> . HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları .....	70
<b>Şekil 4.2.11.</b> HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları.....	70
<b>Şekil 4.2.12.</b> HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları .....	71
<b>Şekil 4.2.13.</b> HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları.....	72
<b>Şekil 4.2.14.</b> HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları .....	73
<b>Şekil 4.2.15.</b> HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları.....	73

<b>Şekil 4.2.16.</b> HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları .....	74
<b>Şekil 4.2.17.</b> HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları .....	75
<b>Şekil 4.2.18.</b> HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları .....	75
<b>Şekil 4.2.19.</b> 750 µg/ml HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması ile Kromozom Aberasyonu Testi sonucu elde edilen kromatid ve kromozom gap ile nüberik aberasyonun (42 kromozom) görüldüğü metafaz plağı ( $\blacktriangleright$ kromozom gap, $\rightarrow$ kromatid gap).....	77
<b>Şekil 4.2.20.</b> 750 µg/ml HOE (Gövde) uygulaması ile Kromozom Aberasyonu Testi sonucu elde edilen çok sayıda kromatid gap'in görüldüğü metafaz plağı ( $\rightarrow$ kromatid gap).....	77
<b>Şekil 4.3.1.</b> HAE(Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (**: p<0,005, ***: p<0,0001).	79
<b>Şekil 4.3.2.</b> HAE(Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (**: p<0,005, ***: p<0,0001).....	79
<b>Şekil 4.3.3</b> HAE(Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (*: p<0,05, ***: p<0,0001).....	80
<b>Şekil 4.3.4.</b> HAE(Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları .....	81
<b>Şekil 4.3.5.</b> HAE(Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları .....	81
<b>Şekil 4.3.6.</b> HAE(Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları .....	82
<b>Şekil 4.3.7.</b> HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (*: p<0,05, **: p<0,005) .....	84
<b>Şekil 4.3.8.</b> HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (**: p<0,005, ***p<0,0001) .....	84
<b>Şekil 4.3.9.</b> HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (***p<0,0001) .....	85
<b>Şekil 4.3.10.</b> HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları .....	86

<b>Şekil 4.3.11.</b> HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları .....	86
<b>Şekil 4.3.12.</b> HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları .....	87
<b>Şekil 4.3.13.</b> 125 µg/ml HAE (Gövde) uygulaması ile Kardeş Kromatid Değişimi Testi sonucunda gözlenen SCE'li hücre ve kromozom örneği (SCE'ler ok işareti ile gösterilmiştir) .....	88
<b>Şekil 4.3.14.</b> 750 µg/ml HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması ile Kardeş Kromatid Değişimi Testi sonucunda gözlenen SCE'li hücre ve kromozom örneği (SCE'ler ok işareti ile gösterilmiştir).....	88
<b>Şekil 4.3.15.</b> 750 µg/ml HOE (Gövde) uygulaması ile Kardeş Kromatid Değişimi Testi sonucunda gözlenen M3 fazındaki metafaz plağı (M3: Üçüncü mitoz bölünmeyi geçirmiş).....	89
<b>Şekil 4.4.1.</b> HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları (**: p<0,005).....	91
<b>Şekil 4.4.2.</b> HAE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları.....	91
<b>Şekil 4.4.3.</b> HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları.....	92
<b>Şekil 4.4.4.</b> HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları.....	93
<b>Şekil 4.4.5.</b> HAE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları (**: p<0,05).....	93
<b>Şekil 4.4.6.</b> HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları.....	94
<b>Şekil 4.4.7.</b> HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları.....	96
<b>Şekil 4.4.8.</b> HAE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları (*: p<0,05).....	96
<b>Şekil 4.4.9.</b> HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin % oMN oranları.....	97
<b>Şekil 4.4.10.</b> HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları.....	98



<b>Şekil 4.4.11.</b> HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları.....	98
<b>Şekil 4.4.12.</b> HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları.....	99
<b>Şekil 4.4.13.</b> 500 µg/ml HAE (Gövde) uygulaması ile Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu binükleat hücre ve mononükleat hücre örneği (→, Mikronükleus).....	100
<b>Şekil 4.4.13.</b> 750 µg/ml HOE (Gövde) uygulaması ile Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu binükleat hücre örneği (→, Mikronükleuslar).....	100
<b>Şekil 4.4.14.</b> 750 µg/ml HOE (Gövde) uygulaması ile Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu binükleat hücre örneği (→, Mikronükleuslar).....	100
<b>Şekil 4.4.15.</b> 500 µg/ml HAE (Gövde) uygulaması ile Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu A-mononükleat, B-Binükleat, C-trinükleat hücre ve D-tetranükleat hücre örnekleri (→, Mikronükleuslar).....	101
<b>Şekil 4.5.1.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Alanı oranları (***: p<0,0001).....	104
<b>Şekil 4.5.2.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Uzunluğu oranları (***: p<0,0001).....	105
<b>Şekil 4.5.3.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Yoğunluğu oranları (***: p<0,0001).....	106
<b>Şekil 4.5.4.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Uzunluğu oranları (***: p<0,0001).....	107
<b>Şekil 4.5.5.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk % DNA oranları (*: p<0,05, ***: p<0,0001).....	108
<b>Şekil 4.5.6.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Moment Uzunluğu oranları (***: p<0,0001).....	109
<b>Şekil 4.5.7.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Olive Moment Uzunluğu oranları (**: p<0,005, ***: p<0,0001).....	110
<b>Şekil 4.5.8.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kafa % DNA oranları (*: p<0,05, ***: p<0,0001).....	111
<b>Şekil 4.5.9.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi oranları (**: p<0,005, ***: p<0,0001).....	112

<b>Şekil 4.5.10.</b> HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Hasarlı Hücre Yüzdesi oranları (**: p<0,005, ***: p<0,0001).....	113
<b>Şekil 4.5.11.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Alanı oranları (p<0,0001).....	115
<b>Şekil 4.5.12.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Uzunluğu oranları (***: p<0,0001).....	116
<b>Şekil 4.5.13.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Yoğunluğu oranları (***: p<0,0001).....	117
<b>Şekil 4.5.14.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Uzunluğu oranları (***: p<0,0001).....	118
<b>Şekil 4.5.15.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk % DNA oranları (***: p<0,0001).....	119
<b>Şekil 4.5.16.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Moment Uzunluğu oranları (***: p<0,0001).....	120
<b>Şekil 4.5.17.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Olive Moment Uzunluğu oranları (**: p<0,005, ***: p<0,0001).....	121
<b>Şekil 4.5.18.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kafa % DNA oranları (***: p<0,0001).....	122
<b>Şekil 4.5.19.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi oranları (***: p<0,0001).....	123
<b>Şekil 4.5.20.</b> HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Hasarlı Hücre Yüzdesi oranları (***: p<0,0001).....	124
<b>Şekil 4.5.21.</b> Komet testi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutba doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. Tip 0-Hasarsız DNA, Tip 1-Çok az hasarlanmış DNA, Tip 2-Az hasarlanmış DNA, Tip 3-Hasarlanmış DNA, Tip 4-Çok hasarlanmış DNA, Apoptotik hücre-Tümüyle hasarlanmış DNA.....	125

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2.1.1.</b> Bazı önemli genotoksik karsinojenler (Ergun 2010).....	6
<b>Çizelge 2.2.1.</b> Modern tıp pratiğinde yaygın olarak kullanılan ana ilaçlardan bitkisel kaynaklı olanlara çok bilinen örnekler (Sütlüoınar 2005).....	18
<b>Çizelge 4.1.1.</b> <i>Hypericum adenotrichum</i> türünün içerik analizi bulguları.....	47
<b>Çizelge 4.1.2.</b> <i>Hypericum olympicum</i> türünün içerik analizi bulguları.....	52
<b>Çizelge 4.2.1.</b> HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom aberasyonu testinin sonuçları.....	59
<b>Çizelge 4.2.2.</b> HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom aberasyonu testinin Total aberasyon oranları (gap ve pulverizasyon oranları dahil edilerek ve edilmeden) ve %o Mİ değerleri.....	60
<b>Çizelge 4.2.3.</b> HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom aberasyonu testinin sonuçları.....	68
<b>Çizelge 4.2.4.</b> HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom aberasyonu testinin Total aberasyon oranları (gap ve pulverizasyon oranları dahil edilerek ve edilmeden) ve %o Mİ değerlerin ortalama değerleri.....	69
<b>Çizelge 4.3.1.</b> HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin ortalama değerleri.....	78
<b>Çizelge 4.3.2.</b> HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin ortalama değerleri.....	83
<b>Çizelge 4.4.1.</b> HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin ortalama değerleri.....	90
<b>Çizelge 4.4.2.</b> HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin ortalama değerleri .....	95
<b>Çizelge 4.5.1.</b> HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet testinin ortalama değerleri .....	103
<b>Çizelge 4.5.2.</b> HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet testinin Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerleri .....	103
<b>Çizelge 4.5.3.</b> HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet testinin ortalama değerleri.....	114

**Çizelge 4.5.4.** HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerleri.....115

## 1. GİRİŞ

Bitkilerin yaklaşık 5000 yıldır insanlar tarafından hastalıklardan korunmada ve hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Dünya'nın farklı yerlerinde yapılan arkeolojik kazılar sonucunda elde edilen tabletler, kitabeler, mezarlar gibi arkeolojik materyaller bu bilgiyi desteklemektedir.

Bugün yeryüzünde bulunan bitki türü sayısının 250.000-500.000 arasında olduğu kabul edilmektedir. Türkiye'deki bitki türü sayısı ise yaklaşık 12.000 civarındadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir (Dünya nüfusunun % 80'i). Bu amaçla yararlanılan tıbbi bitki türünün 70.000 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Yine Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 21.000 bitki türü ilaç hazırlamak için uygun bulunmuştur (Başer 2003).

20. yy'da organik kimya, biyoloji ve tıp bilimindeki gelişmeler, etkili sentetik ilaçların tanıtılmasına ve tüketilmesine olanak sağlamış, bitkisel ilaçların modern tıpta kullanılmasının önüne geçmiştir. Bununla birlikte halkın; bitkisel ürünlerin doğal yapıya sahip olması, globalleşme, ürünlere ulaşımın kolaylaşması, ürün şekilleri ve kullanım kolaylığı yanında sentetik ilaçlarda görülen beklenmeyen etkilerden dolayı bu bitkisel bileşiklere olan ilgisi, endüstrinin gitgide büyüyen tüketici isteklerini karşılamak amacıyla yeni bitkisel ürünler pazarlamasına ve bu bitkilerin daha fazla miktarda üretimine başlamasına yol açmıştır (Sharifuddin ve ark. 2012).

Tıbbi bitkilere karşı olan bu ilgi sonucunda, Dünya Sağlık Örgütü 1980 yılında tıbbi bitkileri 'Bir veya birden fazla organıyla tedavi edici veya hastalıkları önleyici olabilen veya herhangi bir kimyasal-farmasötik sentezin öncüsü olabilen bitki çeşitleridir' şeklinde tanımlayarak, bitkisel ürünlerin tedavide kullanılabileceklerini kabul etmiştir. Fakat bir maddenin ilaç olarak kullanılabilmesi için yapısının iyi bilinmesi, etki mekanizmasının ve dozunun belli olması ve güvenilirlik sınırının detaylandırılmış olması gerekmektedir (Başaran 2012). Bu güvenilirlik sınırına dahil olan en büyük tehlikelerden biri de bitkisel ürünlerin mutasyon ve/veya kansere neden olabilme riskleridir. Bu nedenle bu risklerin değerlendirilmesi açısından kısa süreli genotoksisite testlerinin yapılması çok büyük önem arz etmektedir. Bugüne kadar pek çok bitkinin

kısa süreli genotoksisite testleri ile güvenilirlik sınırları belirlenmiştir. Bugün kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin/natural bir bileşiğin genotoksik veya anti-genotoksik olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan testlerden bazıları; Kromozom Aberasyonu (Chromosome Aberration CA), Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange SCE), Mikronükleus (MN) ve Komet (Comet) testleridir.

Dünya’da Afrika, Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa’da tropik ve subtropik bölgelerde yayılış gösteren, 400 kadar türle temsil edilen *Clusiaceae* (*Hypericaceae*=*Guttiferae*) familyasına bağlı *Hypericum* L. cinsinin Türkiye’de 84 türü bulunmaktadır (Davis 1967, Davis ve ark. 1988, Güner ve ark. 2000). Yurdumuz *Hypericum* türleri bakımından önemli bir gen merkezidir (Tokur 1988).

Çeşitli *Hypericum* türleri dünya çapında farklı halk ilaçlarında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlar arasında en popüler olan ve en çok çalışılan tür Dünya’da genellikle ‘St. John’s Wort’, Türkiye’de ise ‘Sarı Kantaron’ olarak bilinen *Hypericum perforatum*’dur. *Hypericum perforatum* özellikle yanıkların, cilt yaralanmalarının ve nörolojik semptomların tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop 1984). Ayrıca hafif ve orta dereceli depresyonun tedavisinde de etkili olduğu klinik çalışmalar ile gösterilmiştir. Farmakolojik aktivitesi içeriğinde bulunan hiperisin ve hiperforinden kaynaklanmaktadır.

Çalışmada kullanılan *Hypericum adenotrichum* ve *Hypericum olympicum* subsp. *olympicum*’un biyolojik aktivitelerinin gösterildiği birkaç çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada Türkiye’ye endemik olan *H.adenotrichum*’un ikincil metabolitleri; hiperforin, hiperisin, pseudohiperisin, klorojenik asit, rutin, hiperosit, quersitrin, quersetin, kaempferol, apigenin-7-O-glukozid ve amentoflavonun çeşitli seviyelerdeki konsantrasyonları, hiperforin hariç olmak üzere, HPLC ile belirlenmiştir (Çırak ve ark. 2009). Bir diğer çalışmada da *H. adenotrichum*’un antikanser özellikleri araştırılmış ve bu bitkinin etkili bir p53-bağımsız antineoplastik özelliğinin de olduğu gösterilmiştir (Özmen ve ark. 2009). *H. olympicum* ile yapılan bir çalışmada bu bitkinin stamenlerinde hiperisin ve pseudohiperisin bileşiklerinin yaklaşık olarak eşit miktarda buldukları belirlenmiştir (Kitanov 2001). *Hypericum olympicum*’un esansiyel yağının içeriği ise bir

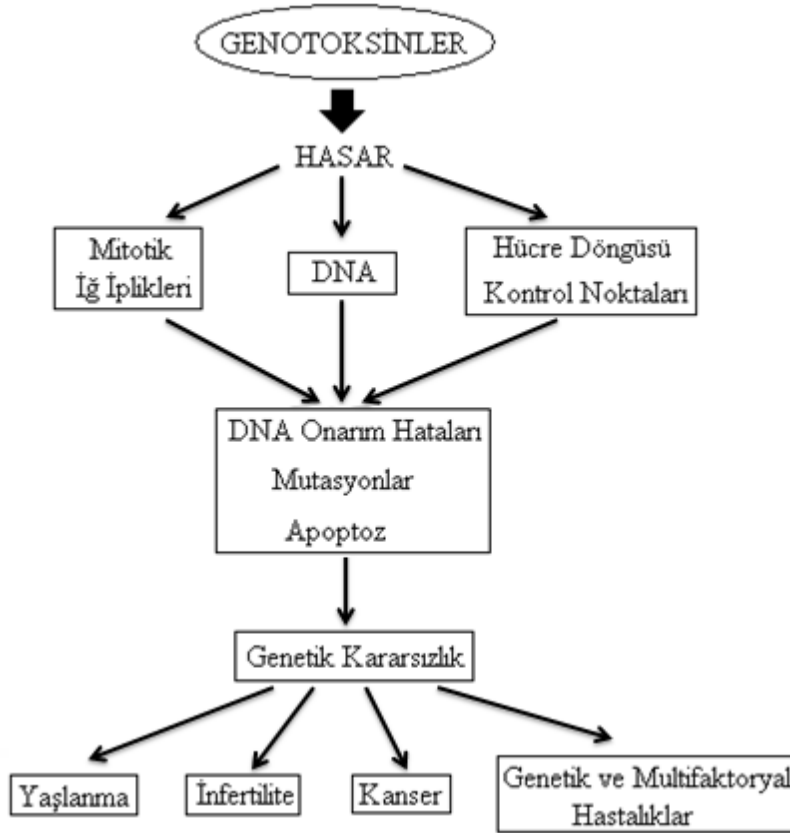
başka çalışmada belirlenmiş, bu bileşiklerin (E)-anethole (% 30,7) ve  $\beta$ -farnesene (% 12,4) olduğu gösterilmiştir (Gudzic ve ark. 2001).

Bilindiği üzere bu iki bitkiye ait çalışmalar olmasına karşın genotoksik ve/veya antigenotoksik açıdan değerlendirmeler mevcut değildir. Bu çalışmada da *Hypericum* cinsine ait Kuzeydoğu Türkiye'ye endemik olan *H.adenotrichum* ve genellikle Güneydoğu Avrupa'da yayılış gösteren *H.olympicum* subsp. *olympicum*'un genotoksisite ve/veya antigenotoksisite açısından güvenilirlik sınırları insan lenfositlerinde *in vitro* Kromozom Aberasyonu (CA), Kardeş Kromatid Değişimi (SCE), Mikronükleus (MN) ve Komet testleri ile belirlenmeye çalışılmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Genetik Toksikoloji Test Sistemleri ve Bazı Genotoksik Ajanlarla Gerçekleştirilmiş Test Çalışmaları

Genetik toksikoloji, toksik ajanların deoksiribonükleik asitte (DNA) meydana getirdiği hasarları çalışan bilim dalıdır. Kimyasal olarak DNA’da şifrelenmiş genetik bilgi, birbiri ardına gelen nesillerde yüksek duyarlılıkla devam ettirilir, replike edilir ve transmise edilir. DNA hasarı, normal biyolojik işlemler süresince veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanların direkt veya indirekt olarak DNA ile etkileşimi sonucu ortaya çıkabilir (Brusick 1980). DNA’da oluşan hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma ve kanser oluşabilmektedir (Şekil 2.1.1.). Mutasyonlar sıklıkla gen fonksiyonlarında değişiklik ya da kayıpla sonuçlanabilmektedir (Kramer 1998).



Şekil 2.1.1. Genotoksinlerin DNA üzerinde etki mekanizması ve sonuçları (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011)



Genetik toksikoloji alanı gelişimine, kalıtımın biyokimyasal temeli anlaşılmadan önce başlamıştır. Daha önceki araştırmacılar fiziksel ve kimyasal ajanların kalıtsal mutasyonlara yol açabileceğini gözlemlemişlerdir. Canlı bir organizmada radyasyonun kalıtsal değişiklikler meydana getirdiği ilk olarak Muller (1927) tarafından yayınlanmıştır. Auerbach ve ark. (1947) ise, kimyasalların mutasyonlara neden olabileceğini rapor etmektedir. Kalıtsal karakterlerde meydana gelen değişikliklerle ilgili bu ilk incelemeler, daha sonra genetik toksikoloji alanını meydana getirecek olan çekirdek bir çalışmayı şekillendirmişlerdir (Young 2002).

Günümüze kadar genetik toksikolojinin temel rolü, DNA ve RNA yapısını (Cloutier ve ark. 2001), DNA onarımını (Hanawalt ve Haynes 1965, Rasmussen ve Painter 1966), bireylerde meydana gelen mutasyonun rolünü (McDiarmid ve ark. 1995) ve hasarın popülasyondaki seviyelerini (Jacobsan-Kram 1993, Robinson ve ark. 1994) çalışmak için yöntemler sağlayarak kalıtım mekanizmasını araştırmak olmuştur. Genotoksisiteyi ölçmek amacıyla yıllardır geliştirilen farklı deney sistemlerinin bir bütün olarak gerçekleştirilmeleri mutajen kimyasallar veya ilaçları belirlemek için en etkili yol olmuştur (Tennant ve ark. 1987, Zeiger ve ark. 1990). Bu işlem, düzenleyici toksikolojide genetik toksikolojinin kullanımına yol açmıştır. Bu durum ise, piyasadaki ve piyasaya çıkmak üzere olan kimyasalların (ilaçlar dahil) risk açısından değerlendirilmelerini sağlamıştır (Çizelge 2.1.1.), (Young 2002).

Daha önce, DNA ile mutajenlerin biyokimyasal ve biyofiziksel etkileşimlerini araştırmak için bu gibi işlemler asellüler sistemler kullanılarak yapılırken (Pouwels ve ark. 1968, Kuhnlein ve ark. 1979), genetik toksikoloji test sistemleri gelişmiş organizmaların kullanılmasına olanak sağlamıştır. Kullanılan test sistemleri; bakteriyofajlar (Weigle 1953), virüsler (Saidman 1989), bakteriler (Ames ve ark. 1975, Green ve Muriel 1976), mayalar (Zimmermann ve Schwaier 1967), kültürde memeli hücreleri (Chu ve Malling 1968, Kao ve Puck 1968), bitkiler (Sparow ve ark. 1972, Grant 1994), böcekler (Valencia ve ark. 1984, Vogel ve ark. 1999) ve hayvanlardır (Russell ve ark. 1981, Kohler ve ark. 1991). Genotoksisiteyi değerlendirmek için yıllardır kullanılan sonlanım noktaları ise; DNA adductları (Randerath ve ark. 1989, Reddy 2000), DNA zincir kırıkları (Larsen ve ark. 1982, Skare ve Schrotel 1984), mutasyonlar (Clive ve Spector 1975, Mitchell ve ark. 1997), kromozom sayısı ve

yapısında değişiklikler (Evans 1976, Galloway ve ark. 1994), DNA onarım hataları (San ve Stich 1975, Mitchell ve ark. 1983) ve malignant fenotiplere hücre transformasyonudur (Kagunaga 1973, LeBouf ve Kerckaert 1987).

**Çizelge 2.1.1.** Bazı önemli genotoksik karsinojenler (Ergun 2010).

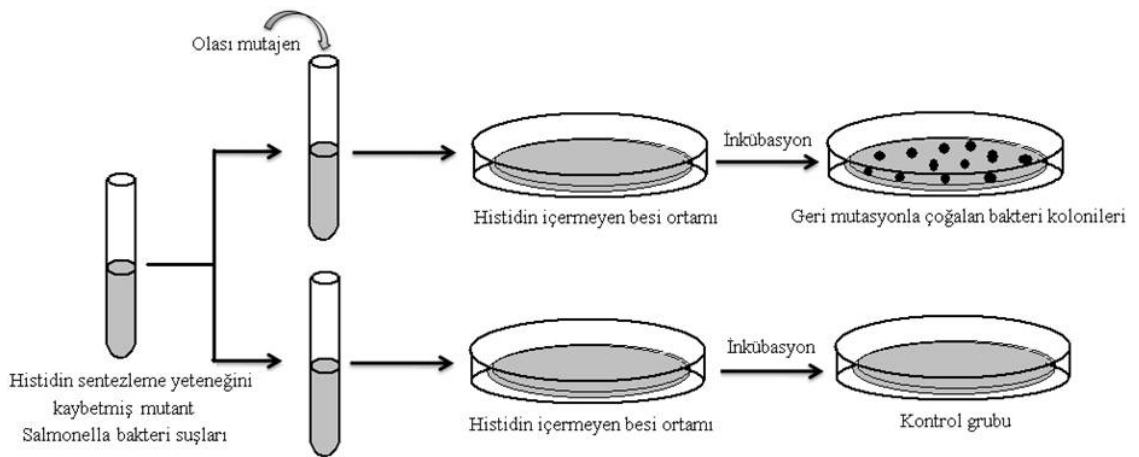
<b>Organik Yapılı Maddeler</b>		<b>İnorganik Yapılı Maddeler</b>
<b>PAHlar</b>	<b>Alkilleyici Ajanlar</b>	Arsenik
Benzantresan Türevleri	Antikanser İlaçlar	Krom
Benzo(a)piren	Mustard Gazı	Kadmiyum
Krizen	<b>Doğal Bileşikler</b>	Nikel
Perilen	Pirolizidin Alkoloidleri	Berilyum
Poliklorlu bifeniller (PCB)	Aflatoksinler	Kobalt
Metilkolantren	<b>Serbest Radikaller</b>	Demir
<b>Aromatik Aminler</b>	<b>Diğer Bileşikler</b>	Kurşun
Anilin	1.3-Butadiene	Titanyum
Benzidin	Dioxinler	Çinko
2-Naftilamin	Formaldehit	Asbest
Toluen-2,4-diamin		
2-Antramin		
Sakarin		
<b>Nitrozaminler</b>		
N-nitrozonornikotin		
Alkil nitrozaminler		
Nitrozopiperidin		
Dimetilnitrozamin		
Dimetilaminoazobenzen		
o-aminoazotoluen		

Genotoksiste testleri kısa veya uzun süreli *in vivo*, *iv vitro* ve *ex vivo* koşullarda gerçekleştirilebilmektedir. Bahsedilen sonlanım noktalarının kullanıldığı bazı *in vitro* genotoksiste testleri ise şu şekildedir:

## 2.1.1. Bakteriyel Test Sistemleri

### 2.1.1.1. Ames Testi

‘*Salmonella typhimurium* mikrozoom testi’ olarak da adlandırılan bu test yöntemi Dr. Bruce Ames ve arkadaşları (1970) tarafından geliştirilmiştir. Ames testi, gen mutasyonlarına yol açan genetik hasarı meydana getiren çeşitli kimyasal maddeleri belirlemek amacıyla spesifik olarak tasarlanmış, kısa süreli bakteriyel reverse (ters) mutasyon testidir. Test sisteminde, her biri histidin operonundaki çeşitli genlerde farklı mutasyonlar taşıyan birkaç histidine bağımlı *Salmonella* suşu kullanılır (Mortelmans ve Zeiger 2000). Suşlardan birisi baz-çifti mutasyonlarını tanımada kullanılır ve diğer üçü çerçeve-kayması mutasyonlarını tanır. Her mutant suş histidini sentezleyemez ve bu yüzden üreme için histidine gereksinim duyar (*his*<sup>-</sup>). Deney, yabancı bakteri (*his*<sup>+</sup>) oluşturan reverse (ters) mutasyon sıklığını ölçer (Şekil 2.1.1.1.1) Artan duyarlılık, bu suşların hem kesip-çıkarma onarımı hem de bakterinin yüzeyini çevreleyen ve koruyan lipopolisakarit engelini yok eden diğer mutasyonları bulundurmaları yoluyla sağlanır (Klug ve Cummings 1986).



**Şekil 2.1.1.1.1.** Ames testinin uygulanması ve mutajeniteyi gösteren koloniler (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

Güneydoğu Asya'da böbrek disfonksiyonlarının, diyabetin ve gut hastalığının tedavisinde kullanılan *Orthosiphon stamineus* aköz ekstraktının genotoksitesisi Ames testi ile çalışılmıştır. Ames testi, ekstrinsik metabolik aktivasyon (S9 karışımı) varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. S9 karışımı ise, karaciğer enzimi seviyelerinin aktivitelerini arttırmak için daha önce Aroclor ile muamele edilen, homojenize sıçan karaciğerinden elde edilen enzimlerin ham bir karışımıdır. Sonuç olarak, *O. stamineus* ekstraktının, test edilen *Salmonella* suşlarında (TA97a, TA98, TA100 ve TA1535) genotoksik olmadığı belirlenmiştir (Muhammad ve ark. 2011).

#### **2.1.1.2. UMU Testi**

*Escherichia coli*'de bulunan *umu* operonu, kimyasal mutajenez ve radyasyon mutajenezinden sorumludur ve operonun kendi kendine ekspresyonu bu DNA'ya hasar veren ajanlar tarafından uyarılabilir. UMU testinin prensibi, birçoğu karsinojen olan ajanların *umu* operonunu indükleyerek DNA'ya hasar verebilme yeteneğine dayanır (Oda ve ark. 1985). SOS cevabı esas alınarak geliştirilmiştir ve regülatör bir sistem olan SOS sistemi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içerisinde ilk olarak karakterize edilmiş olan en kapsamlı, en kompleks ve en iyi anlaşılmış sistemdir (Oda ve ark. 1985, Walker 1985). Yüksek bakteriyotoksik etkilere sahip olan kimyasalların teşhisinde kullanılabilir. UMU test şusu olan TA1535/pSK1002'ye eklenen çok kopyalı plazmidler, NR (nitroaren) geni, NAT (N-asetil transferaz) geni ya da her ikisini de bakteriye aktarmaktadır. Sonuç olarak bu bakteri suşu DNA hasarına sebep olan 'nitroantren' ve 'aromatik aminler' e karşı hassasiyet kazanır (Josephy ve ark. 1997).

Diaveridine ve Trimethoprim, profilaksi ve koksidiozis ile lökositozonozis tedavi amaçlı antiprotozoal olarak kullanılan bir folik asit antagonisti olan primethamin analoglarıdır. Trimethoprim aynı zamanda antibakteriyel bir ajandır. Bu iki bileşiğin genotoksitesileri bakteriyel umu testi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak, her iki bileşiğin de metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda, test edilen suşlarda negatif oldukları gösterilmiştir (Ono ve ark. 1997).

### 2.1.1.3. VITOTOX® Testi

VITOTOX® testi prensibi, SOS sisteminin bir parçası olan *recN* geninin transkripsiyonal kontrolü altında *Vibrio fischeri*'nin *lux* operonunu içeren *Salmonella typhimurium* suşuna (TA104 *recN2-4*) dayanır. Genotoksik bir bileşiğin varlığında bir bakterinin inkübasyonu, *recN* promotörün baskılanmasının kaldırılması ve bunun sonucu olarak da *lux* operonunun ekspresyonuyla sonuçlanır. Sonunda da bu ekspresyon, genotoksitenin bir fonksiyonu olarak ışık üretimiyle sonuçlanır (Van der Lelie ve ark. 1997). SOS sisteminin bir parçası olmayan güçlü bir promotör olan *pr 1*'in kontrolü altındaki *lux* operonunu içeren diğer suşun (TA104 *pr 1*) eklenmesi, yanlış pozitif yanıtların (eğer ışık burada da indüklenirse) veya toksik bir yanıtın (arkaplan ışığı üretimi önemli derecede düşerse) belirlenmesine yol açar (Verschaeve ve ark. 1999).

Geleneksel olarak Tunus'ta tıbbi bitki olarak kullanılan *Marrubium alysson* L., *Retama raetam* (Forsk.) ve *Peganum harmala* L. bitkilerinin etil asetat ve metanol ekstraktları genotoksik özellikleri açısından *Salmonella typhimurium*'da VITOTOX testi ile araştırılmıştır. Tüm bitki ekstraktlarının 4-nitroquinoline oxide (4-NQO) ve benzo(a)piren'e karşı antigenotoksik özellikte olduğu bulunmuştur; fakat *R. raetam*'ın metanol ekstraktı S9 yokluğunda 4-NQO'ya karşı antigenotoksik bulunmamıştır. Aynı zamanda *R. raetam*'ın etil asetat ekstraktının S9 yokluğundaki VITOTOX testiyle mutajenik olduğu belirlenmiştir (Edziri ve ark. 2011).

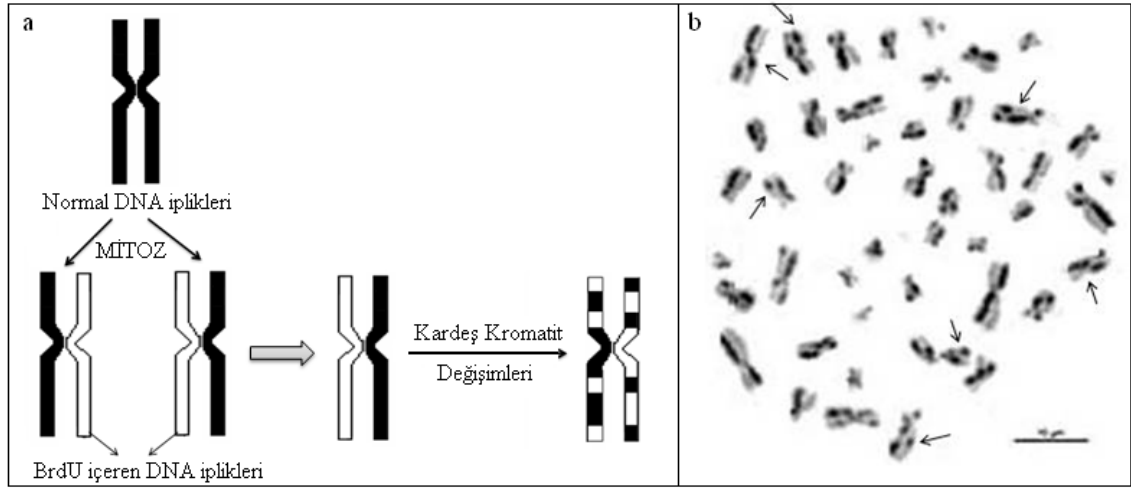
### 2.1.1.4. SOS-Kromotest

*Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium*'un genotoksik ajanlara yanıtı, 'SOS yanıtı' olarak bilinen kompleks bir gen sistemini tetiklemeleridir. SOS-kromotest prosedürü,  $\beta$ -galaktozidaz ( $\beta$  -Gal) geni *lacZ*'ye sahip *Escherichia coli* PQ37 suşunun operon füzyonu boyunca SOS genlerinden biri olan *sfiA*'nın kontrolü altına alınmasına dayanır (Quillardet ve Hofnung 1985).

## 2.1.2. Sitogenetik Test Sistemleri

### 2.1.2.1. Kardeş Kromatid Değişimi Testi (SCE)

Bu metod, replikasyon süresince kardeş kromatidlerin aralarındaki çift taraflı genetik değiş tokuşları gözlemlemek amacıyla iki kardeş kromatidin birbirinden farklı bir şekilde boyanması esasına dayanır. DNA replikasyonu süresince herhangi bir değiş tokuş meydana geldiğinde iki kardeş kromatid kırılır ve kırılan parçalar bir diğeriyle tekrar bir araya gelir (Şekil 2.1.2.1.1, Wilson ve Thompson 2007); bu doğal mekanizma, DNA hasarını indükleyen yeteneğinde olan genotoksik ajanlara maruz kalınmakla birlikte tekrar tekrar meydana gelir (Djelic ve ark. 2006).



**Şekil 2.1.2.1.1.** a-BrdU ile kardeş kromatid değişiminin belirlenmesi b-Kardeş kromatid değişimleri içeren metafaz plağı (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011)

Yapılan bir çalışmada kist hidatikli hastalara operasyon öncesi ve sonrası, özellikle kist hidatik olmak üzere pek çok helmintiazis tedavisinde kullanılan albendazol ilacı verilerek albendazolun muhtemel genotoksik etkileri kardeş kromatid değişimi yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışma sonunda albendazol uygulanan kist hidatikli 10 hastanın kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucunda SCE frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Altıntaş ve ark. 2005).

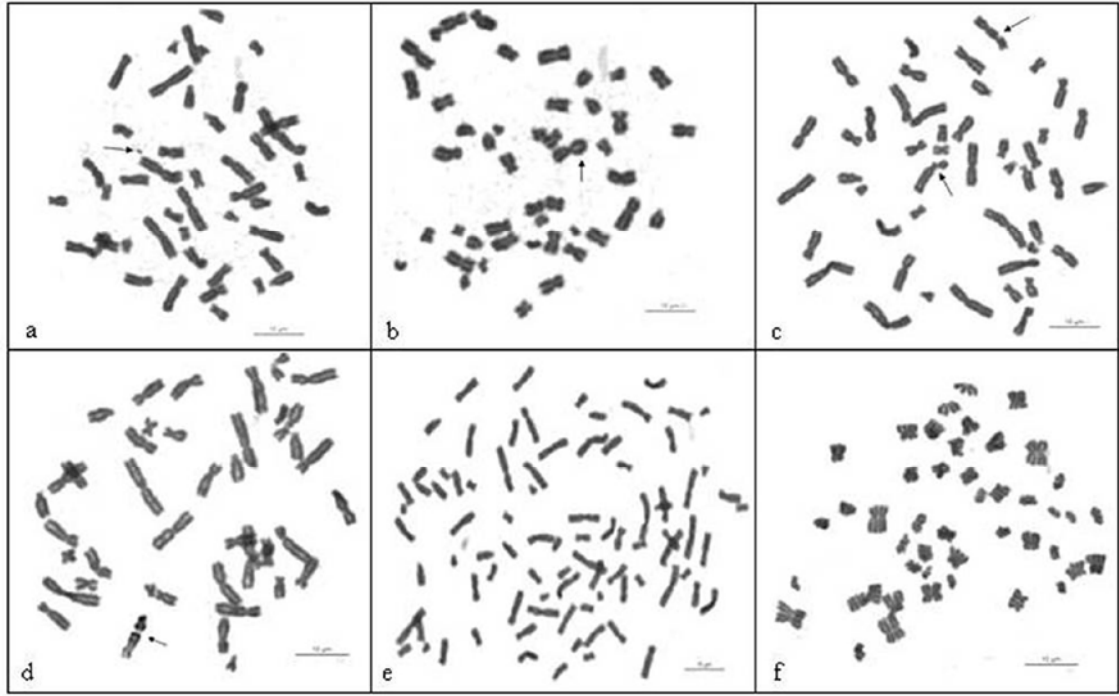
Kronik olarak iyonize radyasyona maruz kalan ve maruz kalmayan hastane çalışanlarından alınan periferik kan lenfositlerine, maruziyeti genotoksisite açısından değerlendirmek amacıyla kardeş kromatid değişimi testi uygulanmıştır. Sonuç olarak,

iyonize radyasyona maruz kalan grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her bir hücredeki ortalama SCE sayısı istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (Cardosa ve ark. 2001).

Bir diğer çalışmada ise, Crimean Congo Hemorrhagic Fever nedeniyle tedavi dozunda antiviral bir ilaç olan ribavirin kullanan 15 hastadaki ribavirinin genotoksitesisi kardeş kromatid değişimi yöntemiyle değerlendirilmiştir. Tüm hastalarda kardeş kromatid değişimi sıklığı tedavinin dokuzuncu gününde alınan kan örneklerinde, tedavi kesildikten bir ay sonra alınan kan örneklerine göre belirgin bir biçimde yüksek bulunmuştur. Ayrıca tedavi dozu alan hastaların dokuzuncu gündeki SCE sıklığı kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklı bulunmuştur. Sonuçlar ribavirinin insanlar üzerinde geri dönüşümlü bir genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Tatar ve ark. 2009).

#### **2.1.2.2. Kromozom Aberasyonu Testi (CA)**

Kültüre alınmış periferik kan lenfositlerindeki kromozomal aberasyon sıklığının incelenmesi ve genotoksik hasarın boyutunun tespiti, kromozomların en rahat gözlemlenebildiği metafaz evresinde yapılır. Kromozomların metafaz evresinde tutulabilmesi için kültüre kolsemid eklenir ve kromozomlardaki makrolezyonlar ile yapısal kromozom değişiklikleri değerlendirilebilir. En sık rastlanan kromozomal aberasyonların; kromatid açıklığı (gap), kromatid kırığı, kromozom kırığı, asentrik ve disentrik fragment, halka kromozom, kromatid değişimi, anoploidi ve poliploidi gibi sayısal kromozom bozulmaları, inversiyonlar ve translokasyonlar olduğu söylenebilir (Şekil 2.1.2.2.1., Brusick 1987, Mateuca ve ark. 2006).



**Şekil 2.1.2.2.1.** Kromozom aberasyonları içeren metafazlar a-Fragment, b-Kardeş kromatit birleşmesi, c-Kromatit kırıkları, d-Kromozom kırığı, e-Poliploidi, f-Endoreduplikasyon (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011)

Un ve peynirin beyazlatılmasında kullanılan benzoyl peroxide (BPO)'in genetik potansiyeli kromozom aberasyonu testi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak BPO, doza bağımlı bir şekilde kromozomal aberasyonları (CA) arttırmış ve proliferasyon indeksini (PI) de istatistiksel anlamda önemli olacak şekilde azaltmıştır (Yavuz ve ark. 2010).

Antrasiklin antibiyotikleri kanser kemoterapisinde yaygın bir şekilde kullanılırlar. Bir çalışmada, topoizomeraz hedefleyici antrasiklinler olan Doxorubicin ve Idarubicin'in kromozomal aberasyonlar üzerindeki etkisi periferik kan lenfositlerinde incelenmiştir. Her iki ilaç için de kromozomal aberasyon frekanslarında doza bağımlı önemli bir artış meydana gelmiştir. En sık görülen aberasyonlar ise; terminal delesyonlar, kırıklar, gapler, exchange'ler, fragment oluşumu ve intersitisyel delesyonlardır. Bu durum ilaçların klastojenik ve anöjenik olduğunu göstermiştir (Khan ve ark. 2009).

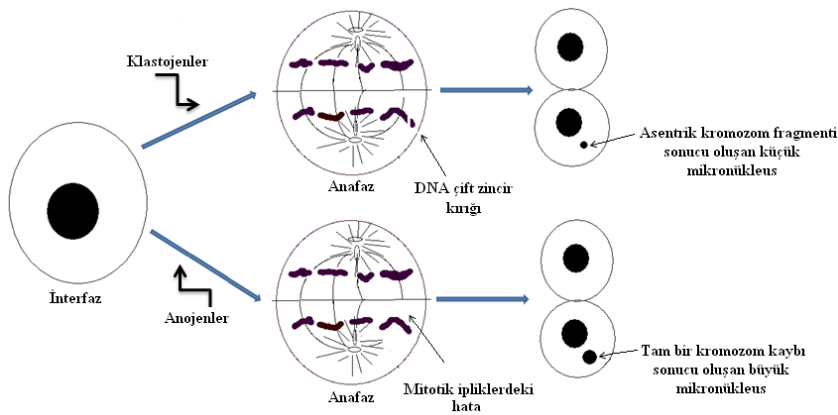
Peru'daki yer altı madenlerinde çalışan, kurşun ve çinko ağır metalleri, dizel emisyon partikülleri, organik çözücüler ve maden tozuna maruz kalan erkek maden işçilerinin periferik lenfositlerinde kromozom aberasyonları çalışılmıştır. Kontrol grubundaki



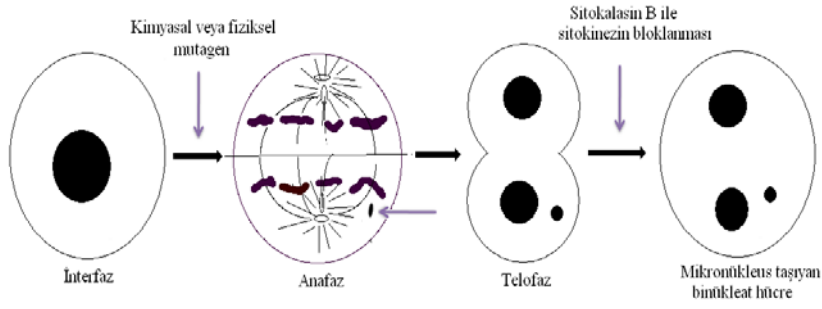
insanlarla karşılaştırıldıklarında maden işçilerinin lenfositlerindeki kromozomal aberasyonların (kromatid delesyonları ve kırıkları, kromozom kırıkları ve asentrik fragmentler) frekansında önemli bir artış olduğu görülmüştür (Santa Maria ve ark. 2007).

### 2.1.2.3. Mikronükleus Testi (MN)

MN testi, 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (Schmid 1975, Demirel ve Zamani 2002). Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkarlar ve ana çekirdeğe dahil olmazlar. Bunlar, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. Bu oluşumlar genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomlarda meydana gelen hasardan kaynaklanmaktadır (Şekil 2.1.2.3.1.) MN sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir. Bu metod, kültürde bir kez bölünmesini tamamlamış olan çift çekirdekli hücrelerde MN frekansını saptamaya yönelik olarak, sitokalazin-B ile sitokinezin bloklanması esasına dayanmaktadır (Şekil 2.1.2.3.2.). MN testi aynı zamanda, *in vitro* çalışmalarda nükleer bölünme indeksi (NDI) *in vivo* çalışmalarda ise polikromatik eritrositler ile normokromatik eritrositler arasındaki oran kullanılarak sitotoksitenin tahmin edilmesini de sağlamaktadır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).



**Şekil 2.1.2.3.1.** Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki mikronükleuslar (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011)



**Şekil 2.1.2.3.2.** Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücre oluşumu (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011)

Çeşitli kanser hastalarına ait, radyasyon tedavisinin başlangıcındaki, tedavinin ortasındaki ve tedavinin tamamlanmasından sonraki mikronükleuslu binükleat lenfositlerin (MNBNC) frekansı belirlenmiştir. Radyasyon tedavisinin başlangıcında olan hastaların mikronükleus frekansında, tedavi almayan sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında önemli bir artışın olduğu gözlenmiştir. Radyoterapinin ortasındaki hastaların çoğunun mikronükleus frekansında, tedavinin başlangıcındaki hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış olmuştur. Yine aynı şekilde, tedavisi tamamlanan hastaların mikronükleus frekansı diğer iki gruba göre anlamlı bir şekilde artmıştır (Jagetia ve ark. 2001).

*Helicobacter pylori* peptik ülser hastalığının patojenezinden sorumlu olan, gastrik karsinoma ve gastrik limfoma, koroner kalp hastalıkları, aterosklerozis ve ekzokrin pankreas kanseri ile ilişkili bulunan bir bakteri türüdür. *H. pylori* ile infekte olmuş hastaların periferal kan lenfositlerine olası genotoksik hasar belirlemek amacıyla mikronükleus testi uygulanmıştır. Sonuç olarak, infekte grubun mikronükleuslu binükleat hücre frekansı kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda yüksek bulunmuştur. Fakat kontrol grubu ve infekte grup arasında nükleer bölünme indeksi açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Suarez ve ark. 2007).

Mesleki yaşamlarında kurşuna maruz kalan otomotiv işçilerinin periferal kan lenfositleri genotoksiste açısından incelenmiş, lenfositlerdeki mikronükleus frekansı kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda, kurşunun nükleer proliferasyon üzerindeki etkisinin göstergesi olan nükleer bölünme indeksi değerleri de

kurşuna maruz kalan grupta kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur (Minozzo ve ark. 2004).

#### **2.1.2.4. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektrofrez)**

Kırık DNA'nın alkali elektrofrez sırasında hücre dışına çıkması ile iplik kıvrılmaları, çapraz bağlanma, alkali labile site gibi DNA hasarlarını ve kesip-çıkarma onarım bölgelerindeki hataları yansıtan kuyruklu yıldız görüntüsünden adını alan floresan mikroskopik bir yöntemdir (Singh ve ark. 1988, Kramer 1998) (Şekil 2.1.2.4.1.) Komet testi, Singh ve ark. (1988) tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak için alkali şartlar altında (pH>13) elektrofrez içeren mikrojel tekniği kullanılarak uygulanmıştır. Diğer genotoksisite test yöntemleri ile karşılaştırıldığında düşük düzeydeki DNA hasarlarının saptanabilmesindeki yüksek duyarlılığı, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti Komet yönteminin avantajlarından (Tice ve ark. 2000).

İmidacloprid ve RH-5849 adlı iki pestisit genotoksisitesi komet yöntemiyle insan periferik kan lenfositlerinde araştırılmıştır. Pestisitlere maruz kalan tüm insanlar bu pestisitlere maruz kalmayan insanlarla karşılaştırıldıklarında DNA hasar düzeyi dağılımının önemli derecede farklı olduğu gözlemlenmiştir (Feng ve ark. 2005).

Periferik kan lenfositleri kadmiyum kloridin ( $CdCl_2$ ) genotoksik etkileri *in vitro* olarak komet yöntemiyle değerlendirilmiştir. Sağlıklı, sigara içmeyen donörlerden alınan tam kanlar belirli dozlardaki kadmiyum klorid ile inkübe edilmiş, test sonuçlarında da dikkat çeken bireyler arası farklılıklar görülmüştür (Rozgaj ve ark. 2002).

İki inhalasyon anestezi ilacı olan Halotan ve Isofluran'ın genotoksik özellikleri *in vitro* komet yöntemiyle çalışılmıştır. Sonuç olarak, her iki anestezi ilacı ile indüklenmiş DNA zincir kırıkları ve alkali-labile bölgeleri toplam komet uzunluğu olarak ölçülmüştür. Aynı zamanda her iki ilacın da doza bağımlı olarak DNA göçünü artırma yeteneğinde oldukları bulunmuştur (Jałoszynski ve ark. 1999).

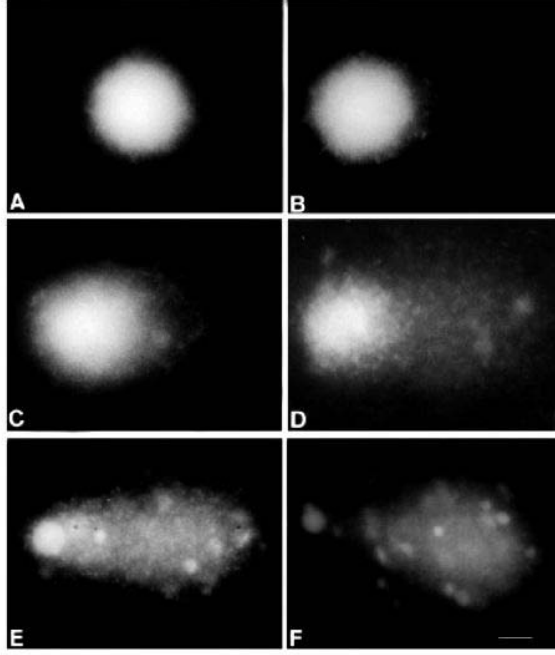


Figure 1 - Photomicrographs showing the classification of *Ctenomys torquatus* blood cells in the comet assay. A, Class 0, undamaged; B, class 1; C, class 2; D, class 3; E, class 4, maximum damage; F, apoptotic cell. Bar= 10 µm.

**Şekil 2.1.2.4.1.** Komet testi sonucu elde edilen hücrelerdeki DNA hasar tipleri A-Tip 0, B-Tip 1, C-Tip 2, D-Tip 3, E-Tip 4, F-Apoptotik hücre (Silva ve ark. 2000)

## 2.2. Halk Tıbbında Tedavi Amaçlı Kullanılan Bitkiler ve Genotoksik/Antigenotoksik Araştırmaları

Bitkiler binlerce yıldan beri tedavi amaçlı kullanılmaktadır. İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır (Koçyiğit 2005).

Tıbbi bitkiler, hastalıkları önlemek, sağlığı sürdürmek veya hastalıkları iyileştirmek için ilaç olarak kullanılan bitkilerdir. Tıbbi bitkilerin hastalıkların tedavisinde bir kaynak olarak kullanılmasının ilk bilimsel izleri ve yazılı delilleri 5000 yıl öncesi erken dönem Çin, Hint ve Yakındoğu medeniyetlerine kadar uzanmaktadır (Sütlüpinar 2005). Kuzey Irak'ta Sanidar Mağarası'nda 1957-1961 yılları arasında yapılan kazılarda bulunan Neandertal insan kalıntıları yanında mezarda bulunanlar, bitki-insan ilişkisinin başlangıcına ait ilk veri olarak kabul edilir. 60 bin yıl öncesinden günümüze gelen ve bir şamana ait olduğu düşünülen bu mezarda, civanperçemi (*Achillea millefolium*), kanarya otu (*Senecio ovatus*), mor sümbül (*Hyacinthus orientalis*), gül hatmi (*Alcea rosea*), peygamber çiçeği (*Centaurea cyanus*) ve efedra (*Ephedra sinica*) gibi bitki türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Ölülerini gömmeye başlayan bir toplumda, ölen kişinin

tekrar yaşama döndüğünde kullanacağı düşüncesiyle mezara konulduğu tahmin edilen bu bitkilerin, yenenler ve şifalı olanlar diye ayrılmaya başlandığının da bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Çünkü bu bitki türleri günümüzde de özellikle tıbbi bitki olarak hala önemlidir (Lewin 2000, Heinrich ve ark. 2004).

Anadolu'da tıbbi bitkilerin kullanımına ait en eski bilgiler ise Hititlerin başkenti Hattuşaş'ta keşfedilen Hitit tabletlerinde bulunmuştur. Adem otu, badem, sarımsak, söğüt, zeytin, üzerlik, haşhaş, hardal, mazi ve meyanın reçetelerde kullanılmış olduğu kayıtlıdır. Adana-Kozan yakınlarında Anazarva'da doğan Dioscorides'in M.S. 1. yy'da yazdığı 'Materia Medica' isimli kitabında 500'den fazla tıbbi bitki kayıtlıdır. Selçuklu ve Osmanlı dönemlerinde birçok tıbbi bitkinin kültürü ve ticareti yapılmış ve bunlar tedavide de kullanılmıştır. Bu bilgiler tıbbi bitkilerin Anadolu'da binlerce yıldır kullanıldığını göstermiştir (Sütlüoğlu 2005).

Bitkilerin ürettiği doğal ürünler olan primer ve sekonder metabolitler doğrudan ve dolaylı olarak endüstrinin en temel ürünleridir. Bitkiler, topraktan aldıkları su, mineral ve bazı öğeleri kendi metabolizmalarında insan vücudunun özümleyebileceği bileşimlere dönüştürürler. Temel besin öğelerinden, karbonhidratlar, proteinler, yağlar, vitaminler ve mineraller bunlara örnektir. Bunlar bitki metabolizmasında oluşan ağırlıklı olarak kullanılan etken maddelerdir (Örneğin eterik yağlar (uçucu yağlar, esanslar), alkaloidler, tanenler ve acı maddeler). Vücudun savunma gücünü artırır, organların işlevlerini destekler ve/veya iyileşmeyi hızlandırır. Böylece organizmadaki belirli dokuların ve organların işlevlerine olumlu etki yaparlar (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

Tıbbi bitkiler önemli biyolojik aktif bileşiklerin kaynağıdır. Bazıları antiinflamatuvar ve antikanser aktivitelerinin yanında bakteriyel, fungal ve protozoal organizmalara karşı güçlü antimikrobiyal aktivitelere sahiptirler (Hernandez ve ark. 2000; Polya 2003). Birçoğunun ise antispazmodik etkilerinin olduğu, gastrointestinal taşımayı geciktirdikleri, gut motilitesini baskıladıkları, su absorpsiyonunu uyardıkları ve elektrolit salınımını azalttıkları belirtilmektedir (Palombo 2006). Tıbbi bitkilerden elde edilen biyolojik aktif bileşikler yeni ve etkili farmosötiklerin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Çizelge 2.2.1.) Bu durumun önemli bir nedeni de kullanılan

antibiyotik ajanlarına karşı gelişen patojen organizmaların direnç ve yan etki oluşturmalarıdır (Essawi ve Srouf 2000).

**Çizelge 2.2.1.** Modern tıp pratiğinde yaygın olarak kullanılan ana ilaçlardan bitkisel kaynaklı olanlara çok bilinen örnekler (Sütlümar 2005)

Atropine, Hyoscyamine ve Scopolamine
Codeine
Colchicine
Digitoxin ve Digoxin
Ephedrine ve Pseudoephedrine
Morphine
Physostigmine
Pilocarpine
Quinidine
Quinine ve Artemisinin
Reserpine
Stereoitler (Diosgenin'den)
Vincristine ve Vinblastine

İnsanlık tarihi boyunca birçok hastalık (seker hastalığı, sarılık, nefes darlığı vb.) bitkiler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmış ve çalışılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir (Dünya nüfusunun % 80'i). Ayrıca, gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık % 25'ini bitkisel kökenli etken maddeler (vinblastin, rezepin, kinin, aspirin vb.) oluşturmaktadır (Farnsworth ve ark. 1985).

20. yy'da organik kimya, biyoloji ve tıp bilimindeki gelişmeler, etkili sentetik ilaçların tanıtılmasına ve tüketilmesine olanak sağlamış, bitkisel ilaçların modern tıpta kullanılmasının önüne geçmiştir. Bununla birlikte, halkın bitkisel bileşiklere olan ilgisi endüstrinin gitgide büyüyen tüketici isteklerini karşılamak amacıyla yeni bitkisel ürünler pazarlamasına ve bu bitkilerin daha fazla miktarda üretimine başlamasına yol açmıştır (Sharifuddin ve ark. 2012). Tıbbi bitkilerin 20. yy'dan itibaren yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmasının nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

- 1- Yeterli düzeyde bir kimya endüstrisine sahip olmayan kalkınmakta olan ülkelerde bitkilerden yararlanarak kolay ve ucuz bir tedavi olanağı sağlanmaktadır.
- 2- Tedavi alanına sokulan yeni sentetik maddelerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkiler bitkisel ilaçlarda daha az sıklıkta görülmektedir.
- 3- Bazı bitkisel ilaç hammaddeleri sentetik olanlardan daha ucuza ve daha basit elde edilmektedir.
- 4- Genellikle tek bir etkiye sahip olan sentetik ilaçlara göre etki alanları daha geniştir (Toker 2002).

Tüm doğal ürünlerin güvenli ve yan etkisiz olduklarının kabul edilmesi halk arasında popüler bir görüştür. Ayrıca, bitkisel ürünlerin besin takviyesi olarak dağıtımını da riskleri açısından ayrıntılı bir biçimde değerlendirilmiş olan sentetik ilaçların dağıtımından çok daha kolay olmaktadır. Bu durum, minör ve kronik hastalıkların tedavisi için reçetenin gerekli olmadığı bitkisel ürünlerin kalitesi, yararlılığı ve güvenliliğini sağlamak gerektiğinin altını çizmektedir. Pek çok bitki geleneksel kullanımlarına dair uzun bir geçmişe sahiptir; fakat birçoğunun uygun bilimsel standartlar tarafından ispatlanmamış etkileri mevcuttur. Buna ek olarak, bu bitkilerin tarih boyunca kullanımı onların, özellikle hızlı ve kesin bir şekilde klinik belirtiler ortaya çıkarmayan toksik ve genotoksik etkilere karşı tamamen güvenli olduğunu göstermemektedir (Sharifuddin ve ark. 2012). Yaygın bir şekilde kullanılan tıbbi bitkilerin bazıları yan etkilere neden olabilirler ve diğer ilaçlarla etkileşime girme potansiyeline sahiptirler (Zinck and Chaffin 1998). Ayrıca bu bitkilerin insan genomunda mutasyona sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması da son derece önemlidir. Bir kimyasal maddenin/natural bir bileşiğın böyle bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi kısa süreli genotoksisite testleri ile belirlenebilmektedir. Bu nedenle bitkisel tedavinin potansiyel riskleri üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır.

Genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmaları halk tıbbında kullanılan bitkilerin ve bitkisel ürünlerin güvenliliği ve etkililiğini değerlendirmeye yardımcı olabilir. Fiziksel ve kimyasal mutajenlerin etkisi ile ökaryotlarda meydana gelebilecek gen ve kromozom hasarlarının analizi için monitör sistem olarak *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicon*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Vicia faba*, *Tradescantia*, *Allium*

*cepa*, *Crepis capillaris*, *Lilium*, *Pisum sativum* ve *Nicotiana tabacum* gibi bitkilerin kullanılabilceği Nilan ve Vig (1976), Grant (1978 ve 2001) tarafından önerilmiştir. Kihlman (1975) ile Nilan ve Vig (1976) bitkilerin genotoksisite deneylerinde kullanılmasının avantajlarını, hayvanlarınkine benzer kromozom organizasyonlarının olması, çoğu bitkinin kolay büyümesi, üreme sürelerinin kısa olması, düşük maliyet ve küçük alanlarda yaşatılabilmeleri, doğal ortamlarında farklı çevresel koşullar (pH ve sıcaklık) altında yetiştirilebilir olmaları şeklinde özetlemişlerdir.

Dünya’da ve Türkiye’de tedavi amaçlı kullanılan bitkiler ve bu bitkilerle yapılan genotoksisite ve antigenotoksisite araştırmaları şu şekildedir:

Asteraceae familyasına ait olan *Helichrysum* Mill. çoğunlukla ‘ölmez çiçek’ olarak bilinir. *Helichrysum* türleri, safra düzenleyici ve diüretik özelliklerinden dolayı Türkiye’de yüzyıllardır safra kesesi hastalıklarına karşı bitki çayı olarak kullanılmışlardır. *H. arenarium* antioksidan, hepatoprotektif, kolagog (safra söktürücü), koleretik (safra hacmini fazlalaştırıcı), antibakteriyel, antiviral ve antifungal aktiviteleri içeren çeşitli biyolojik özellikler gösterir. Bundan başka bu türler flavonoidler, fenolikler, polifenoller, flavonlar, esansiyel yağlar, polisakkaritler, glikozidler ve kumarinler gibi pek çok aktif bileşiğin kaynağıdırlar. Bunların yanında, *Helichrysum* türlerinden *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*’un insan lenfositlerinde MN oluşumunu indüklediği, Mİ ve PRI’ı ise düşürdüğu bulunmuştur. Bu *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*’un genotoksik etkileri olduğuna dair değişmez bir göstergedir. Hücre proliferasyonundaki düşüş *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*’un aynı zamanda antimitotik ve antikarsinojenik bir ajan olma potansiyelini gösterebilir. Çalışılan diğer *Helichrusum* türlerinden *Helichrusum arenarium* subsp. *rubinducum* ve *Helichrysum arenarium* subsp. *aucheri*’nin ise, genotoksik etkilerinin olmadığı gösterilmiştir (Eroğlu ve ark. 2009).

*Senecio* L. cinsi Asteraceae familyasındandır. *Senecio trapezuntinus* Trabzon’a ait endemik bir türdür. *Senecio trapezuntinus*’un metanol ekstraktının *in vitro* genotoksik potansiyeli insan lenfositlerinde mikronükleus test yöntemiyle (MN) araştırılmıştır. *Senecio trapezuntinus* insan lenfositlerinde mikronükleus oluşumunu indüklemiş, mitotik ve proliferatif indeksi ise azaltmıştır. Mitotik ve proliferatif indekslerin azalması



*Senecio trapezuntinus*'un bir antiproliferatif ve antimitotik ajan olduğunu gösterirken, mikronükleusların artması yüksek konsantrasyonlardaki *Senecio trapezuntinus*'un karsinogenik ve genotoksik olabileceğini gösterir (Eroğlu ve ark. 2009).

Esansiyel yağlar, genellikle distilasyon metodu ile bitkilerden ekstrakte edilen kimyasal bileşiklerin veya kompleks hidrokarbonların (genellikle terpenler) karışımından oluşan uçucu yağ çeşitlerindedir. Bitkilerden elde edilen bu esansiyel yağlar kozmetik sektöründe güzel koku vermeleri, yiyecek ve içecekleri tatlandırılmaları, çeşitli temizlik ürünlerine koku vermeleri ve parfüm kimyasallarının sentezinde ara ürün olmaları nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Woolf 1999). Bu nedenlerden dolayı sıklıkla kullanılan *Anethum graveolens* (Dereotu), *Mentha piperita* (Nane) ve *Pinus sylvestris* (Sarıçam) bitkilerinin esansiyel yağlarının genotoksitesisi insan lenfositlerinde kromozom aberasyonu (CA) ve kardeş kromatid değişimi (SCE) testleri ve SMART testi ile çalışılmıştır. Kromozom aberasyonu (CA) testinden elde edilen bulgulara göre en genotoksik esansiyel yağ dereotu tohumlarından elde edilen yağ olurken bunu dereotunun gövdesinden elde edilen yağ, nane gövdesinden elde edilen yağ ve sarıçam iğnesinden elde edilen yağ izlemiştir. SCE testinde ise yine en genotoksik esansiyel yağ dereotu tohum ve gövdesinden elde edilen yağlar olmuştur. Dereotu tohum ve gövdesinden ve sarıçam iğnesinden elde edilen yağlar doza bağımlı olarak CA ve SCE frekansını indüklerken, nane gövdesinden elde edilen yağ doza bağımlı olmaksızın SCE frekansını indüklemiştir. Bununla birlikte bu üç bitkiden elde edilen yağlar insan lenfositleri için sitotoksiktir. SMART testinde ise, sarıçam iğnesi ve dereotu gövdesinden elde edilen esansiyel yağların mutasyon frekansını doza bağlı bir şekilde arttırdıkları gözlemlenmiş, yine nane gövdesinden elde edilen yağın mutasyon frekansını dozdan bağımsız olarak arttırdığı gözlenmiştir (Lazutka ve ark. 2001).

Etiyopya'da halk tıbbında sıtma ve çeşitli topikal ve sistemik mikrobik enfeksiyonların tedavisinde kullanılan, temel kimyasal bileşenleri plumbagin, plumbagic asid glikozidi ve kumarin olan *Plumbago zeylanica* kökü; antifertilite ajanı olarak kullanılan, temel kimyasal bileşenleri saponin, fitosterol ve polifenol olan *Rumex steudelii* kökü; temel kimyasal bileşenleri timol ve karvakrol olan, halk tıbbında hipertansiyon, fungal ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan *Thymus schimperi* kuru yaprakları; saponin ve flavonoidlerin farklı tiplerdeki kimyasal bileşenlerine sahip, tenya

enfestasyonu tedavisinde kullanılan *Glinus lotoides* tohumlarının hidroalkolik ekstraktlarının DNA'ya hasar verici etkileri comet testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Mouse lymphoma L5178Y hücreleri bu bitki ekstraktlarına maruz bırakıldığında tüm ekstraktların hücre canlılığını etkilemeksizin DNA hasarını önemli ölçüde indüklediği bulunmuştur (Demma ve ark. 2009).

Bir diğer çalışmada, dünya çapında antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle kullanılan altı bitkisel infüzyona (*Matricaria chamomilla*, *Tilia cordata*, *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Uncaria tomentosa* ve *Valeriana officinalis*) antigenotoksisitelerinin belirlenmesi amacıyla *Drosophila melanogaster*'de SMART testi uygulanmıştır. Oksidatif genotoksikant olarak hidrojen peroksit kullanılmış olup infüzyonların hiçbiri anlamlı bir genotoksisite göstermemiştir, aksine mutajen hidrojen peroksiti detoksife ederek desmutajen gibi davranmışlardır. Bu bitki infüzyonlarının fenolik içeriklerinin, hidrojen peroksit tarafından üretilen reaktif oksijen radikallerinin muhtemel süpürücüleri oldukları da öne sürülmüştür (Romero-Jimenez ve ark. 2005).

Tayland'da seksüel eğilimi arttırmak amaçlı baharat olarak kullanılan *Mucuno colletti* bitkisinin mutajenik/antimutajenik potansiyeli Ames testi ve *in vivo* mikronukleus testi (MN) ile belirlenmiştir. Ames testi sonuçları *Mucuno colletti* ekstraktının doza bağımlı olarak güçlü bir sitotoksik etkisi olduğunu göstermiştir. Mikronukleus testi de *Mucuno colletti* ekstraktının yüksek dozda ve uzun süreli maruziyette, test edilen deney hayvanlarında mikronukleus oluşumunu indükleyerek mutajenik olduğunu kanıtlamıştır (Cherdshevasart ve ark. 2007).

Halk tıbbında antiinflamatuvar etkisinden dolayı soğuk algınlığı tedavisinde ve aynı zamanda baharat olarak kullanılan *Zingiber zerumbet*'in (Zencefil) rizomlarından izole edilen seskiterpen bir bileşik olan zerumbon (ZER) un genotoksik potansiyeli insan lenfositlerinde kromozom aberasyonu (CA) ve mikronukleus (MN) test yöntemleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. ZER'in çeşitli insan tümör hücrelerine karşı antikanser ve apoptozisi indükleyici özelliği olduğu bulunmuş bu durum da araştırmacıları ZER'in genotoksik potansiyelini çalışmaya itmiştir. Kromozom aberasyonu test sonuçları ZER'in klastojenik olmadığını, MN test sonuçları ise mikronukleus oluşumunda doza bağımlı bir artışın olduğunu göstermiştir; fakat ZER'in insan periferik kan lenfositleri

üzerindeki tüm klastojenik etkisi anlamlı değildir. Sonuç olarak ZER, insan periferel kan lenfositleri üzerinde sitotoksiktir, fakat klastojenik değildir (Al-Zubairi ve ark. 2010).

Mide ile ilgili hastalıkların tedavisinde antibakteriyel ve antifungal aktivelere dolay kullanılan yedi tane medikal bitkinin (*Canthium spinosum*, *Conostomium natalensis*, *Cassinopsis ilicifolia*, *Coddia rudis*, *Crassula multicaeva*, *Lagynia lasiantha*, *Tetradenia riparia*) genotoksik potansiyelleri Ames testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm etanol bitki ekstraktlarının metabolik aktivasyonsuz *Salmonella typhmuri* test soyları TA98, TA100 ve TA1537'ye karşı nonmutajenik oldukları bulunmuştur (Okem ve ark. 2012).

Daha önce yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilen bitki ekstraktlarının ksenobiyotik etkilerde düzenleyici rol oynadıklarını açığa çıkarmıştır. Bazı aktif prensiplerin tanımlanması ve karakterizasyonu insanlarda kanser oluşma riskini azaltmaya yönelik stratejilerin geliştirilmesine yol açabilir. Antioksidan, antiinflamatuvar, immün sistem düzenleyici, antitümör, antiproliferatif, radyoprotktif ve antigenotoksik özelliklere sahip olan ve Hindistan'da çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan, *Centella asiatica* L.'nin aseton ekstraktının antigenotoksik etkisi, insan lenfositleri üzerinde CPA'nın (cyproterone acetate, hem genotoksik bir ajan hem de tümör oluşturucu bir ajan olan sentetik progestin) indüklediği genotoksik etkiye karşı çalışılmıştır. Antigenotoksik etkileri belirlemek amacıyla kromozom aberasyonu (CA) ve kardeş kromatid değişimi (SCE) testleri kullanılmıştır. Her iki test sonucunda da CPA'nın genotoksik hasarında açık bir şekilde doza bağımlı bir düşüş gözlenmiştir (Siddique ve ark. 2008).

Brezilya'da antiülserojenik, analjezik, erkek antifertilitesi, antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı geleneksel halk tıbbında yaygın bir şekilde kullanılan *Austroplenckia populnea* bitkisinin kabuk kısmından elde edilen kloroform ekstraktının genotoksik etkileri çeşitli test sistemleriyle araştırılmıştır. Swiss farelerin periferel kan hücreleri ve Wistar sıçanların kemik iliği hücreleri üzerinde *in vivo* comet testi uygulanmıştır. Test sonuçlarına göre test edilen dozlarda periferel kan hücrelerinde DNA hasarını indüklemiştir; fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir artış değildir.

Mikronukleus ve kromozom aberasyonu testlerinde ise, Swiss farelerinin ve sıçan kemik iliği hücrelerinin mikronukleuslu polikromatik eritrosit (MNPCE) sayılarında ve sıçan kemik iliği hücrelerindeki kromozom aberasyonu sayılarında önemli bir artış gözlenmemiştir. Dolayısıyla *A. populnea* kabuk ekstraktı test edilen hücrelerde herhangi bir genotoksik ve klastojenik etki göstermemiştir (Ribeiro ve ark. 2009).

Aloesin, *Aloe* spp. bitkisinin bir bileşenidir (chromone). Pürgatif (bağırsakları boşaltıcı), antiinflamatuvar, antidiyabetik, antineoplastik, immün sistem baskılayıcı, antioksidan, serbest radikal süpürücü ve organ koruyucu özelliklerinin yanında metabolik sendromlu veya pre-diyabetik durumu olan insanlarda yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir ve fonksiyonel bir gıda bileşeni potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada, *in vitro* ve *in vivo* testlerle aloesinin güvenilirliği değerlendirilmiştir. Buna göre aloesin, 10.000 µg/plate'e kadar test edilen hiçbir dozunda *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'de reverse mutasyonları indüklememiş (Ames testi), benzer bir biçimde 10.000 µg/ml'ye kadar test edilen konsantrasyonlarının hiçbirinde Chinese hamster akciğer hücreleriyle inkübe edildiğinde kromozom aberasyonu sıklığını arttırmamıştır. *In vivo* çalışmada ise, farelere oral yoldan iki gün üst üste verilen aloesinin mikronukleuslu eritrosit sıklığında herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları aloesinin genotoksik potansiyelinin bulunmadığını kanıtlamıştır (Lynch ve ark. 2011).

Besin ve kozmetik endüstrisinde ticareti yapılan, halk tıbbında antihipertansif, antinosiseptif, anksiyolitik, antipsikotik ve antioksidan etkilerinden dolayı intestinal hastalıkların, hipertansif kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan *Alpinia zerumbet*'in esansiyel yağının genetik toksisitesinin kültüre edilmiş insan lökositlerinde çalışmaları yapılmıştır. Bunun için *in vitro* comet, kromozom aberasyonu testleri ve *in vivo* comet ve mikronukleus testleri uygulanmıştır. Tüm testlerde elde edilen sonuçlar *Alpinia zerumbet*'in insan lökositlerinde ve fare kemik iliğinde herhangi bir genotoksik etki oluşturmadığını göstermiştir (Cavalcanti ve ark. 2012).

Sabun, diş macunu, şampuan, deodorant ve gargara gibi pek çok farklı ürünün içeriğinde bulunan, *Thymus vulgaris* ve *Thymbra spicata* türlerinin esansiyel yağlarının temel bileşeni olan timolün; bronşit ve akciğer rahatsızlıklarını rahatlatıcı, düz kasları

rahatlatıcı, sindirime yardımcı, menstrual krampları azaltıcı ve solunum rahatsızlıklarını azaltıcı etkileri bilinmektedir. Timolün genotoksik etkileri insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (SCE), kromozom aberasyonu (CA) ve mikronukleus (MN) testlerinde incelenmiştir. Aynı zamanda sitotoksik etkilerini belirlemek için de nükleer bölünme indeksi (NDI), replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeks (MI) de hesaplanmıştır. Yapılan çalışmaların sonucunda şu bulgular elde edilmiştir: Timol, düşük konsantrasyonlarda bile SCE frekansını önemli ölçüde arttırmış ve tüm konsantrasyonlarında hem yapısal kromozom aberasyonlarını indüklemiş hem de MN frekansını arttırmıştır. İki uygulama periyodunda (24. ve 48. saat) doza bağımlı olarak NDI'yi azaltmıştır. 24 saatlik uygulamada RI'yi istatistiksel olarak anlamsız bir şekilde azaltmış ve en yüksek konsantrasyonda MI'yi da azaltmıştır (Büyükleyla ve Rencuzoğulları 2009).

Meksika halk tıbbında mental hastalıkların tedavisinde yatıştırıcı ve sakinleştirici amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılan *Galphimia glauca* bitkisinin üç farklı ekstraktının (aköz, etanolik ve metanolik) genotoksik etkileri *in vitro* ve *in vivo* modellerde incelenmiştir. Kardeş kromatid değişimi (SCE) *in vitro*, testi uygulanan insan periferik lenfositlerinde *Galphimia glauca*'nın tüm ekstraktlarının test edilen hiçbir konsantrasyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında genotoksik etki göstermediği kanıtlanmıştır. Yine aynı şekilde, lenfositlere uygulanan mikronukleus (MN) testi sonuçlarına göre; tüm ekstraktların hiçbir konsantrasyonunun lenfositlerdeki mikronukleuslu hücre frekansını kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttırmadığı gösterilmiştir (Aguilar-Santamari ve ark. 2007).

*Chenopodium ambrosioides*, Latin Amerika halk tıbbında kullanılan antihelmintik bir baharattır. Bu baharatın aköz ekstraktı insan lenfosit kültürlerine bitkinin genotoksitesini belirlemek amacıyla eklenmiştir. Sonuçlar kromozom aberasyonu (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mitotik indeks (MI) parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Testler sonucunda bitki ekstraktının test edilen tüm dozlarının kontrol grubuna göre kromozom aberasyonlu hücre ortalamasında ve SCE frekansında bir artış, mitotik indekste ise bir azalış meydana getirdiğini göstermiştir. Bitkinin, içeriğindeki farklı aktif maddelerden dolayı muhtemel bir genotoksik etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (Gadano ve ark. 2002).

*Hemidesmus indicus*, cüzzam, lökoderma (ak deri), vajinal akıntı, sifiliz, romatizma, astım ve bronşit tedavileri için Ayurveda (eski Hindu hekimlik ve uzun yaşam sanatı) tıbbında yaygın bir biçimde kullanılmakta olan bir bitkidir. Aynı zamanda yine halk tıbbında yılan ısırmasına karşı kan temizleyici olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, bitkinin kökünden elde edilen etanolik ekstraktının genotoksik ve antigenotoksik potansiyeli kültüre edilmiş insan lenfositlerinde değerlendirilmiştir. Antigenotoksik etkinin değerlendirilmesi için pozitif kontrol olarak mutajen bir ajan olan cisplatin kullanılmıştır. Yapılan testler sonucunda, düşük konsantrasyonlarda kültürlerle eklenen bitki ekstraktının, cisplatin ile indüklenmiş kardeş kromatid değişimleri (SCE), kromozom aberasyonları (CA) ve mikronukleuslu binükleat hücre frekanslarında önemli bir azalış meydana getirdiği bulunmuştur. Yüksek dozlardaki ekstrakt ise kromozom aberasyonu ortalamasında anlamlı bir artış meydana getirmiştir. Bununla birlikte ekstrakt, proliferatif indeksi (PRI), mitotik indeksi ve sitokinez-blok proliferatif indeksi de düşürmüştür. Sonuç olarak, *Hemidesmus indicus* kök ekstraktı düşük konsantrasyonlarda genoprotektif etkiye sahipken, yüksek dozlarda sitotoksik ve genotoksiktir (Ananthi ve ark. 2010).

Yapılan bir çalışmada, Meksika halk tıbbında böbrek hastalıkları ve tip II diyabet tedavileri için kullanılan *Equisetum myriochaetum* bitkisinin fitoterapötik ekstraktının genotoksitesini *in vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ve *in vitro* mikronukleus testi (MN) ile araştırılmıştır. Yapılan her iki testte de eş zamanlı negatif kontrol (su çözgeni) serisi ile karşılaştırılan ekstraktla muamele edilen seriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamıştır. Sonuçlar göstermiştir ki; *Equisetum myriochaetum* bitkisinin fitoterapötik ekstraktı test edilen deneysel koşullar altında *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda genotoksik değildir (Tellez ve ark. 2007).

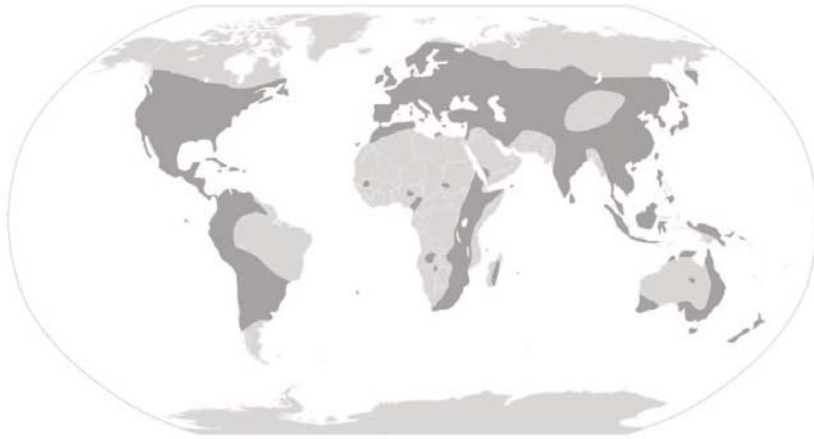
Sedatif ve anksiyolitik özelliklerinden dolayı halk tıbbında ve hatta ilaç sanayinde yaygın bir şekilde kullanılmakta olan *Passiflora alata*'nın genotoksik olup olmadığı Brezilya'da yapılan bir çalışmada araştırılmıştır. Bu amaçla genotoksitesini, fare periferik kan ve kemik iliği hücrelerinde mikronukleus testi (MN) ve fare periferik kan lökositlerinde comet testi ile değerlendirilmiştir. Comet testi sonucunda *Passiflora alata*'nın aköz ekstraktının çeşitli konsantrasyonları kontrol grubuna göre doza bağımlı

olarak artış gösteren DNA hasarı meydana getirmiş, MN testi sonucunda ise her iki sistemde de doza bağımlı olarak mikronukleuslu hücre frekansında artış belirlenmiştir (Boeira ve ark. 2010).

*Punica granatum* (Nar) meyvesi, solunumsal hastalıkların tedavisi için etkili bir ilaç olarak Küba halk tıbbında uzun yıllardır kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu meyvenin aköz ve hidroalkolik ekstraktlarının influenza virüsüne karşı yüksek bir antiviral aktivite gösterdiği de kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmada *Punica granatum*'un genotoksitesini Ames, kardeş kromatid değişimi (SCE), mikronukleus (MN) ve kromozom aberasyonu (CA) testleri ile araştırılmış ve her bir test sisteminde bu meyvenin genotoksik özelliklere sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Sanchez-Lamar ve ark. 2008).

### **2.3. Halk Tıbbında *Hypericum*'un Tedavi Amaçlı Kullanımı ve Genotoksite Araştırmaları**

Dünya'da Afrika, Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'da tropik ve subtropik bölgelerde yayılım gösteren (Şekil 2.3.1), 400 kadar türle temsil edilen *Clusiaceae* (*Hypericaceae*=*Guttiferae*) familyasına bağlı *Hypericum* L. cinsinin Türkiye'de 84 türü bulunmaktadır (Davis 1967, Davis ve ark. 1988, Güner ve ark. 2000). Yurdumuz *Hypericum* türleri bakımından önemli bir gen merkezidir (Tokur 1988).



**Şekil 2.3.1.** *Hypericum* türlerinin Dünya üzerindeki dağılımı (Robson 1977)

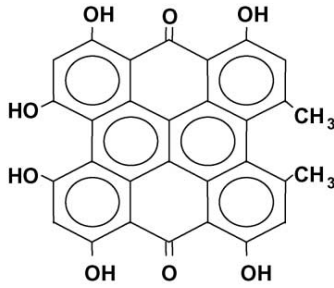
*Hypericum* L. cinsine ait bitkiler genellikle kuru, kalkerli veya eski kalker taşlı topraklarda, ışıklı ormanlarda, çayırlarda, bataklık ve sahillerde, kayalık yerlerde, yol kenarlarında, ekim yapılmayan tarlalarda ve 2000-2400 m yüksekliklerde yayılış göstermektedir. Dünya’da Afrika, Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa’da tropik ve subtropik bölgelerde yayılış gösteren bitkiler, Türkiye’de ise İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde daha çok yayılış göstermelerine rağmen hemen hemen her bölgede yayılış göstermektedirler (Karamanoğlu 1974, Toker 2002).

*Hypericum* L. cinsi bitkileri çok yıllık, otsu veya çalimsı bitkilerdir. Kaliks 5 sepalli, korolla 5 petalli ve genellikle sarı renkli, kırmızı benekli ve kırmızı damarlı, nadiren nektaryum uzantılıdır. Stamenler 5’li demet halinde, petallerin üstünde filamentler tabanda birleşik, ender olarak steril haldeki demetlere rastlanır. Ovaryum 3-5 gözlü veya kısmen ya da tamamen bir gözlüdür, her iki plasentaya bağlı iki veya çok sayıda tohum taslağı bulunur, stilus 3-5 adet, serbest ve incedir. Meyve; septisit kapsül, çoğunlukla reçine içeren salgı kanalları veya cepleri taşır, nadiren etli ve açılmayan tiptedir (Davis 1965).

Çeşitli *Hypericum* türleri dünya çapında farklı halk ilaçlarında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlar arasında en popüler olan ve en çok çalışılan tür Dünya’da genellikle ‘St. John’s Wort’, Türkiye’de ise ‘Sarı Kantaron’ olarak bilinen *Hypericum perforatum*’dur. *Hypericum perforatum* özellikle yanıkların, cilt yaralanmalarının ve nörolojik semptomların tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop 1984). Birkaç çalışma Sarı kantaronun, depresyonun (Hunt ve ark. 2001, Werneke ve ark. 2004) ve distiminin (kronik depresyon) (Rothblatt ve Ziment 2002) hayvan davranış modelleri üzerinde test edilmesinin yanında insanlar üzerinde antidepresan ajan olarak etkisini de kanıtlamıştır. Bu doğal ürün aynı zamanda, vazodilatasyonu indüklemekle birlikte hemoroid ve çürükleri tedavi etmek için halk tıbbında kullanılmıştır (Hunt ve ark. 2001). Sarı kantaron, immünosupresantlar, oral kontraseptivler, oral antikoagülanlar ve HIV proteaz inhibitörlerini kapsayan birkaç ilacın etkisini azaltır (Mannel 2004, Bobrov ve ark. 2007). Ayrıca nöronal uyarılabilirlik üzerindeki farmakodinamik etkileri de rapor edilmiştir (Neagoe ve ark. 2004). Son günlerde, deneysel bir modelde bir antiinflamatuvar etki kanıtlanmıştır (Sosa ve ark. 2007).

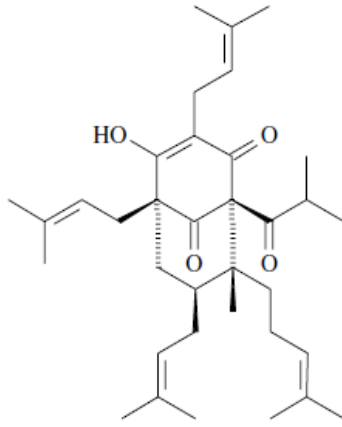


Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Hypericum* ekstraktının temel bileşenlerinin hiperisin, hiperforin ve fenoliklerin olduğu düşünülmektedir (Conforti ve ark. 2007). Hiperisinin (Şekil 2.3.2.), insan bağışıklık yetmezliği virüslerine dahil olan zarflı virüslere karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Miskovsky 2002). Yine son yıllarda hiperisinin drog ve tıbbi uygulamalarda multifonksiyonel bir ajan olduğu kanıtlanmıştır. Son çalışmalar fotoaktif hiperisinin, antiviral, antiretroviral, antineoplastik, fotodinamik ve fotodiagnostik etkilerini rapor etmişlerdir (Miskovsky 2002). Güncel yayınlanmış bir kanıt, fotoaktif hiperisinin hafif bir şekilde fotogenotoksik olduğunu ileri sürmesine rağmen (Kersten ve ark. 1999); fotoaktif olmayan hiperisinin potansiyel genotoksik ve/veya antigenotoksik etkilerine yetersiz olarak dikkat çekilmiştir (Miadokova ve ark. 2008). Özellikle hiperisin benzeri bileşikler olan naftodiandronların da çok güçlü bir antiviral etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Meruelo ve ark. 1988). Hiperisin yalnızca *Hypericum* türlerinde bulunduğundan dolayı *Hypericum* cinsinin infrajenetik sınıflandırmasında da kemotaksonomik olarak önemlidir (Kitanov 2001).



**Şekil 2.3.2.** Hiperisin'in kimyasal yapısı (Agostinis 2002)

Hiperforinin (Şekil 2.3.3.) ise, antidepresan aktiviteden sorumlu olan temel bileşik olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda hiperforinin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda farklı tümör hücre hatlarına karşı antitümör etkisinin olduğu, hem murin hem de insan tümör hücrelerinde apoptozis ile ilişkili sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiş ve metastatik büyümeyi kontrol ettiği bulunmuştur (Dona ve ark. 2004). Ayrıca antiinflamatuvar ve antiangiogenic etkileri de mevcuttur (Dona ve ark. 2004).



**Şekil 2.3.3.** Hiperforin'in kimyasal yapısı (Beerhues 2006)

Flavonoidler de *Hypericum* türlerinde bulunan bir grup biyoaktif fenoliktir. Klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar flavonoidlerin, kardiyovasküler hastalıkları ve bazı kanser türlerini önlemede rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca hiperisin ve hiperforinin, *Hypericum* ekstraktının farmakolojik etkilerinden sorumlu olduklarının belirtilmesine rağmen; flavonoidlerin bunların antidepresan aktivitelerine önemli bir katkı sağladığı bildirilmiştir (Gastpar ve ark. 2005).

Ayrıca *Hypericum* türleri ksantonlar (Gunatilaka ve ark. 1979), kromenil ketonlar (Ishiguro ve ark. 1990), hiperforin türevleri (Trifunovic ve ark. 1998), floroglukinoller (Ishiguro ve ark. 1998), n-alkanlar (Brondz ve ark. 1983), naftodiantronlar (Kitanov 2001) ve esansiyel yağlar (Çakır ve ark. 2005) gibi çeşitli bileşikler de içerirler.

*Hypericum perforatum*'un geniş çaplı araştırılıp kanıtlanmış ve bunun sonucunda popüler hale gelmiş antidepresan aktivitesi, *Hypericum* türlerini çalışmada geniş çaplı etki yaratmıştır (Özmen ve ark. 2009). Bu türlerin halk tıbbında bu sıklıkta ve çeşitli amaçlarla kullanılıyor olması bitkileri biyolojik aktiviteleri ve genotoksisite/antigenotoksisite açısından değerlendirmeye itmiştir. Bu çalışmalardan bazıları şu şekildedir:

Yapılan bir çalışmada Türkiye'ye endemik olan *H.adenotrichum*'un ikincil metabolitleri; hiperforin, hiperisin, pseudohiperisin, klorojenik asit, rutin, hiperosit, quersitrin, quersetin, kaempferol, apigenin-7-O-glukozid ve amentoflavonun çeşitli

seviyelerdeki konsantrasyonları, hiperforin hariç olmak üzere, HPLC ile belirlenmiştir (Çırak ve ark. 2009).

Yapılan bir çalışmada da Aydın – Karıncalı Dağı’ndan toplanan *H. adenotrichum*’un antikanser özellikleri araştırılmış ve bu bitkinin etkili bir p53-bağımsız antineoplastik özelliğinin de olduğu gösterilmiştir (Özmen ve ark. 2009).

*H. olympicum* ile yapılan bir çalışmada bu bitkinin stamenlerinde hiperisin ve pseudohiperisin bileşiklerinin yaklaşık olarak eşit miktarda buldukları belirlenmiştir (Kitanov 2001).

Güney Batı Sırbistan, Rujan Dağı’ndan toplanan *Hypericum olympicum*’un esansiyel yağının içeriği ise bir başka çalışmada belirlenmiş, bu bileşiklerin (E)-anethole (% 30.7) ve  $\beta$ -farnesene (% 12.4) olduğu gösterilmiştir (Gudzic ve ark. 2001).

*H. linarioides*’in esansiyel yağı ve petrolyum eter, kloroform, aseton ve metanol ekstraktları 11 farklı zirai patojene (*Fusarium acuminatum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*’nin üç anostomoz gurubu [AG-5, AG-9 ve AG-11], *Alternaria solani* ve *Verticillium albo-atrum*) karşı antifungal aktivite açısından test edilmiştir. Esansiyel yağ, sadece AG-9 ve *V.albo-atrum*’a karşı antifungal aktivite gösterirken, ekstraktlar *A. solani*, *F. culmorum*, *F. equiseti* ve *R. solani*’nin tüm anostomoz gruplarına karşı antifungal aktivite göstermiştir (Çakır ve ark. 2005).

Antidepresan benzeri etki ve antinosiseptif etki gösteren *H. polyanthemum*’un siklohekzan ekstraktının (POL) toksisite güvenlik profili 28 günlük tekrarlayan dozlarda farelere verilmiştir. Buna göre, 450 ve 900 mg/kg dozlardaki POL farelerdeki vücut ağırlığı kazanımını etkilemiş, biyokimyasal, hematolojik ve karaciğer histolojik değişikliklerini indüklemiştir. 90 mg/kg dozda ise herhangi bir toksik etki göstermemiştir. Sonuç olarak, *H. polyanthemum* OECD akut toksisite parametrelerine göre güvenli olarak (kategori 5) sınıflandırılabilir. Bununla birlikte, yüksek dozda POL’un tekrarlı muamelesinden sonra gözlenen değişimler, potansiyel *H. polyanthemum* toksisitesinde karaciğerin hedef organ olabilme olasılığını da ileri sürmüştür (Betti 2012).

Yunanistan'da yapılan bir çalışmada *H. perforatum*'un ham aköz ekstraktının antifaj aktivitesi, antiviral ve antineoplastik aktivetelerinin belirlenmesinde ilk sırada kullanılan 6 bakteriyofaja (T1, T2, T4, T7, MS2 ve  $\phi$ X174) karşı çalışılmıştır. *H. perforatum* tüm T kolifajlarına karşı antifaj etkisi göstermiştir (Delitheos ve ark. 1997).

Analjezik ve antidepresif etkileri nedeniyle Brezilya'da halk tıbbında kullanılan *H.brasiliense* ekstraktının muhtemel klastojenik etkisi Wistar sıçanların kemik iliği hücrelerinde *in vivo* test edilmiş ve *H.brasiliense* ekstraktının çalışılan test sistemlerinde MN ve kromozom aberasyonları (CA) miktarlarını istatistiki olarak önemli ölçüde indüklediği bildirilmiştir (Espósito ve ark. 2005).

Halk tıbbında çoğunlukla antidepresan, anksiyete, antiviral, yara iyileştirici ve antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı kullanılan *Hypericum perforatum* L. etanol ekstraktının sitogenetik etkisi kültüre edilmiş insan lenfositlerinde çalışılmış, bu bitki ekstraktının kromozomal aberasyonları (CA) ve anormal metafaz frekansını arttırdığı bulunmuştur (Saadat 2006).

Psikiyatrik hastalıkların tedavisinde besin takviyesi olarak kullanılan, içeriği *Hypericum perforatum* (Sarı kantaron), *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) ve *Spirulina* (Filamentöz siyanobakteri) karışımından medyana gelen St. John's Wort takviye edici gıda maddesinin (SJWS) genotoksik/antigenotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Bunun için *in vivo* olarak mikronükleus (MN) ve kromozom aberasyonu testleri (CA) testleri gerçekleştirilmiştir. (SJWS) doza bağımlı olarak, femoradaki polikromatik eritrositlerde MN frekansını arttırmış ve fare testisi kromozomlarında aberasyonlara neden olmuştur. *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) ve *Spirulina* (Filamentöz siyanobakteri) bu karışımda çok az miktarda bulunması ve karışımın çok büyük bir kısmını *Hypericum perforatum* (Sarı kantaron) oluşturmasından dolayı bu genotoksik etkinin *Hypericum perforatum*'dan kaynaklandığı düşünülmüştür (Aleisa 2008).

Yapılan bir çalışmada *Hypericum perforatum*'un aköz ekstraktının genotoksik/antigenotoksik etkisi *in vitro* (HGPRT - hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase testi, UDS - unscheduled DNA synthesis testi ve hücre transformasyonu testi)ve *in vivo* (fare spot testi ve kromozom aberasyonu (CA) )test

sistemlerinde araştırılmış ve bu bitki ekstraktının herhangi bir mutajenik potansiyelinin olmadığı bulunmuştur (Okpanyi ve ark. 1990).

Fotoaktif olmayan hiperisinin potansiyel genotoksikite ve antigenotoksikitesi beş deney modelinde araştırılmıştır. Hiperisin, metabolik aktivite ile veya metabolik aktivitesiz Ames testinde mutajenik değildir. 9-aminoacridin tarafından indüklenen mutajeniteye karşı koruyucu bir etki göstermez. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) deneyinde hiperisin, *ade<sub>2</sub>* lokusundaki mitotik krossoverlar ve toplam aberasyonların frekansını, *trp<sub>5</sub>* lokusundaki konvertantların sayısını ve *ilv<sub>1</sub>* lokusundaki revertantların sayısını arttırmamıştır. 4-nitroquinoline-1-oxide'li kombine bir uygulamada, en yüksek konsantrasyonu kullanıldığında *ilv<sub>1</sub>* lokusundaki revertantların sayısını önemli bir şekilde arttırmıştır. Hiperisin, *Chlamydomonas reinhardtii* alginde mutajenik değildir. Bununla birlikte hiperisin, üç memeli hücre hattı kullanılan kromozom aberasyonu testinde yapısal kromozom aberasyonlarının frekansını değiştirmemiştir (Miadokova ve ark. 2010).

Fotosensitizer hiperisinin, iki farklı baş ve boyun skuamöz hücre karsinoması (HNSCC) hücre hatları üzerinde genotoksik etkisi comet yöntemiyle karanlıkta çalışılmıştır. Hiperisinin test edilen tüm dozlarında genotoksik olduğu bulunmuştur (Gyenge ve ark. 2012).

Bu tez çalışmasında kullanılan *Hypericum* türleri ise Kuzeydoğu Türkiye'ye endemik olan *H.adenotrichum* ve genellikle Güneydoğu Avrupa'da yayılış gösteren *H.olympicum* subsp. *olympicum*'dur.

*H.adenotrichum*, Kuzeydoğu Türkiye'ye endemik, kuru otlaklar ve taşlık alanlarda yetişen otsu, çok yıllık yabani bir bitkidir. Gövdesi 7-32 cm uzunluğunda, dik veya eğik, bazen yere dönüktür. Yapraklar 7-16 mm uzunluğunda, oblong veya lineare yakın oblongdur. Sarı çiçekleri, tıpkı yaprakları gibi çok sayıda ve kısmen siyah noktalıdır. Kapsülleri 7-10 mm uzunluğunda ve ovoid şeklindedir (Şekil 2.3.4., Davis 1988).



**Şekil 2.3.4.** *Hypericum adenotrichum*'un genel görünüşü

*H.olypticum* subsp. *olypticum* ise, yayılıcı, kümeler halinde bulunan, küçük, gri-yeşil yapraklı ve yazın fincan şekilli, yazdan sonra parlak turuncu-kırmızı renkli tanelere dönüşen sarı çiçekleri olan cüce bir çalıdır. Genellikle asidik, sert topraklı taşlı yüzeylerde yetişir (Şekil 2.3.5, Davis 1988).



**Şekil 2.3.5.** *Hypericum olympicum* subsp. *olypticum*'un genel görünüşü

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada, halk tıbbında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Hypericum* cinsine ait *Hypericum adeneotrichum* ve *Hypericum olympicum* subsp. *olympicum* türlerinin ayrı ayrı çiçek, gövde ve gövde+çiçek kısımlarından elde edilen metanolik ekstraktlarının olası genotoksik/antigenotoksik etkileri dört tekrarlı olarak insan lenfosit kültürlerinde (sağlıklı ve sigara içmeyen 2 erkek, 2 bayan) Kromozom Aberasyonu (CA), Kardeş Kromatit Değişimi (SCE), Mikronükleus (MN) ve Komet Testleri ile araştırıldı.

Ayrıca, İngiltere 'de York Üniversitesi'nde her iki bitki türünün de gövde ve çiçek kısımlarının, GCXGC-TOF/MS metodu ile içerik analizleri yapıldı.

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri

Çalışmada kullanılan *Hypericum adeneotrichum* ve *Hypericum olympicum* subsp. *olympicum* türleri 2010 yılının Haziran ayında Bursa-Uludağ'da yapılan arazi çalışması ile toplandı. Bitki örnekleri Bursa ili, Uludağ Kırkpınar bölgesinden 1830-1860 m'den, Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Ekoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gürcan GÜLERYÜZ tarafından teşhis edildikten sonra toplandı. Toplanan bitkiler yabancı otlardan ve köklerinden ayıklandıktan sonra 3 partiye ayrıldı (Şekil 3.1.1, Şekil 3.1.2, Şekil 3.1.3 ve Şekil 3.1.4.)

1. Parti: Gövde+Çiçek
2. Parti: Çiçek
3. Parti: Gövde

Bitkiler partilere ayrıldıktan sonra gölgede yaklaşık 1 hafta boyunca kurutuldu. Her bir parti toz haline getirildi.



Şekil 3.1.1. *Hypericum adenotrichum*'un gövde+çiçek kısmı



Şekil 3.1.2. *Hypericum adenotrichum*'un çiçek kısmı





Şekil 3.1.3. *Hypericum olympicum*'un gövde+çiçek kısmı



Şekil 3.1.4. *Hypericum olympicum*'un çiçek kısmı

### **3.2. *Hypericum adenotrichum* ve *Hypericum olympicum* Türlerinin İçerik Analizi**

Her iki türün de gövde ve çiçek kısımlarının ayrı ayrı içerik analizi, İngiltere’de York Üniversitesi’nde GCXGC-TOF/MS metoduna göre yapıldı.

### **3.3. Ekstraksiyon**

Her iki bitkinin farklı kısımlarından (çiçek, gövde ve gövde+çiçek) 30 g tartılarak 150 ml MeOH ile Soxhlet ekstraktöründe, ısıtıcı metanolün kaynama noktasına kadar ısınmasını sağlayacak şekilde ayarlanarak, ekstraksiyon işlemleri yapıldı (her biri için 24 saat).

### **3.4. Evaporasyon**

Elde edilen ekstraksiyonların çözücüleri (MeOH) evaporatör cihazında 50 °C’deki su banyosunda vakum altında ekstrakte maddelerden tamamen uzaklaştırıldı (25-30 dakika). Ekstraktlar -80°C’de muhafaza edildiler.

### **3.5. Liyofilizasyon**

Donmuş haldeki ekstraktlar kuru hale getirilmek üzere vakum altında, uygun koşullarda ve sıcaklıklarda liyofilize edildiler (41-42 saat). Elde edilen kuru haldeki ekstraktlar deneylerde test edilen maddeler olarak kullanılmak üzere hazır hale getirildiler ve -20°C’de muhafaza edildiler.

### **3.6. Kültür Ortamlarının Hazırlanması**

Lenfositler için % 10 RPMI 1640 Medium (10X, Sigma), % 2 L-Glutamine (Sigma), % 20 Fetal Calf Serum (FBS, Biochrom AG), 100 IU/ml penicilinle – 100 µg/ml streptomycine (Biological Industries) ve lenfositlerin mitozaya teşvik edilmesi için de % 2,5 fitohemaglutinin (PHA-L Biochrom AG) içeren, steril şartlarda hazırlanan 5 ml’lik kültürler oluşturuldu. Kültürler, pH’ları 6,8 – 7,2 olacak şekilde hazırlandı ve -25°C’de muhafaza edildi.

### 3.7. Doz Seçimi

#### **Pozitif Kontrol**

Pozitif kontrol için Etil metan sulfonat (EMS; Sigma, M0880), 1250 µg/ml tek dozda distile su ile sulandırılarak her bir test yöntemi (Kromozom Aberasyonu, Kardeş Kromatit Değişimi, Mikronükleus ve Komet Testleri) için 4 farklı bireyin lenfosit kültürlerine (2 erkek, 2 bayan) uygulandı.

#### ***Hypericum adenotrichum* Ekstraktları**

*Hypericum adenotrichum* ekstraktlarının su, metanol, etanol ve dimethylsulfoxide'te (DMSO) çözünüp çözünmedikleri denendi ve en uygun çözücünün DMSO olduğuna karar verilerek, uygun DMSO konsantrasyonu belirlendi.

*Hypericum adenotrichum* ekstraktlarının doz seçimi amacıyla doz belirleme deneyleri yapıldı. 25, 125, 250, 500, 625, 1000, 1250 ve 1875 µg/ml'lik dozlar kültür tüplerine ilave edildi. Yüksek dozlarda görülen düşük mitotik indeks, yüksek oranda kromozom yapı aberasyonları nedeniyle 125, 250 ve 500 µg/ml'lik dozlar ikişer tekrarlı olarak denendikten sonra çalışma dozu olarak belirlendi.

#### ***Hypericum olympicum* Ekstraktları**

*Hypericum olympicum* ekstraktlarının su, metanol, etanol ve dimethylsulfoxide'te (DMSO) çözünüp çözünmedikleri denendi ve en uygun çözücünün DMSO olduğuna karar verilerek, uygun DMSO konsantrasyonu belirlendi.

*Hypericum olympicum* ekstraktları ile gerçekleştirilen doz belirleme çalışmalarında 50, 125, 250, 500, 625, 750, 1000, 1250, 1500 ve 1750 µg/ml'lik dozlar kültür tüplerine verildi. Yüksek dozlarda görülen düşük mitotik indeks, yüksek oranda kromozom yapı aberasyonları nedeniyle 250, 500 ve 750 µg/ml'lik dozlar ikişer tekrarlı olarak denendikten sonra çalışma dozu olarak belirlendi.

## **Çözücü Kontrol**

Çözücü kontrol olarak bitki ekstraktlarının en uygun şekilde çözüldüğü DMSO kullanıldı. Öncelikle 0.025 g kuru bitki ekstraktı tartıldı. Daha sonra çeşitli denemelerden sonra her iki bitkinin farklı kısımlarını çözecek minimum DMSO yüzdeleri belirlendi:

- *Hypericum adenotrichum* gövde+çiçek ekstraktı: % 10 DMSO
- *Hypericum adenotrichum* çiçek ekstraktı: % 50 DMSO
- *Hypericum adenotrichum* gövde ekstraktı: % 10 DMSO
- *Hypericum olympicum* gövde+çiçek ekstraktı: % 50 DMSO
- *Hypericum olympicum* çiçek ekstraktı: % 10 DMSO
- *Hypericum olympicum* gövde ekstraktı: % 50 DMSO

## **3.8. Deney Gruplarının Oluşturulması**

Kan örnekleri 4 (2 erkek ve 2 bayan) gönüllü, sağlıklı, 20-30 yaş arası, sigara ve alkol kullanmayan bireylerden alındı. Her bir kişiden alınan kan örnekleri her bir bitki ekstraktının dozları için kontrol, pozitif kontrol (EMS) ve çözücü kontrol (DMSO) kültürleriyle birlikte Kromozom Aberasyonu, Kardeş Kromatit Değişimi, Mikronükleus ve Komet Testleri ile analiz edildi.

## **3.9. Genotoksisite Çalışmaları**

### **3.9.1. Lenfosit Kültürü Kromozom Aberasyonu Testi**

Çalışmamızda her bir bitki ekstraktı için 4 kişilik deney grupları (2 erkek, 2 bayan) oluşturuldu. Deney gruplarındaki bireyler 20-30 yaş arası sağlıklı, sigara ve alkol içmeyen bireylerden seçildi. Her bir kişiden alınan kan örnekleri her bir ekstraktın seçilen dozları için pozitif kontrol (EMS), negatif kontrol ve çözücü kontrol kültürleriyle birlikte 4 tekrarlı olarak kromozom aberasyon analizi ile test edildi. Her bir bireyden alınan 0,5 ml'lik tam kan örnekleri 37 °C 'ye getirilmiş kültür ortamlarına katıldı ve 37°C 'de 72 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol ile çözücü kontrolün belirlenen dozları, *Hypericum adenotrichum*'un gövde, çiçek ve gövde+çiçek ekstraktlarının 125, 250, 500 µg/ml olarak seçilen dozları, *Hypericum olympicum*'un gövde, çiçek ve

gövde+çiçek ekstraktlarının ise 250, 500 ve 750 µg/ml olarak seçilen dozları kültür ortamına harvestten 24 saat önce katıldı. Harvestten 1-1,5 saat önce mitoz geçiren hücreleri metafaz safhasında durdurmak için final konsantrasyonu 5 µ/ml olacak şekilde Colsemid ilave edildi. Bütün bu işlemler steril koşullarda yapıldı. 72 saatin sonunda lenfosit hücrelerini elde etmek amacıyla kültürler 10 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak çöken hücre kısımları 10 dakika 37°C 'de 0.075 M KCL ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tekrar 10 dakika 3500 rpm'de santrifüj edilerek lenfositler çöktürüldü. Elde edilen lenfosit hücreleri 3:1 oranında (metanol: glasiyel asetik asit) taze hazırlanmış fiksatif ile biraz mekanik etki yardımıyla fiske edildi. Fiksasyon 3 kez tekrarlandı ve her seferinde santrifüj işlemi uygulandı (10 dakika – 3500 rpm). Son fiksasyondan sonra elde edilen lenfositler yine bir miktar fiksatif ile seyreltilerek alkolde temizlenmiş ve -25°C 'de bekletilmiş lamalar üzerine yüksekten damlatma metodu ile yayıldı ve havada kurutuldu.

Kurutulan preparatlar fosfat bufferla hazırlanmış % 5'lik Giemsa solusyonu (pH 6,8) ile 15 dakika boyandı. Preparatlar süre sonunda distile suyla durulanarak havada kurutuldu ve serin bir yerde muhafaza edildi (Landi ve ark. 2000, Rodriguez-Mercado ve ark. 2003, Nigro ve ark. 2003).

Preparatların değerlendirilmesi Olympus marka ışık mikroskobu ile 100X objektifle gerçekleştirildi. Her bir ekstraktın her bir dozu ve pozitif, negatif ve çözücü kontroller için 4 tekrarlı olarak yapılan kültürlerden edilen preparatların analizinde, iyi dağılmış 50 metafaz figürü seçilerek sayısal ve yapısal kromozom aberasyonları değerlendirilerek tanımlandı. Yapısal kromozom aberasyonu olarak kromozom ve kromatid tipte gap, kromozom ve kromatid tipte kırık, disentrik kromozom oluşumu, despiralize kromozom ve metafaz figürleri, rearanjman oluşumu (exchange figürler), pulverize metafazlar değerlendirmeye alınırken nümerik aberasyon olarak kromozom takımında eksik ve fazla olan kromozom sayıları değerlendirildi. Toplam aberasyon oranları gap ve pulverizasyon oranları dahil edilerek ve edilmeden ayrı ayrı hesaplandı. Yaklaşık 1000 hücre sayıldı ve %o Mİtotik İndeks (%o Mİ) aşağıdaki formülle belirlendi (Landi ve ark. 2000, Nigro ve ark. 2003):

$$\%o \text{ Mİtotik İndeks} = \text{Bölünen Hücre} / \text{Toplam Hücre} \times 100$$

### 3.9.2. Lenfosit Kültürü Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Testi

Çalışmada her bir bitki ekstraktı için kromozom aberasyon testi yapılan 4 kişilik deney gruplarına SCE testi uygulandı. Her bir kişiden alınan kan örnekleri her bir ekstraktın seçilen dozları için kontrol kültürleriyle birlikte 4 tekrarlı olarak kardeş kromatid değişimi (SCE) analizi ile test edildi. Her bir bireyden alınan 0,5 ml'lik tam kan örnekleri 37 °C 'ye getirilmiş kültür ortamlarına katıldı ve karanlık ortamda, 37°C 'de 72 saat inkübe edildi. Harvestten 48 saat önce kültürlerle final konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde 5-BrdU katıldı. 1250 µ/ml pozitif kontrol (EMS) ile çözücü kontrolün belirlenen dozları, *Hypericum adenotorichum*'un gövde, çiçek ve gövde+çiçek ekstraktlarının 125, 250, 500 µg/ml olarak seçilen dozları, *Hypericum olympicum*'un gövde, çiçek ve gövde+çiçek ekstraktlarının ise 250, 500 ve 750 µg/ml olarak seçilen dozları kültür ortamına harvestten 24 saat önce katıldı. Harvestten yine 1-1,5 saat önce kolsemid ilavesiyle hücreler metafaz safhasında bloke edildi. Kültürlere karanlık ortamda rutin harvest yöntemi uygulanarak işlem sonunda hücreler alkolde temizlendi ve -25°C 'de bekletilmiş lamlar üzerine yüksekten damlatma metodu ile yayılarak ve havada kurutuldu.

Kurutulan preparatlar final konsantrasyonu 0,5 µ/ml olacak şekilde PBS'de hazırlanmış (Fosfat Buffer Saline) floresan özellikteki Hoechst 33258 boyasında 10 dakika karanlık ortamda bekletildi. Süre sonunda lamlar PBS ile durularak lam üzerindeki hücreler 45 dakika süresince 30-50 cm mesafeden bir UV ışık kaynağından UV ışığa maruz bırakıldı. Süre sonunda preparatlar karanlık bir yerde bir gece süreyle muhafaza edildi.

Bir gece bekletilen lamlar 15 dakika 60-65 °C 'de 2xSSC ile muamele edildikten sonra distile su ile durulandı. Daha sonra yine fosfat bufferda hazırlanmış % 5'lik Giemsa solusyonunda (pH 6,8) 25 dakika süreyle karanlıkta boyandı (Fluoresans Plus Giemsa Metod, FPG) (Dean ve Danford 1984, Wolf ve ark. 1999, Landi ve ark. 2000, Biri ve ark. 2002, Mahata ve ark. 2003, Bozkurt ve ark. 2003).

Boyanan preparatlar distile su ile durulanıp havada kurutulup serin ve karanlık bir yerde muhafaza edildi. SCE preparatlarının değerlendirilmesi, fluoresan boyanın özelliğini kısa sürede kaybetmesinden dolayı hemen yapıldı.

Preparatların değerlendirilmesi Olympus marka ışık mikroskobu ile 100X objektifle gerçekleştirildi. Hazırlanan preparatlarda her bir ekstraktın her bir dozu, negatif, çözücü ve pozitif kontroller için 4 tekrarlı olarak yapılmış kültürlerden elde edilen preparatlarda iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren, ikili boyanmış, 30 metafaz figürü belirlenerek toplam SCE ve hücre başına düşen SCE'ler belirlendi (Mahata ve ark. 2003, Bozkurt ve ark. 2003). DNA replikasyonu üzerindeki etkileri belirlemek amacıyla da Proliferatif İndeks (PRI) (Proliferation Index = NDI) hesaplandı. Bunun için incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz evresindeki hücreler sayıldı ve PRI şu formüle göre hesaplandı:

$$PRI = (1 \times M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3) / M_1 + M_2 + M_3$$

### **3.9.3. Lenfosit Kültürü Mikronükleus Testi**

Çalışmada her bir bitki ekstraktı için kromozom aberasyon testi ve kardeş kromatid değişimi testi yapılan 4 kişilik deney gruplarına mikronükleus testi uygulandı. Her bir kişiden alınan kan örnekleri her bir ekstraktın seçilen dozları için kontrol kültürleriyle birlikte 4 tekrarlı olarak mikronükleus analizi ile test edildi. Her bir bireyden alınan 0.5 ml'lik tam kan örnekleri 37 °C 'ye getirilmiş kültür ortamlarına katıldı ve karanlık ortamda, 37°C 'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun 44. saatinde kültürleri, binükleuslu hücreler elde etme amacıyla hücre bölünmesini sitokinez aşamasında durduran final konsantrasyonu 3 µg/ml olan sitokalazin-B (Cyt-B) ilave edildi. 1250 µ/ml pozitif kontrol (EMS) ile çözücü kontrolün belirlenen dozları, *Hypericum adenotorichum*'un gövde, çiçek ve gövde+çiçek ekstraktlarının 125, 250, 500 µg/ml olarak seçilen dozları, *Hypericum olympicum*'un gövde, çiçek ve gövde+çiçek ekstraktlarının ise 250, 500 ve 750 µg/ml olarak seçilen dozları kültür ortamına harvestten 24 saat önce katıldı. Bu işlemlerin steril koşullarda yapılmasına dikkat edildi. 72 saatin sonunda lenfosit hücrelerini elde etmek amacıyla kültürler 8 dakika 800 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak çöken hücre kısımları +4°C 'deki 0.075 M

KCL ile oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tekrar 8 dakika 800 rpm'de santrifüj edilerek lenfositler çöktürüldü. Elde edilen lenfosit hücreleri 5:1 oranında (metanol: glasiyel asetik asit) taze hazırlanmış fiksatif ile fiske edildi. Fiksasyon 3 kez tekrarlandı ve her seferinde santrifüj işlemi uygulandı (8 dakika – 800 rpm). Son fiksasyondan sonra elde edilen lenfositler yine bir miktar fiksatif ile seyreltilerek alkolde temizlenmiş ve -25°C 'de bekletilmiş lamalar üzerine yüksekten damlatma metodu ile yayıldı ve havada kurutuldu.

Kurutulan preparatlar yine fosfat bufferla hazırlanmış % 5'lik Giemsa solusyonu (pH 6,8) ile 15 dakika boyandı. Preparatlar süre sonunda distile suyla durulanarak havada kurutuldu ve serin bir yerde muhafaza edildi (Rodriguez-Mercado ve ark. 2003, Nigro ve ark. 2003, Landi ve ark. 2000).

Preparatların değerlendirilmesi Olympus marka ışık mikroskobu ile 40X objektifle gerçekleştirildi. Hazırlanan preparatlarda 2000 binükleer (iki nükleuslu) hücre incelendi ve bu binükleer hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptandı. Ayrıca aynı preparatlarda 1000 tane hücre sayıldı, bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nükleuslu olan hücrelerin sayıları saptandı. Bu orandan yola çıkarak Nükleer Bölünme İndeksi (Nuclear Division Indeks = NDI) hesaplandı (Fenech 2000). Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı:

$$NDI = (1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4) / (N_1 + N_2 + N_3 + N_4)$$

#### **3.9.4. Lenfosit Kültürü Alkali Komet Testi**

Çalışmada her bir bitki ekstraktı için kromozom aberasyon testi, kardeş kromatid testi ve mikronükleus testi yapılan 4 kişilik deney gruplarına komet testi uygulandı. Her bir kişiden alınan kan örnekleri her bir ekstraktın seçilen dozları için kontrol kültürleriyle birlikte komet analizi ile test edildi. Her bir bireyden alınan 0.5 ml'lik tam kan örnekleri 37°C'ye getirilmiş kültür ortamlarına katıldı ve karanlık ortamda, 37°C'de 72 saat inkübe edildi. 1250 µg/ml pozitif kontrol (EMS) ile çözücü kontrolün belirlenen dozları, *Hypericum adenotorichum*'un gövde, çiçek ve gövde+çiçek ekstraktlarının 125, 250, 500 µg/ml olarak seçilen dozları, *Hypericum olympicum*'un gövde, çiçek ve gövde+çiçek ekstraktlarının ise 250, 500 ve 750 µg/ml olarak seçilen dozları kültür



ortamına deneyden 24 saat önce katıldı. İnkübasyon sonunda kültürlerle lenfosit izolasyonu yöntemi uygulandı. Bunun için kültürler serum fizyolojik solusyonu ile sulandırıldı. Daha sonra kuru tüplerde bir miktar fikol üzerine serum fizyolojik ile sulandırılmış kan örnekleri eklendi ve 15 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda orta fazda toplanmış olan lenfositler başka kuru tüplere alındı. Lenfositler tekrar serum fizyolojik solusyonu ile karıştırılarak 10 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dipte toplanan lenfositler ile komet testi gerçekleştirildi.

Alkali komet testi Singh ve ark. (1988)'ın yöntemine göre yapıldı. Hücre-agar karışım tabakasının deney sırasında lam üzerinden kayıp kaybolmasını engellemek amacıyla daha pürüzlü bir yüzey oluşturmak için lamalar önceden % 0.65'lik Normal Kaynama Noktalı (NMP) agar ile kaplandı. Elde edilen lenfositler 500 µl PBS ile seyreltildi. Bu süspansiyondan 100 µl alınarak % 0.65'lik 250 µl Düşük Kaynama Noktalı (LMP) agar (25-35 °C) ile karıştırıldı. Bu karışımdan alınan 100 µl örnek önceden hazırlanan NMP agar kaplı lama yayıldı ve bir lamel ile kapatılarak +4 °C'de 15 dk bekletilerek jelin katılaşması sağlandı.

Agar katılaşmasından sonra preparatlar üzerindeki lameller kaldırıldı ve şale içerisindeki soğuk Lizis Solüsyonuna yerleştirildi. Daha sonra tekrar +4 °C'ye kaldırılarak 24 saat bekletildi. Lizis işleminden geçirilen preparatlar elektroforez tankına yerleştirildi ve tank soğuk Elektroforez Solüsyonu (Running Buffer) (pH:13) ile dolduruldu. Preparatlar 15 dakika bu solüsyon içinde bekletildi.

Unwinding (DNA sarmalının açılması) işlemi tamamlanan preparatlara aynı tank ve solüsyon içerisinde elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Elektroforez işlemi takiben pH:13 değerinde solüsyon içeren tanktan çıkarılan preparatlar pH ayarlamasını sağlamak amacıyla nötrolizasyon işlemine alındı. Bunun için preparatlar soğuk Nötrolizasyon Tamponu içeren şalelere alınmak üzere nötralize edildi. Nötrolizasyon işleminden sonra preparatlar soğuk distile sudan geçirildi. Kuruyan preparatlar Etidyum bromür (2 µg/ml) ile boyandı ve üzerlerine lamel kapatıldıktan sonra Kameram 21 Kamera Ataçmanlı Floresans Mikroskobu altında incelendi.

Preperatlar Komet yazılım programı (Kameram 21, Mikrosistem) ile değerlendirildi. Değerlendirmede Komet alanı, Komet uzunluğu, Komet yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzunluğu, olive moment uzunluğu, kafa % DNA, genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi verilerinden yararlanıldı.

Genetik Hasar İndeksi (GHİ) şu formüle göre hesaplandı (Singh ve ark. 1988):

$$GHİ=(1*\Sigma Tip1)+(2*\Sigma Tip2)+(3*\Sigma Tip3)+(4*\Sigma Tip4)/(\Sigma Tip0+\Sigma Tip1+\Sigma Tip2+\Sigma Tip3+\Sigma Tip4)$$

Hasarlı Hücre Yüzdesi Formülü (Singh ve ark. 1988):

$$\% \text{ Hasarlı Hücre} = \Sigma Tip2 + \Sigma Tip3 + \Sigma Tip4$$

### **3.10. İstatistiki Değerlendirme**

Kromozom Aberasyonu (CA), Kardeş Kromatid Değişimi (SCE), Mikronükleus (MN) ve Komet testlerinden elde edilen verilerin istatistiki değerlendirmesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı, fark grupları Tukey HSD testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde belirlendi. İstatistiki analizler SPSS 20.00 paket bilgisayar programında yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Hypericum adenotrichum* ve *Hypericum olympicum* Türlerinin İçerik Analiz Sonuçları

Çizelge 4.1.1. *Hypericum adenotrichum* türünün içerik analizi bulguları

Bileşik <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	% Alan <sup>c</sup>	
		Çiçek	Gövde
Acetic acid	600	0.15	<sup>d</sup>
Butanoic acid	763	0.12	0.11
Propanoic acid, 2-methyl-	763	0.24	0.85
2,3-Butanediol	785	0.04	0.20
Methyl pyrazine	819	0.04	0.09
Furfural	828	0.68	3.06
Butanoic acid, 2-methyl-	832	0.21	0.22
2-Hexenal	846		1.19
2-Furanmethanol	866	0.45	1.95
2(5H)-Furanone	871	0.40	1.58
Heptanal	901	0.20	0.76
Pyrazine, 2,5-dimethyl-	908	0.05	0.12
Ethanone, 1-(2-furanyl)-	910	0.18	0.54
Pentanoic acid	911	0.26	0.68
2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	942	0.25	1.04
2(5H)-Furanone, 5,5-dimethyl-	951	0.74	0.40
Benzaldehyde	952	0.04	0.18
Hexanoic acid	967	1.91	3.54
Phenol	980	0.14	0.45
2(5H)-Furanone, 3-methyl-	983	0.04	0.18

5-Hepten-2-one, 6-methyl-	985	0.44	0.30
2-Octanone	988	0.17	0.28
Furan, 2-pentyl-	992		0.10
Pyrazine, 2-ethyl-3-methyl-	1001		0.07
2,4-Heptadienal	1005	0.04	0.13
Benzyl Alcohol	1026	0.12	0.38
Hexanoic acid, 2-ethyl-	1027		0.18
1-Hexanol, 2-ethyl-	1032	0.08	
2-Acetylpyridine	1035	0.17	0.46
Benzeneacetaldehyde	1036	0.38	1.47
Butyl 3-methylbutanoate	1047	0.57	0.76
Acetophenone	1059	0.16	0.09
Heptanoic acid	1083	0.66	1.15
2-Nonanone	1087	0.11	0.12
Undecane	1100	0.21	0.31
Nonanal	1100	0.57	0.73
Phenylethyl Alcohol	1106	0.04	0.13
Maltol	1106	0.05	0.28
2(3H)-Furanone, dihydro-5-propyl-	1130	0.11	0.26
2(3H)-Furanone, ethyl-4-hydroxymethyl-	1139	0.17	0.16
Furaneol	1139	0.28	0.56
Octanoic Acid	1167	1.23	1.79
Melilotal	1181	0.06	0.08
2-Decanone	1190		0.19
1,2-Benzenediol	1197	0.05	0.27
Decanal	1204	0.26	0.33
2-Phenoxyethanol	1245	0.06	0.10

Nonanoic acid	1267	1.42	1.56
Indanone	1273		0.10
Thymol	1289	0.11	0.13
Indole	1290	0.02	0.03
2-Undecanone	1293	0.51	0.49
Butyrolactone	1299	0.52	1.17
2-Methoxy-4-vinylphenol	1313	0.17	0.17
$\alpha$ -Cubebene	1345	0.90	0.69
n-Decanoic acid	1364	0.50	0.61
$\alpha$ -Ylangene	1373	0.29	
Tetradecane	1400	0.34	0.46
$\beta$ -Gurjunene	1431	0.23	
Diisobutyl phthalate	1442	0.96	0.92
2-Propen-1-ol	1448	9.60	4.69
$\alpha$ -Neoclovene	1454	0.42	
$\beta$ -Farnesene	1458	0.18	1.27
Germacrene D	1484	2.89	1.76
$\beta$ -Ionone	1485	0.07	0.23
2-Tridecanone	1495	0.36	
Butylated Hydroxytoluene	1514	0.34	
Calamenene	1523	0.57	0.33
$\alpha$ -Muurolene	1524	5.68	2.81
(1-Butylhexyl)-benzene	1526		0.07
Dodecanoic acid	1565		0.51
(1-Ethyl-octyl)-benzene	1570	0.17	0.42
(-)-Spathulenol	1577	2.63	1.90
Isoaromadendrene epoxide	1579	1.39	
Caryophyllene oxide	1582	0.53	0.64

Diethyl Phthalate	1590	0.56	0.31
Hexadecane	1600	1.01	0.23
Ledol	1602	0.99	
(1-Methylnonyl)-benzene	1605	0.23	0.23
8-Hydroxylinalool	1619		0.43
Benzophenone	1626	0.07	0.09
(1-Pentylhexyl)-benzene	1635	0.18	0.19
$\delta$ -Cadinol	1636		1.14
Aromadendrene oxide-(2)	1639	4.70	0.34
Cubenol	1645	0.71	
(1-Propyloctyl)-benzene	1648	0.31	0.29
$\alpha$ -Cadinol	1652	1.01	
Methyl dihydrojasmonate	1666		0.34
(1-Ethylonyl)-benzene	1669	0.25	0.20
Hexadecane, 3-methyl-	1673	0.31	0.14
Pantolactone	1685	0.04	0.04
1-Heptadecene	1695	0.42	
$\beta$ -Farnesol	1696	1.51	
Heptadecane	1700	2.14	1.36
(1-Methyldecyl)-benzene	1706	0.31	0.25
Tetradecanoic acid	1720		0.46
(1-Pentylheptyl)-benzene	1728	0.35	0.37
2,6-Diisopropylnaphthalene	1728	1.87	2.60
(1-Propylonyl)-benzene	1744	0.61	0.44
D-longifolene	1760	1.12	0.24
Azulol	1772	0.22	0.16
Z-10-Pentadecenol	1772	1.45	1.67
Octadecane	1800		1.67

3-Octadecyne	1890		2.37
Ledene oxide-(II)	1890	4.13	4.17
Hexadecanoic acid, methyl ester	1912		0.43
Hexahydrofarnesyl acetone	1921	3.05	3.25
Dibutyl phthalate	1922	0.80	1.06
Phytol	1942	0.26	2.35
Isophytol	1946		0.77
9-Eicosyne	1949		1.21
n-Hexadecanoic acid	1959	0.96	0.98
Nonadecane, 2-methyl-	1966	0.23	
Eicosane	2000	4.75	7.42
1-Docosene	2195	7.15	1.34
Docosane	2200	0.99	
Heptacosane	2700	8.10	6.58
Bilinmeyen		6.29	6.11

---

RI, Kovats retensiyon indeksi

<sup>a</sup> GCxGC-TOF/MS yazılım program ile tanımlarak; isimler NIST kütle spectral kütüphanesine göre belirlenerek, her birinin Kovats retensiyon indeksleri karşılaştırılarak.

<sup>b</sup> Her bir bileşiğin Kovats retention indeksleri column Rxi 5ms literatürüne göre toplandı

<sup>c</sup> Her bir bileşiğin yüzdeleri analitin pik alanı olarak hesaplandı, total ion chromatogramın 100 kez pik alanına bölünmesiyle (çoklu belirleme durumunda , analite ait piklerin alanları bu partikül analitin toplam alanını bulmak için combine edildi).

<sup>d</sup> Belirlenemedi

İçerik analizi sonuçlarına göre; *H.adenotricum*'un çiçek kısmında % alan olarak en fazla bulunan bileşikler sırasıyla, % 9,60 2-Propen-1-ol, % 8,10 Heptacosane ve % 7,15 oranındaki 1-Docosene'dir. Gövde kısmında ise yine sırasıyla, % 7,42 Eicosane, % 6,58 Heptacosane ve % 4,69 oranındaki 2-Propen-1-ol'dür.

**Çizelge 4.1.2.** *Hypericum olympicum* türünün içerik analizi bulguları

Bileşik <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	% Alan <sup>c</sup>	
		Çiçek	Gövde
Acetic acid	600	2.68	0.08
2-Propanone, 1-hydroxy-	672	<sup>d</sup>	1.15
Pyrrrole	749	0.04	
Butanoic acid	763	0.22	0.33
Propanoic acid, 2-methyl-	763		0.96
2,3-Butanediol	785	0.20	
Hexanal	801		0.52
Methyl pyrazine	819		0.07
Furfural	828	0.55	2.01
Butanoic acid, 2-methyl-	832	0.51	0.27
2-Furanmethanol	866	0.50	1.22
2(5H)-Furanone	871	0.46	0.73
Heptanal	901		0.77
Pyrazine, ethyl-	907	0.10	
Pyrazine, 2,5-dimethyl-	908	0.46	0.11
Pentanoic acid	911	0.43	0.85
Pyrazine, 2,3-dimethyl-	915	0.10	
$\alpha$ -Pinene	939	0.17	
2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	942	0.37	0.29
2(5H)-Furanone, 5,5-dimethyl-	951	0.86	0.11
Benzaldehyde	952	0.08	0.26
Hexanoic acid	967	2.74	0.91



Phenol	980	0.24	0.21
$\beta$ -Pinene	981	0.09	
2(5H)-Furanone, 3-methyl-	983	0.08	0.22
5-Hepten-2-one, 6-methyl-	985	0.75	0.36
$\beta$ -Myrcene	988	0.36	
2-Octanone	988	0.41	0.76
Furan, 2-pentyl-	992		0.72
Octanal	998		0.76
Pyrazine, 2-ethyl-3-methyl-	1001	0.19	
2,4-Heptadienal	1005	0.07	0.38
o-Cymene	1020		0.07
Benzyl Alcohol	1026	0.29	0.23
Hexanoic acid, 2-ethyl-	1027	0.15	0.21
1-Hexanol, 2-ethyl-	1032		0.14
2-Acetylpyridine	1035	0.50	0.12
Benzeneacetaldehyde	1036	0.58	0.61
Butyl 3-methylbutanoate	1047	0.38	0.20
Acetophenone	1059	0.12	0.12
2-Nonyne	1068		0.26
Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-	1082	0.08	0.06
Heptanoic acid	1083	1.05	1.89
2-Nonanone	1087	0.13	0.22
Nonanal	1100	0.41	1.28
Undecane	1100	0.12	1.47
Phenylethyl Alcohol	1106	0.10	0.04

Maltol	1106	0.07	0.14
2(3H)-Furanone, dihydro-5-propyl-	1130	0.21	0.29
2(3H)-Furanone, ethyl-4-hydroxymethyl-	1139	0.20	0.27
Furaneol	1139	0.54	0.31
Camphor	1143	0.11	0.16
2,6-Nonadienal	1150		0.12
2-Nonenal	1157		0.23
Borneol	1165	0.08	
Octanoic Acid	1167	1.54	2.98
Melilotal	1181	0.11	0.11
2-Decanone	1190	0.07	0.27
1,2-Benzenediol	1197	0.11	0.14
Decanal	1204	0.21	0.57
2-Phenoxyethanol	1245	0.22	0.12
Nonanoic acid	1267	1.95	3.20
Thymol	1289	0.09	
Indole	1290	0.04	
2-Undecanone	1293	0.60	
Butyrolactone	1299	0.65	1.13
2-Methoxy-4-vinylphenol	1313	0.23	0.09
$\alpha$ -Cubebene	1345	1.01	0.16
n-Decanoic acid	1364	0.51	0.94
Biphenyl	1375		0.04
Tetradecane	1400	0.19	0.15
Diisobutyl phthalate	1442	1.91	1.15

2-Propen-1-ol	1448	2.81	3.77
$\alpha$ -Neoclovene	1454	0.16	
$\beta$ -Farnesene	1458	0.80	1.75
Germacrene D	1484	2.02	1.21
$\beta$ -Ionone	1485	0.51	0.47
Undecanoic acid	1490	0.61	0.63
2-Tridecanone	1495	0.04	
Pentadecane	1500	1.08	
Calamenene	1523	0.43	0.43
$\alpha$ -Muurolene	1524	3.85	2.72
(1-Butylhexyl)-benzene	1526	0.15	
Tetradecanamide	1526	0.16	0.15
(1-Propylheptyl)-benzene	1548		0.08
Dodecanoic acid	1565		0.89
(1-Ethyl-octyl)-benzene	1570	0.22	0.13
(-)-Spathulenol	1577	3.48	1.68
Isoaromadendrene epoxide	1579		0.32
Caryophyllene oxide	1582		1.21
Diethyl Phthalate	1590	0.43	0.21
Hexadecane	1600	0.64	0.39
Ledol	1602	0.98	
(1-Methylnonyl)-benzene	1605	0.24	0.24
T-Muurolol	1608		1.02
Benzophenone	1626	0.18	
$\gamma$ -Eudesmol	1630	0.55	

(1-Pentylhexyl)-benzene	1635		0.31
$\delta$ -Cadinol	1636	0.77	
Aromadendrene oxide-(2)	1639		1.14
Cubenol	1645	1.24	
(1-Propyloctyl)-benzene	1648	0.35	0.31
$\beta$ -Eudesmol	1649	2.83	0.37
$\alpha$ -Cadinol	1652	1.38	
Methyl dihydrojasmonate	1666	0.45	0.36
(1-Ethylnonyl)-benzene	1669	0.30	0.23
Hexadecane, 3-methyl-	1673	0.26	
Pantolactone	1685	0.23	0.09
1-Heptadecene	1695		0.12
$\beta$ -Farnesol	1696	0.71	0.12
Heptadecane	1700	1.79	2.76
(1-Methyldecyl)-benzene	1706	0.39	0.29
Tetradecanoic acid	1720	0.22	0.31
(1-Pentylheptyl)-benzene	1728	0.86	1.33
2,6-Diisopropylnaphthalene	1728	2.94	3.21
(1-Propylnonyl)-benzene	1744	0.44	0.22
Benzyl Benzoate	1759	0.24	
Azulol	1772	0.09	
Z-10-Pentadecenol	1772	1.13	1.39
Octadecane, 2-methyl-	1867	0.83	
3-Octadecyne	1890	0.85	0.89
Ledene oxide-(II)	1890	3.21	3.45

Hexadecanoic acid, methyl ester	1912	0.27	0.28
Farnesyl acetone	1918	0.40	
Hexahydrofarnesyl acetone	1921	4.02	1.53
Dibutyl phthalate	1922	1.54	
Dibutyl phthalate	1922	1.72	0.82
Phytol	1942	2.63	2.70
Isophytol	1946	0.33	0.45
9-Eicosyne	1949	0.99	1.13
n-Hexadecanoic acid	1959	0.33	0.42
Nonadecane, 2-methyl-	1966		0.43
Eicosane	2000	7.02	11.66
1-Docosene	2195	0.28	1.10
Heptacosane	2700	6.67	5.25
Bilinmeyen		5.74	6.50

RI, Kovats retensiyon indeksi

<sup>a</sup> GCxGC-TOF/MS yazılım program ile tanımlarak; isimler NIST kütle spectral kütüphanesine göre belirlenerek, her birinin Kovats retensiyon indeksleri karşılaştırılarak.

<sup>b</sup> Her bir bileşiğin Kovats retention indeksleri column Rxi 5ms literatürüne göre toplandı

<sup>c</sup> Her bir bileşiğin yüzdeleri analitin pik alanı olarak hesaplandı, total ion chromatogramın 100 kez pik alanına bölünmesiyle (çoklu belirleme durumunda , analite ait piklerin alanları bu partikül analitin toplam alanını bulmak için combine edildi).

<sup>d</sup> Belirlenemedi

İçerik analizi sonuçlarına göre; *H.olympicum*'un çiçek kısmında % alan olarak en fazla bulunan bileşikler sırasıyla, % 7,02 Heptacosane, % 6,67 Eicosane ve % 4,02 oranındaki Hexahydrofarnesyl acetone'dur. Gövde kısmında ise yine sırasıyla, % 11,66 Eicosane, % 5,25 Heptacosane ve % 3,77 oranındaki 2-Propen-1-ol'dür.

#### **4.2. Lenfosit Kültürü Kromozom Aberasyonu Testi (CA) Sonuçları**

HAE (gövde+çiçek), HAE (gövde) % 10 DMSO'da, HAE (çiçek) ise % 50 DMSO'da çözülerek 125, 250 ve 500 µg/ml dozları teste alındı. İnsan lenfosit kültür yöntemi ile bireyler arasında elde edilen yapısal kromozom aberasyonu olarak kromozom ve kromatid tipte gap, kromozom ve kromatid tipte kırık, disentrik kromozom oluşumu, despiralize kromozom ve metafaz figürleri, rearanjman oluşumu (exchange figürler), pulverize metafazlar değerlendirilmeye alınırken nümerik aberasyon olarak kromozom takımında eksik ve fazla olan kromozom sayıları, Total aberasyon oranları (gap ve pulverizasyon oranları dahil edilerek ve edilmeden) ve ‰o Mİ değerleri çizelge 4.2.1'de gösterilmektedir.

Ayrıca, Total aberasyon oranları (gap ve pulverizasyon oranları dahil edilerek ve edilmeden) ve ‰o Mİ değerlerin ise çizelge 4.2.2'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.2.1. HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom aberasyonu testinin sonuçları**

Madde	Doz (ppm)	N	Kromozom Gap	Kromatid Gap	Kromozom Kırık	Kromatid Kırık	Disentrik Kromozom	Spiralizasyon Hatası	Nümerik Aberasyon	Pulverizasyon	Exchange	Total Aberasyon	Gap ve Pulverizasyon Hariç Total Aberasyon	%o Mİ
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	77.60±16.63
<b>Çözücü Kontrol/a</b>	% 10 DMSO	4	0.10±0.08	0.13±0.07	0.33±0.23	0.04±0.06	0.00±0.00	0.01±0.02	0.08±0.08	0.00±0.00	0.00±0.00	0.69±0.51	0.46±0.38	69.87±7.25
<b>Çözücü Kontrol/b</b>	% 50 DMSO	4	0.15±0.12	0.49±0.54	0.24±0.08	0.20±0.20	0.01±0.01	0.04±0.04	0.06±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	1.20±0.66	0.45±0.29	70.51±15.36
<b>HAE (Gövde+Çiçek)/a</b>	125	4	0.11±0.07	0.15±0.14	0.39±0.25	0.06±0.06	0.01±0.02	0.03±0.07	0.11±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.88±0.49	0.61±0.38	68.40±5.00
	250	4	0.14±0.06	0.12±0.05	0.46±0.39	0.08±0.07	0.05±0.10	0.00±0.00	0.13±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.93±0.29	0.67±0.36	67.75±4.31
	500	4	0.19±0.10	0.42±0.42	0.46±0.40	0.04±0.02	0.00±0.01	0.02±0.04	0.18±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	1.37±1.09	0.76±0.61	65.55±4.71
<b>HAE (Gövde)/a</b>	125	4	0.13±0.11	0.37±0.19	0.27±0.12	0.20±0.06	0.00±0.01	0.08±0.05	0.05±0.03	0.00±0.01	0.00±0.00	1.12±0.41	0.60±0.22	71.50±1.29
	250	4	0.14±0.10	0.38±0.13	0.34±0.19	0.17±0.13	0.00±0.01	0.06±0.06	0.08±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	1.20±0.53	0.67±0.32	72.75±3.86
	500	4	0.20±0.18	0.48±0.23*	0.31±0.15	0.26±0.17	0.00±0.00	0.10±0.07	0.07±0.04	0.00±0.00	0.01±0.02	1.43±0.67	0.74±0.35	66.50±3.32
<b>HAE (Çiçek)/b</b>	125	4	0.14±0.02	0.11±0.15	0.20±0.16	0.02±0.03	0.00±0.00	0.02±0.05	0.13±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0.63±0.24	0.38±0.15	76.00±4.24
	250	4	0.19±0.18	0.20±0.21	0.38±0.10	0.11±0.11	0.00±0.00	0.02±0.04	0.11±0.08	0.00±0.00	0.00±0.00	0.87±0.67	0.73±0.17	74.25±3.40
	500	4	0.18±0.06	0.27±0.23	0.32±0.04	0.07±0.08	0.00±0.01	0.03±0.06	0.18±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	1.07±0.35	0.61±0.14	65.75±3.09

a: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 10 DMSO)

b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 50 DMSO)

\* : p<0,05

**Çizelge 4.2.2.** HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom aberasyonu testinin Total aberasyon oranları (gap ve pulverizasyon oranları dahil edilerek ve edilmeden) ve %o Mİ değerleri

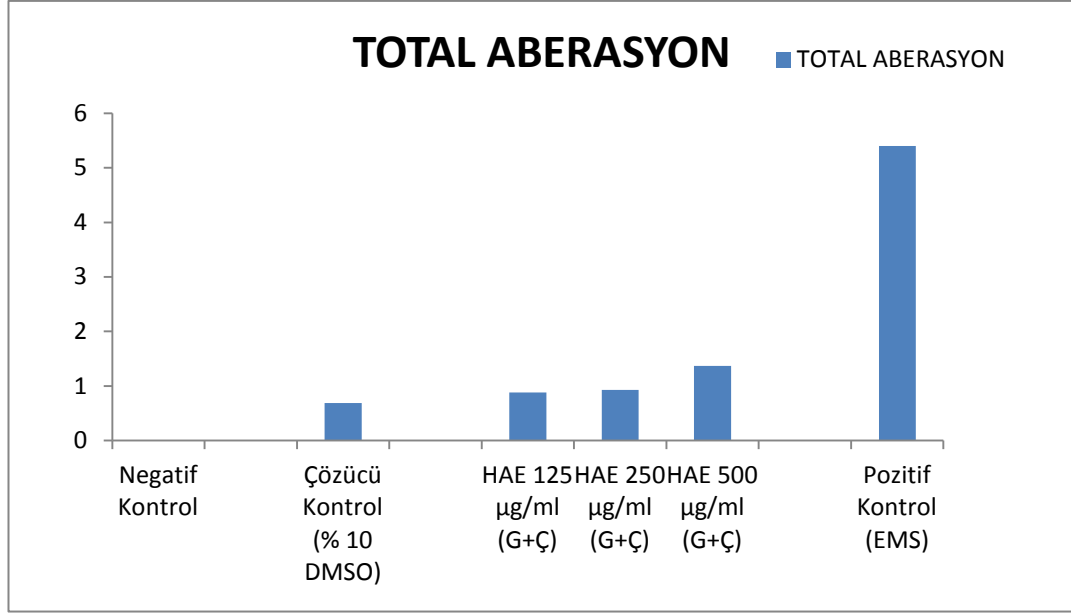
Madde	Doz (µg/ml)	N	Total Aberasyon	Gap ve Pulverizasyon Hariç Total Aberasyon	%o Mİ
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	0.00±0.00	0.00±0.00	77.60±16.63
<b>Çözücü Kontrol/a</b>	% 10 DMSO	4	0.69±0.51	0.46±0.38	69.87±7.25
<b>Çözücü Kontrol/b</b>	% 50 DMSO	4	1.20±0.66	0.45±0.29	70.51±15.36
<b>HAE (Gövde+Çiçek)/a</b>	125	4	0.88±0.49	0.61±0.38	68.40±5.00
	250	4	0.93±0.29	0.67±0.36	67.75±4.31
	500	4	1.37±1.09	0.76±0.61	65.55±4.71
<b>HAE (Gövde)/a</b>	125	4	1.12±0.41	0.60±0.22	71.50±1.29
	250	4	1.20±0.53	0.67±0.32	72.75±3.86
	500	4	1.43±0.67	0.74±0.35	66.50±3.32
<b>HAE (Çiçek)/b</b>	125	4	0.63±0.24	0.38±0.15	76.00±4.24
	250	4	0.87±0.67	0.73±0.17	74.25±3.40
	500	4	1.07±0.35	0.61±0.14	65.75±3.09
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	4	5.4±0.35	2.8±0.12	18.2±1.24

a: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 10 DMSO)

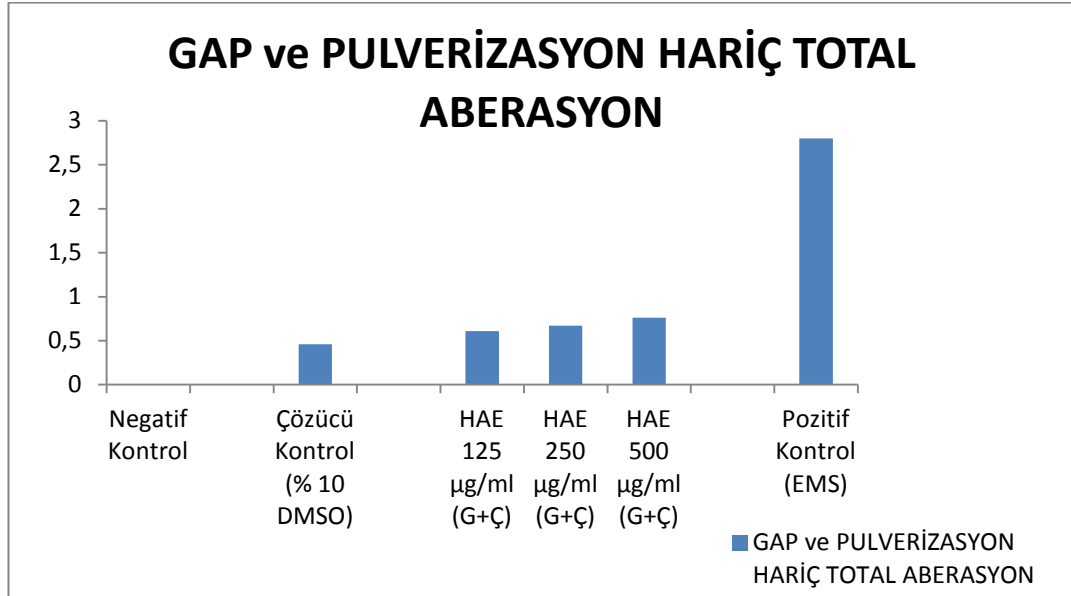
b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 50 DMSO)

HAE (Gövde+Çiçek), HAE (Gövde) ve HAE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen kromozom aberasyonu verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda total aberasyon oranına bakıldığında, HAE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 0,69 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 0,88, 250 µg/ml'lik doz grubu 0,93, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,37 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiki olarak anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.1.). Gap ve pulverizasyonun dahil edilmediği total aberasyon oranlarına bakıldığında ise; HAE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 0,46 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 0,61, 250 µg/ml'lik doz grubu 0,67, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 0,76 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiki olarak anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.2.).



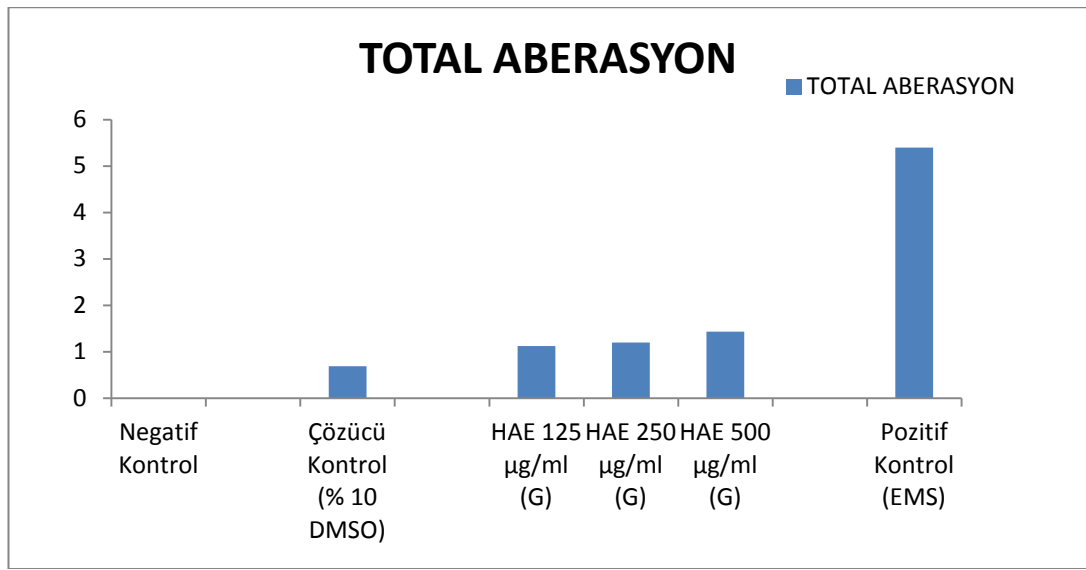


**Şekil 4.2.1.** HAE(Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları

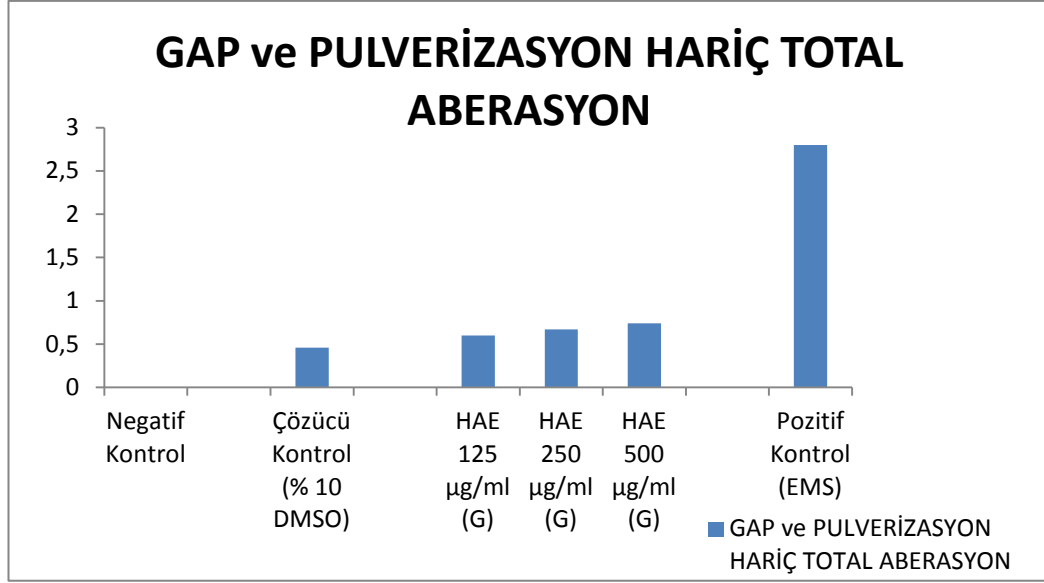


**Şekil 4.2.2.** HAE(Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları

HAE (Gövde) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 0,69 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 1,12, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,20, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,43 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiki olarak anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.3.). Gap ve pulverizasyonun dahil edilmediği total aberasyon oranlarına bakıldığında ise; HAE (Gövde) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 0,46 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 0,60, 250 µg/ml'lik doz grubu 0,67, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 0,74 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiki olarak anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.4.).

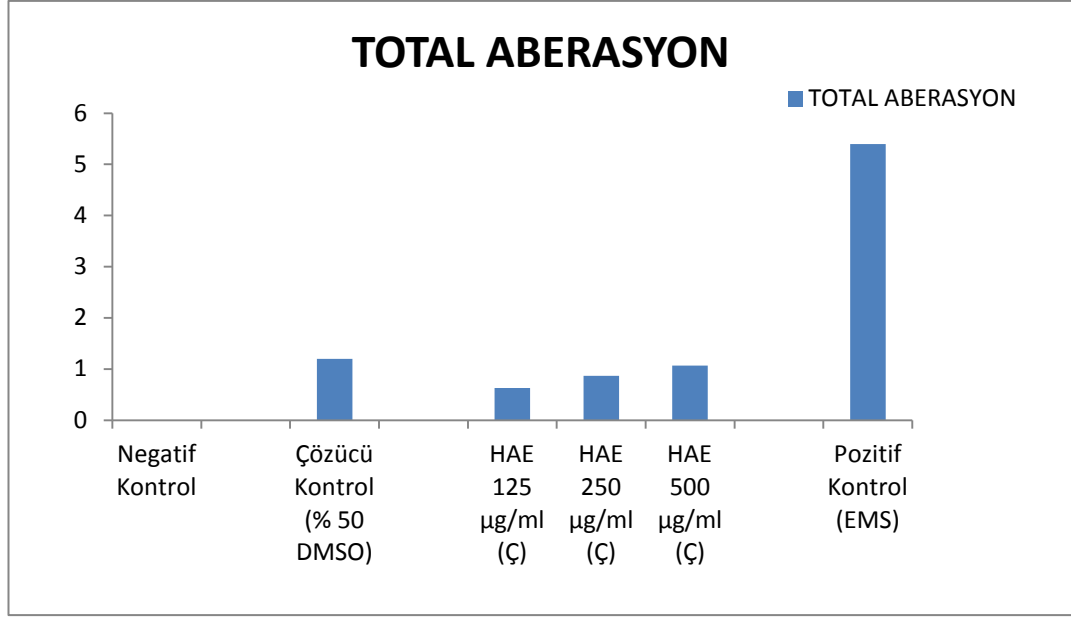


**Şekil 4.2.3.** HAE(Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları

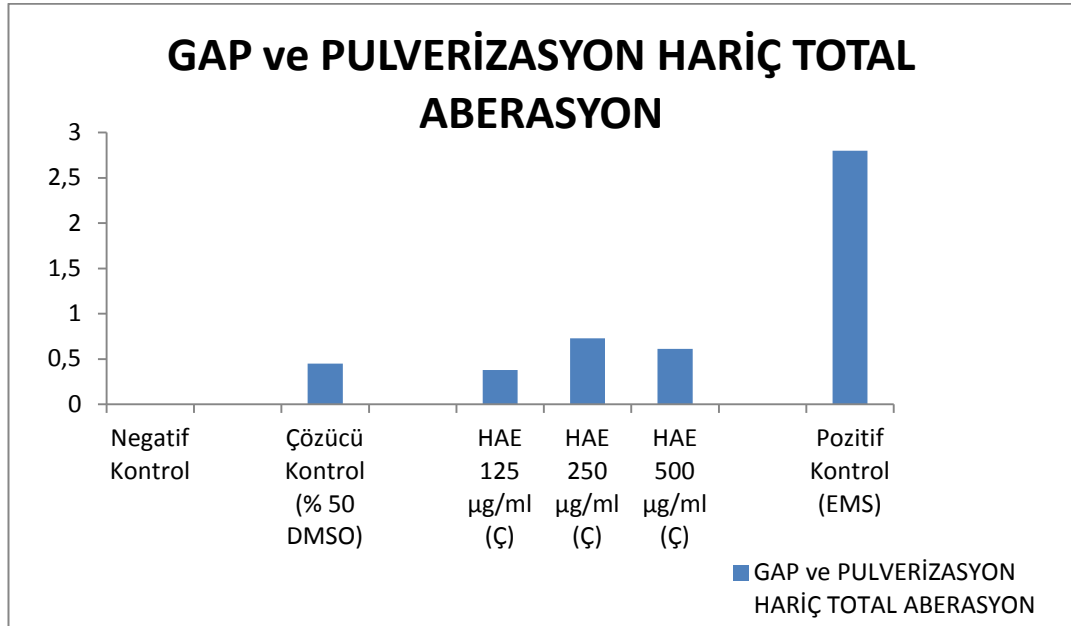


**Şekil 4.2.4.** HAE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları

HAE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 1,20 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 0,63, 250 µg/ml'lik doz grubu 0,87, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,07 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiki anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.5.). Gap ve pulverizasyonun dahil edilmediği total aberasyon oranlarına bakıldığında ise; HAE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 0,45 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 0,38, 250 µg/ml'lik doz grubu 0,73, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 0,61 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiki anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.6.).

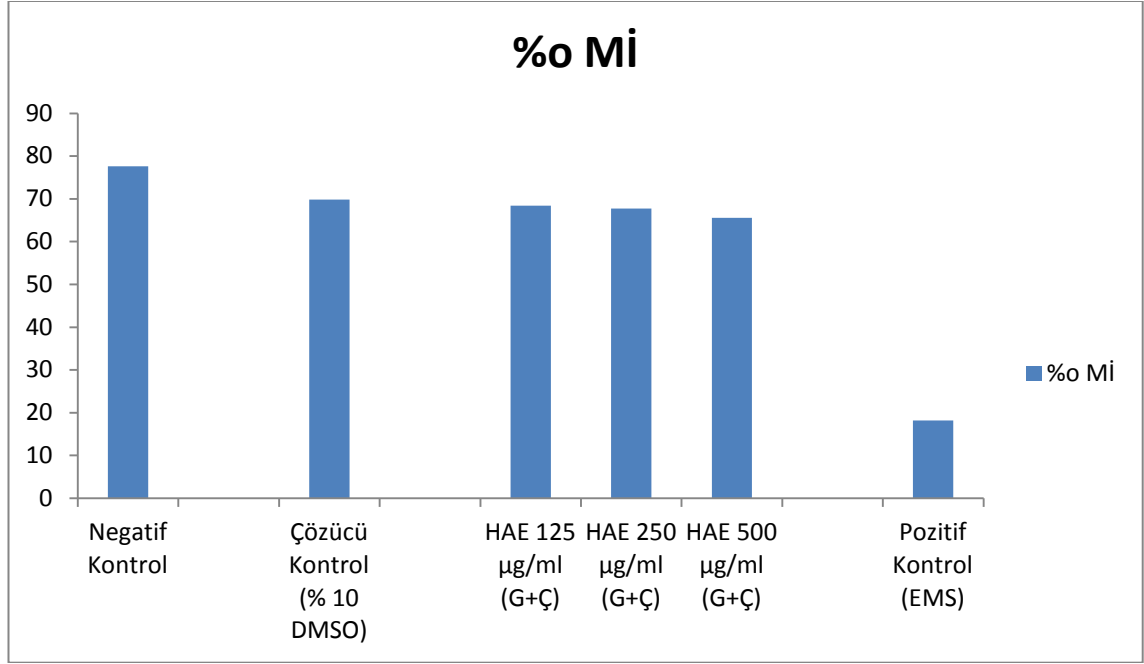


**Şekil 4.2.5.** HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları



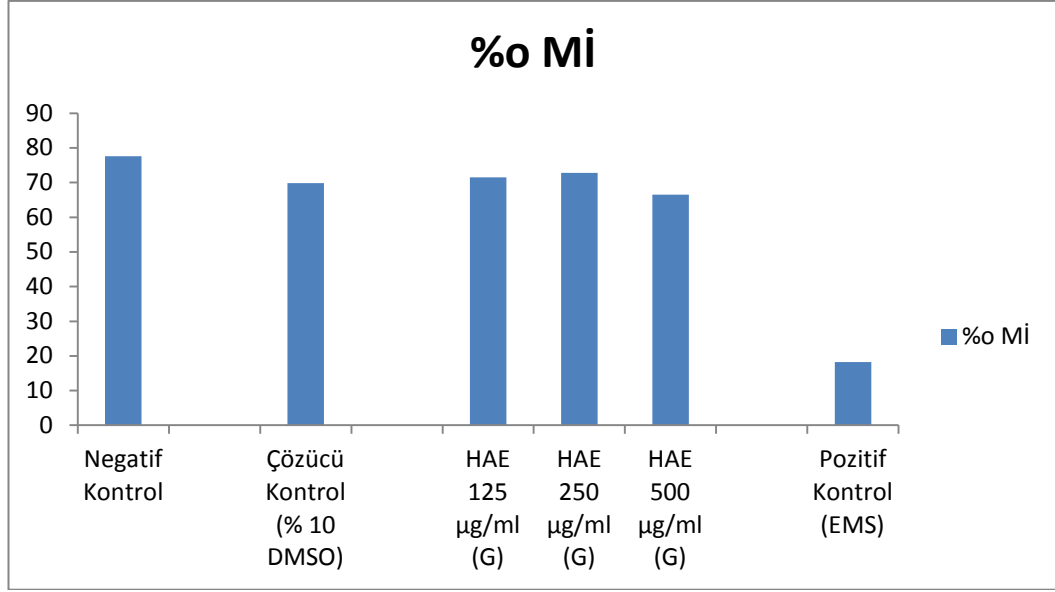
**Şekil 4.2.6.** HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları

HAE (Gövde+Çiçek), HAE (Gövde) ve HAE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen mitotik indeks (%o Mİ) verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda %o Mİ oranına bakıldığında, HAE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 69,87 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 68,40, 250 µg/ml'lik doz grubu 67,75, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 65,55 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.7.).



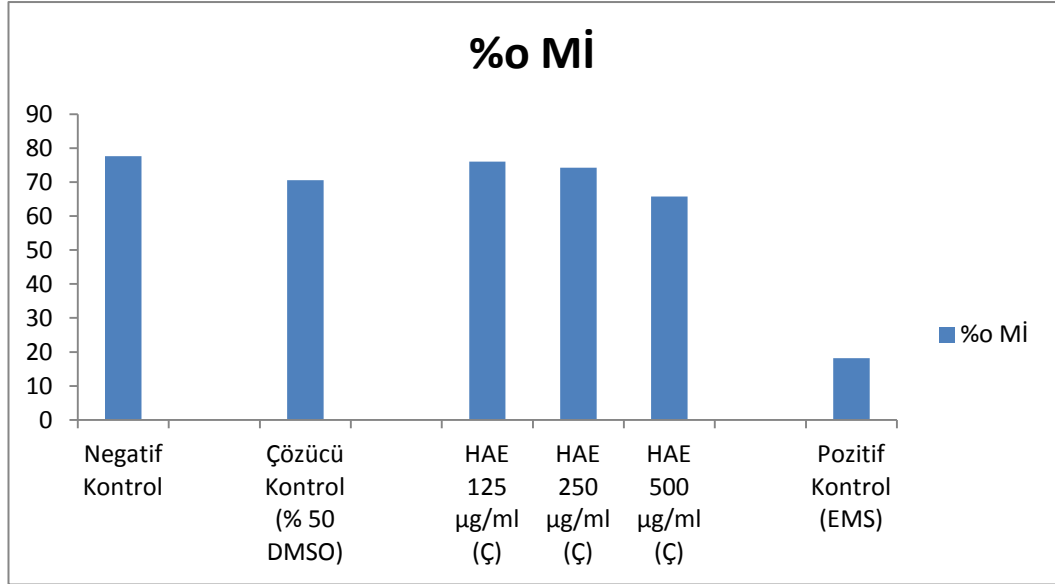
**Şekil 4.2.7.** HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları

HAE (Gövde) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 69,87 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 71,50, 250 µg/ml'lik doz grubu 72,75, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 66,50 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.8.).



**Şekil 4.2.8.** HAE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları

HAE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 69,87 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 71,50, 250 µg/ml'lik doz grubu 72,75, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 66,50 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.9.).



**Şekil 4.2.9.** HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları

HOE (gövde+çiçek), HOE (gövde) % 10 DMSO'da, HOE (çiçek) ise % 50 DMSO'da çözülerek 250, 500 ve 750 µg/ml dozları teste alındı. İnsan lenfosit kültür yöntemi ile bireyler arasında elde edilen yapısal kromozom aberasyonu olarak kromozom ve kromatid tipte gap, kromozom ve kromatid tipte kırık, disentrik kromozom oluşumu, despiralize kromozom ve metafaz figürleri, rearanjman oluşumu (exchange figürler), pulverize metafazlar değerlendirmeye alınırken nümerik aberasyon olarak kromozom takımında eksik ve fazla olan kromozom sayıları, Total aberasyon oranları (gap ve pulverizasyon oranları dahil edilerek ve edilmeden) ve ‰o Mİ değerleri çizelge 4.2.3'de gösterilmektedir.

Ayrıca, Total aberasyon oranları (gap ve pulverizasyon oranları dahil edilerek ve edilmeden) ve ‰o Mİ değerlerin ise çizelge 4.2.4'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.2.3.** HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom aberasyonu testi sonuçları  
( a: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 10 DMSO), b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 50 DMSO) \*: p<0,05)

Madde	Doz (µg/ml)	N	Kromozom Gap	Kromatid Gap	Kromozom Kırık	Kromatid Kırık	Disentrik Kromozom	Spiralizasyon Hatası	Nümerik Aberasyon	Pulverizasyon	Exchange	Total Anomali	Gap ve Pulverizasyon Hariç Total Anomali	% Mİ
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	77.60±16.63
<b>Çözücü Kontrol/a</b>	% 10 DMSO	4	0.10±0.08	0.13±0.07	0.33±0.23	0.04±0.06	0.00±0.00	0.01±0.02	0.08±0.08	0.00±0.00	0.00±0.00	0.69±0.51	0.46±0.38	69.87±7.25
<b>Çözücü Kontrol/b</b>	% 50 DMSO	4	0.15±0.12	0.49±0.54	0.24±0.08	0.20±0.20	0.01±0.01	0.04±0.04	0.06±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	1.20±0.66	0.45±0.29	70.51±15.36
<b>HOE (Gövde+Çiçek)/b</b>	250	4	0.14±0.18	0.40±0.53	0.55±0.10	0.29±0.46	0.00±0.01	0.12±0.20	0.07±0.08	0.00±0.00	0.00±0.00	1.62±1.24	1.07±0.54	67.60±13.45
	500	4	0.15±0.06	0.38±0.42	0.51±0.23	0.19±0.12	0.03±0.04	0.03±0.02	0.07±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00	1.21±0.70	0.67±0.29	67.87±13.97
	750	4	0.13±0.06	0.47±0.30	0.36±0.18	0.16±0.11	0.02±0.04	0.04±0.02	0.03±0.05	0.01±0.02	0.00±0.00	1.24±0.31	0.63±0.08	70.45±24.16
<b>HOE (Gövde)/b</b>	250	4	0.15±0.08	0.29±0.06	0.48±0.13*	0.19±0.10	0.00±0.01	0.11±0.11	0.07±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	1.32±0.30	0.83±0.17	73.25±2.75
	500	4	0.14±0.10	0.34±0.19	0.30±0.15	0.28±0.17	0.00±0.00	0.09±0.05	0.10±0.09	0.00±0.01	0.00±0.00	1.28±0.51	0.78±0.25	72.00±4.32
	750	4	0.19±0.07	0.39±0.15	0.24±0.11	0.21±0.16	0.00±0.00	0.07±0.07	0.20±0.08*	0.01±0.02	0.00±0.00	1.28±0.56	0.63±0.42	69.00±2.45
<b>HOE (Çiçek)/a</b>	250	4	0.08±0.04	0.16±0.05	0.19±0.11	0.05±0.05	0.00±0.01	0.00±0.00	0.13±0.10	0.00±0.00	0.00±0.01	0.64±0.05	0.40±0.07	72.00±4.24
	500	4	0.12±0.11	0.18±0.16	0.33±0.10	0.11±0.19	0.00±0.01	0.07±0.15	0.06±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.92±0.51	0.61±0.27	65.75±6.13
	750	4	0.14±0.16	0.26±0.34	0.32±0.19	0.08±0.13	0.00±0.01	0.05±0.10	0.10±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.97±0.68	0.56±0.26	66.50±5.26



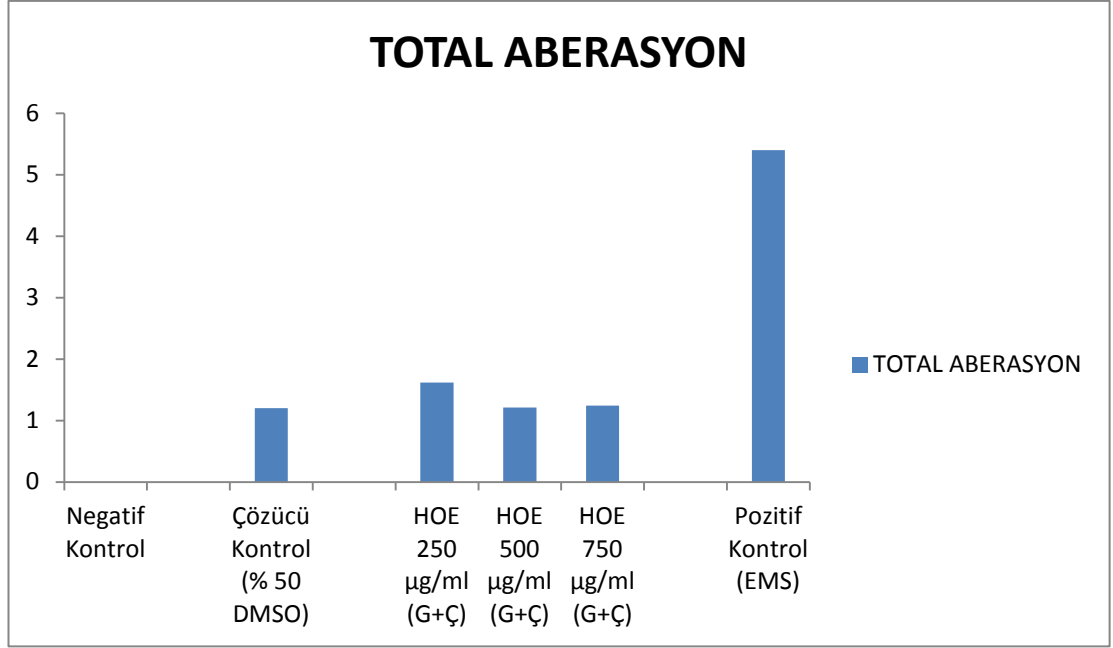
**Çizelge 4.2.4.** HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom aberasyonu testinin Total aberasyon oranları (gap ve pulverizasyon oranları dahil edilerek ve edilmeden) ve %o Mİ değerlerin ortalama değerleri

Madde	Doz (µg/ml)	N	Total Anomali	Gap ve Pulverizasyon Hariç Total Anomali	%o Mİ
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	0.00±0.00	0.00±0.00	77.60±16.63
<b>Çözücü Kontrol/a</b>	% 10 DMSO	4	0.69±0.51	0.46±0.38	69.87±7.25
<b>Çözücü Kontrol/b</b>	% 50 DMSO	4	1.20±0.66	0.45±0.29	70.51±15.36
<b>HOE (Gövde+Çiçek)/b</b>	250	4	1.62±1.24	1.07±0.54	67.60±13.45
	500	4	1.21±0.70	0.67±0.29	67.87±13.97
	750	4	1.24±0.31	0.63±0.08	70.45±24.16
<b>HOE (Gövde)/b</b>	250	4	1.32±0.30	0.83±0.17	73.25±2.75
	500	4	1.28±0.51	0.78±0.25	72.00±4.32
	750	4	1.28±0.56	0.63±0.42	69.00±2.45
<b>HOE (Çiçek)/a</b>	250	4	0.64±0.05	0.40±0.07	72.00±4.24
	500	4	0.92±0.51	0.61±0.27	65.75±6.13
	750	4	0.97±0.68	0.56±0.26	66.50±5.26
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	4	5.4±0.35	2.8±0.12	18.2±1.24

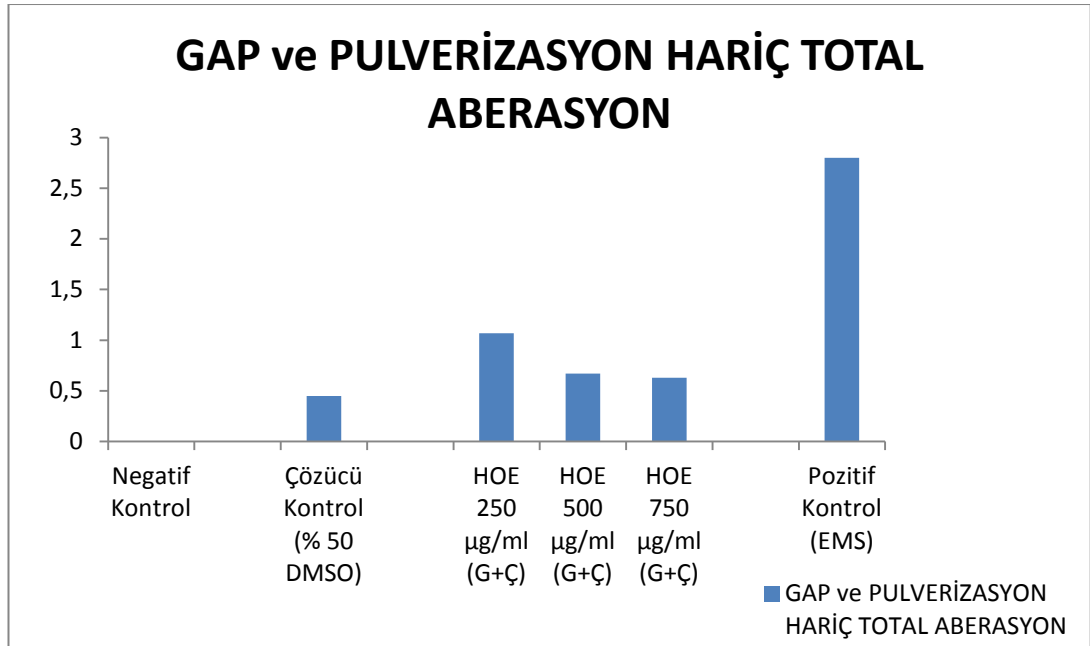
a: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 10 DMSO)

b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 50 DMSO)

HOE (Gövde+Çiçek), HOE (Gövde) ve HOE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen kromozom aberasyonu verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda total aberasyon oranına bakıldığında, HOE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 1,20 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,62, 500 µg/ml'lik doz grubu 1,21, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,24 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.10.). Gap ve pulverizasyonun dahil edilmediği total aberasyon oranlarına bakıldığında ise; HOE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 0,45 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,07, 500 µg/ml'lik doz grubu 0,67, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 0,63 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.11.).

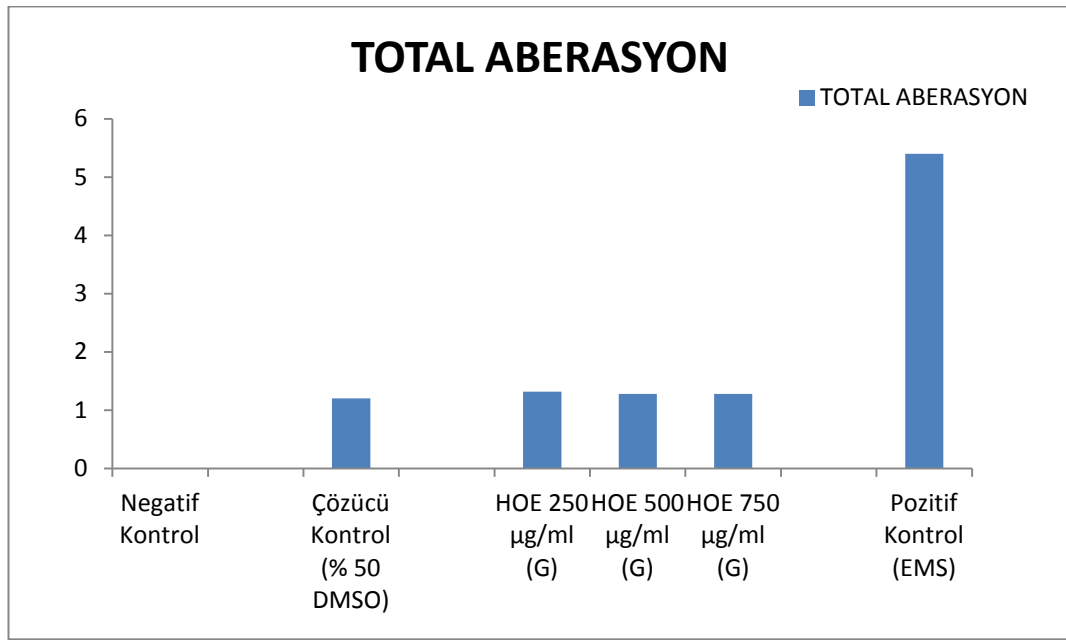


**Şekil 4.2.10.** HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları

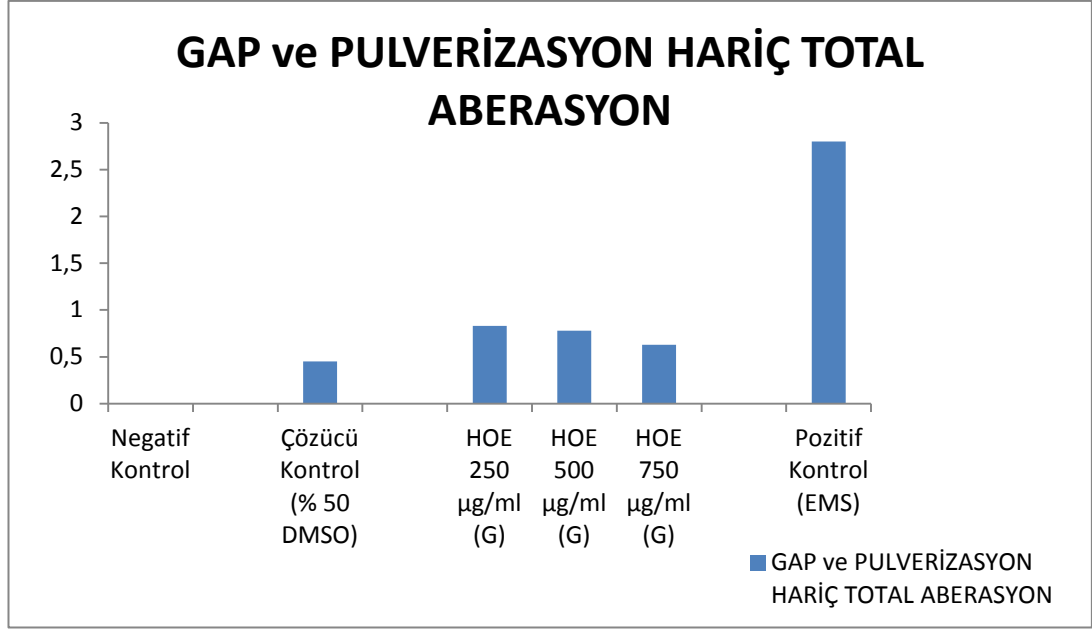


**Şekil 4.2.11.** HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları

HOE (Gövde) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 1,20 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,32, 500 µg/ml'lik doz grubu 1,28, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,28 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.12.). Gap ve pulverizasyonun dahil edilmediği total aberasyon oranlarına bakıldığında ise; HOE (Gövde) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 0,45 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 0,83, 500 µg/ml'lik doz grubu 0,78, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 0,63 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.13.).

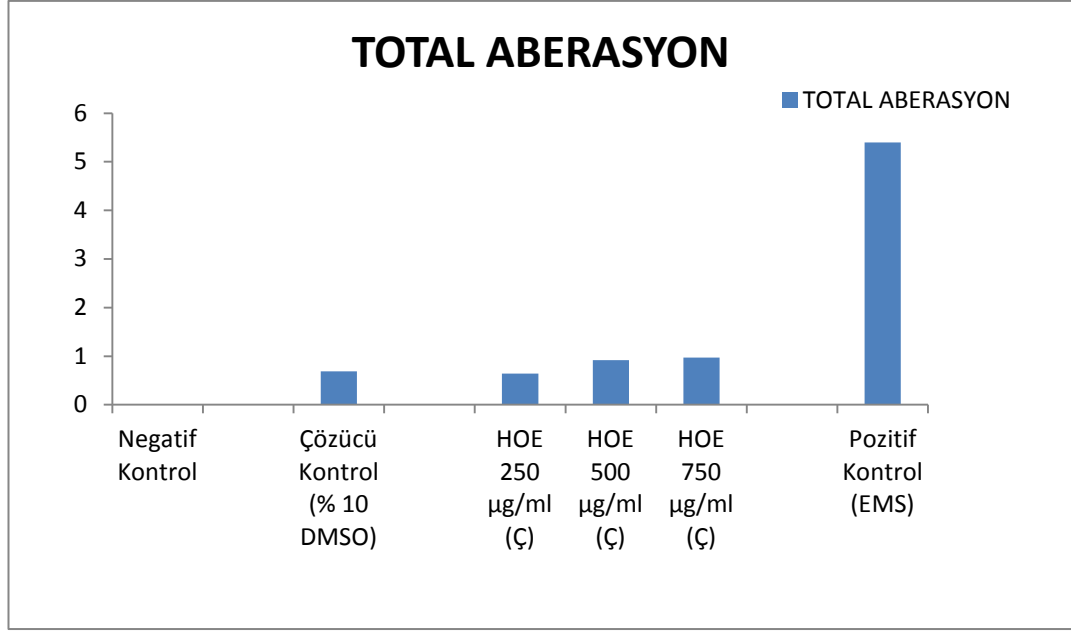


**Şekil 4.2.12.** HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları

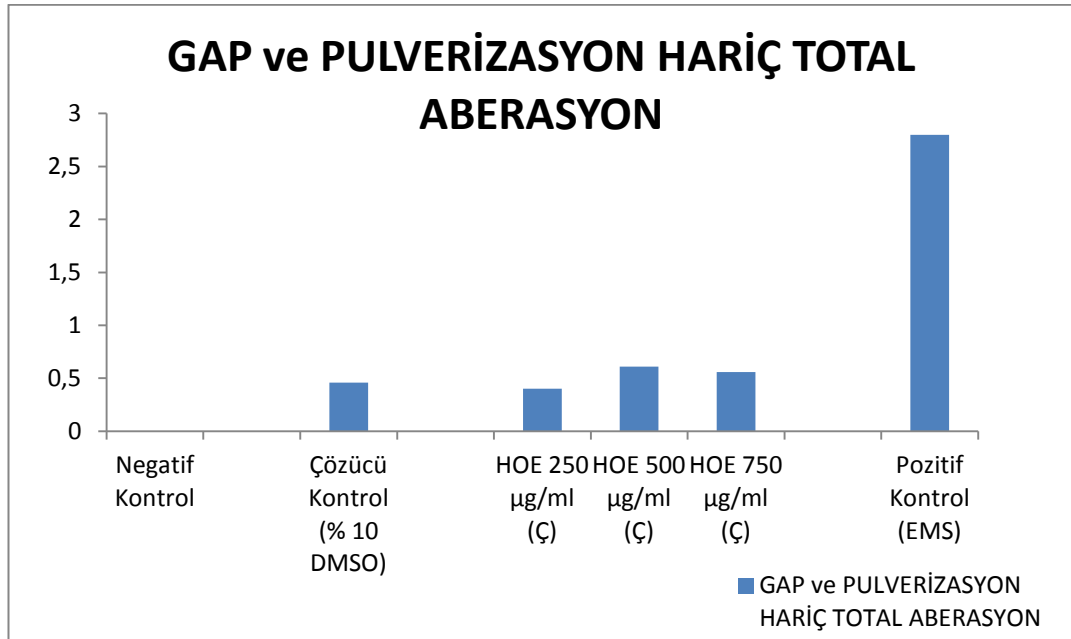


**Şekil 4.2.13.** HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları

HOE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 0,69 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 0,64, 500 µg/ml'lik doz grubu 0,92, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 0,97 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiki anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.14.). Gap ve pulverizasyonun dahil edilmediği total aberasyon oranlarına bakıldığında ise; HOE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 0,46 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 0,40, 500 µg/ml'lik doz grubu 0,61, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 0,56 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.15.).

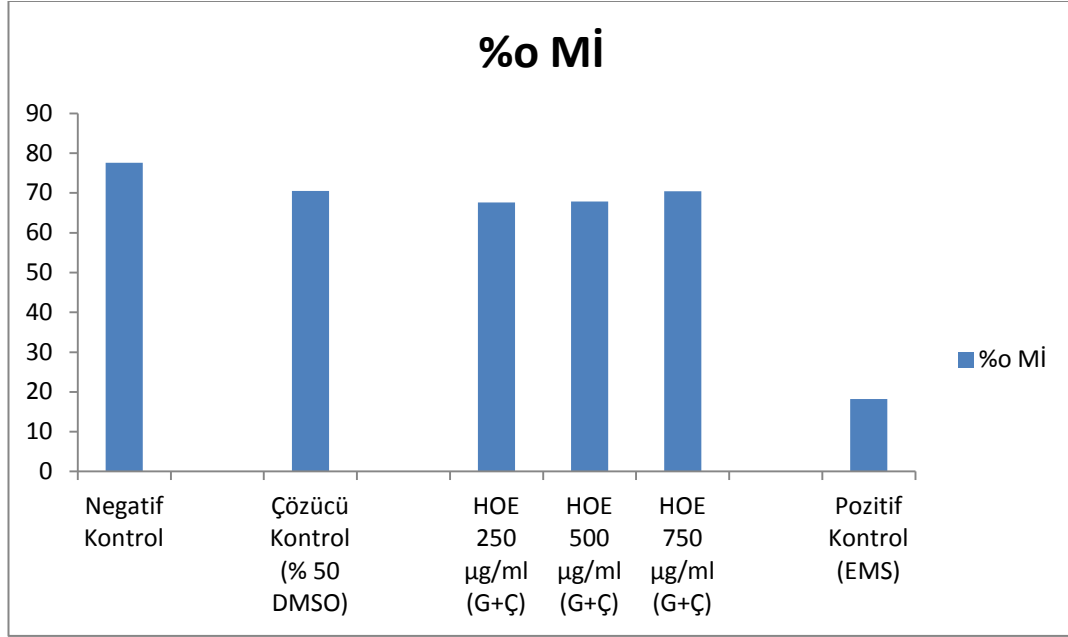


**Şekil 4.2.14.** HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total aberasyon oranları



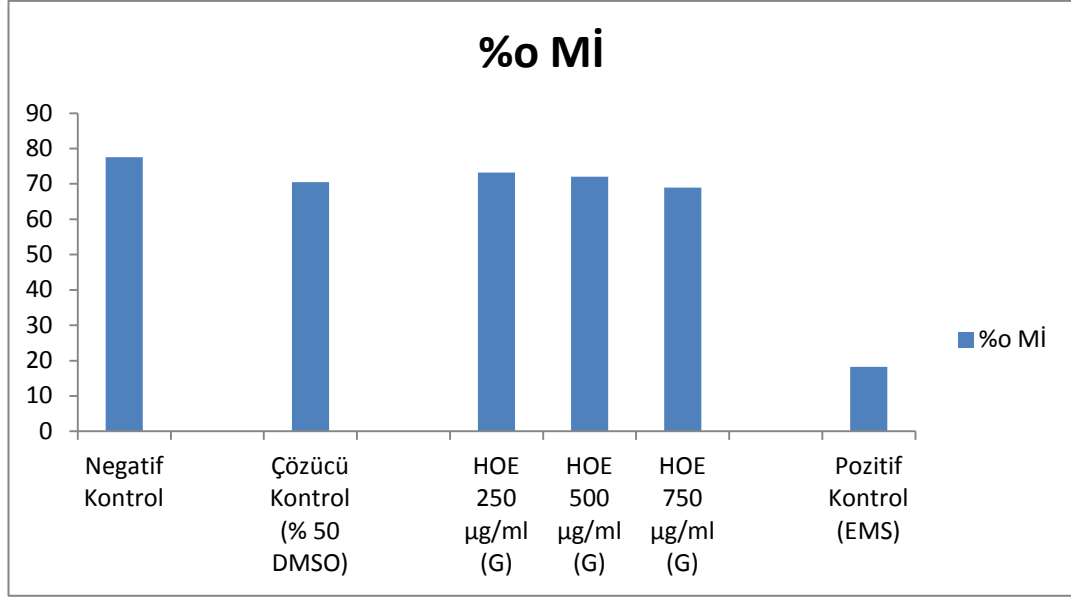
**Şekil 4.2.15.** HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin gap ve pulverizasyonların dahil edilmediği total aberasyon oranları

HOE (Gövde+Çiçek), HOE (Gövde) ve HOE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen mitotik indeks (%o Mİ) verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda %o Mİ oranına bakıldığında, HOE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 70,51 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 67,60, 250 µg/ml'lik doz grubu 67,87, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 70,45 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.16.).



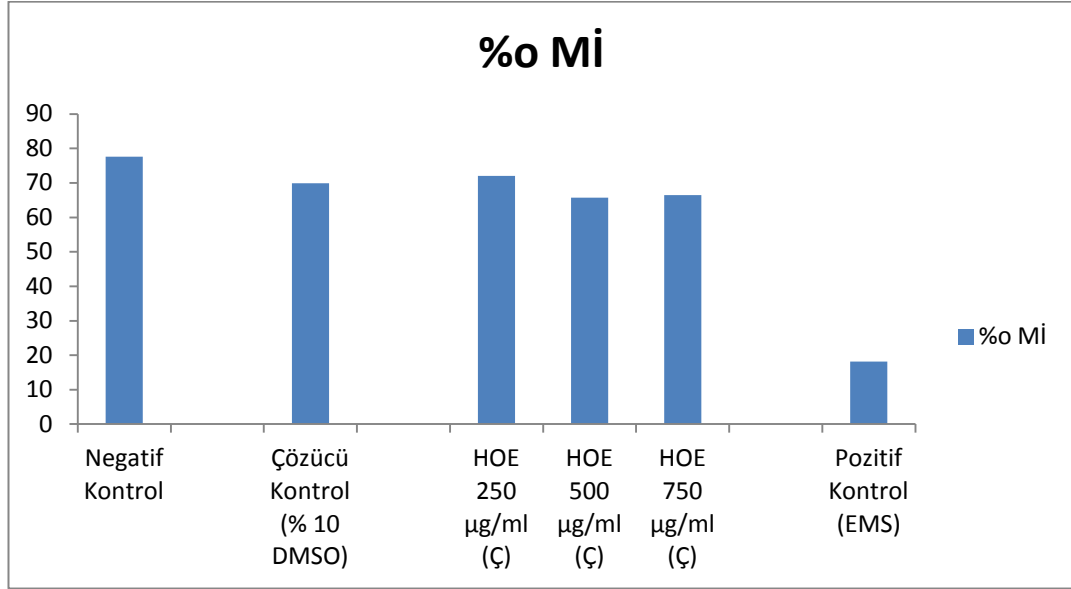
**Şekil 4.2.16.** HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları

HOE (Gövde) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 70,51 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 73,25 250 µg/ml'lik doz grubu 72,00, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 69,00 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.17.).



**Şekil 4.2.17.** HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları

HOE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 69,87 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 72,00 250 µg/ml'lik doz grubu 65,75, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 66,50 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda anlamlılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.18.).



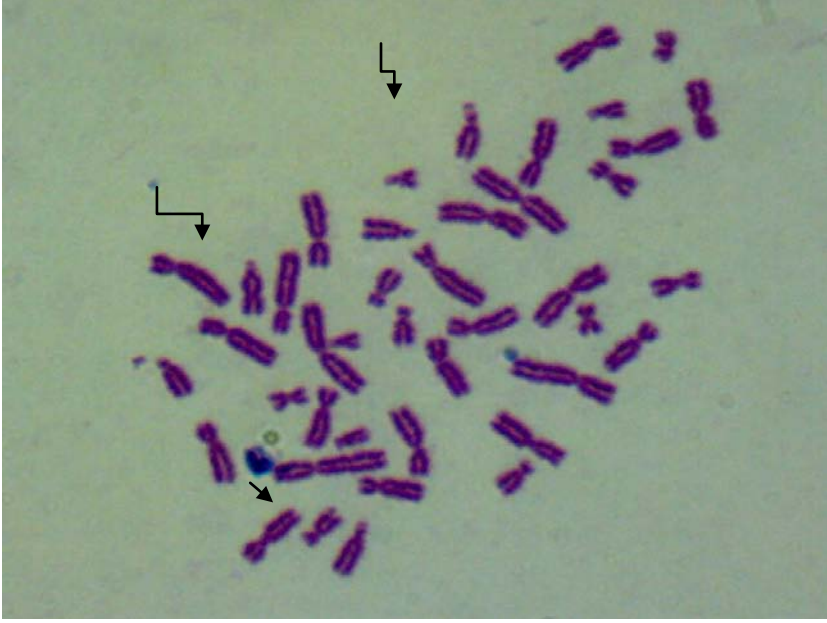
**Şekil 4.2.18.** HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%o Mİ) oranları

HAE (Gövde+Çiçek), (Gövde), (Çiçek) kısımlarının 125, 250 ve 500 µg/ml'lık dozları ile elde edilen tüm Kromozom Aberasyonu Testi verileri Çizelge 4.2.1-2 ve Şekil 4.2.1-9'da verilmektedir.

Yine aynı şekilde HOE (Gövde+Çiçek), (Gövde), (Çiçek) kısımlarının 250, 500 ve 750 µg/ml'lık dozları ile elde edilen tüm Kromozom Aberasyonu Testi verileri Çizelge 4.2.3-4 ve Şekil 4.2.10-18'de verilmektedir.

HAE ve HOE ile gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu Testi sonucunda gözlenen metafaz safhasındaki anomalili kromozom fotoğrafları Şekil 4.2.19-20'de görülmektedir.





**Şekil 4.2.19.** 750 µg/ml HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması ile Kromozom Aberasyonu Testi sonucu elde edilen kromatid ve kromozom gap ile nüberik aberasyonun (42 kromozom) görüldüğü metafaz plağı (  $\lrcorner$  kromozom gap,  $\rightarrow$  kromatid gap)



**Şekil 4.2.20.** 750 µg/ml HOE (Gövde) uygulaması ile Kromozom Aberasyonu Testi sonucu elde edilen çok sayıda kromatid gap'in görüldüğü metafaz plağı ( $\rightarrow$  kromatid gap)

### 4.3. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Test Sonuçları

HAE (gövde+çiçek), HAE (gövde) % 10 DMSO'da, HAE (çiçek) ise % 50 DMSO'da çözülerek 125, 250 ve 500 µg/ml dozları teste alındı. İnsan lenfosit kültür yöntemi ile bireyler arasında elde edilen SCE ve PRI verileri Çizelge 4.3.1. de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.3.1.** HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin ortalama değerleri

Madde	Doz (µg/ml)	N	SCE/Hücre	Proliferatif İndeks (PRI)
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	4.09±2.03	2.01±0.17
<b>Çözücü Kontrol a</b>	% 10	4	8.02±0.60	2.16±0.06
<b>Çözücü Kontrol b</b>	DMSO		7.84±2.42	1.92±0.08
	% 50	4		
	DMSO			
<b>HAE (Gövde + Çiçek)a</b>	125	4	9.82±0.78	1.96±0.19
	250	4	11.39±1.16**	1.97±0.11
	500	4	13.94±0.64***	1.87±0.21
<b>HAE (Gövde)a</b>	125	4	9.32±0.98	2.10±0.25
	250	4	11.98±1.47**	2.09±0.31
	500	4	13.25±0.27***	2.00±0.30
<b>HAE (Çiçek)b</b>	125	4	9.41±0.34	2.01±0.12
	250	4	12.20±0.97*	2.00±0.09
	500	4	14.13±1.21***	2.03±0.17
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	4	25.37±10.25	1.82±0.22

a : % 10 DMSO çözücü kontrolü ile karşılaştırma

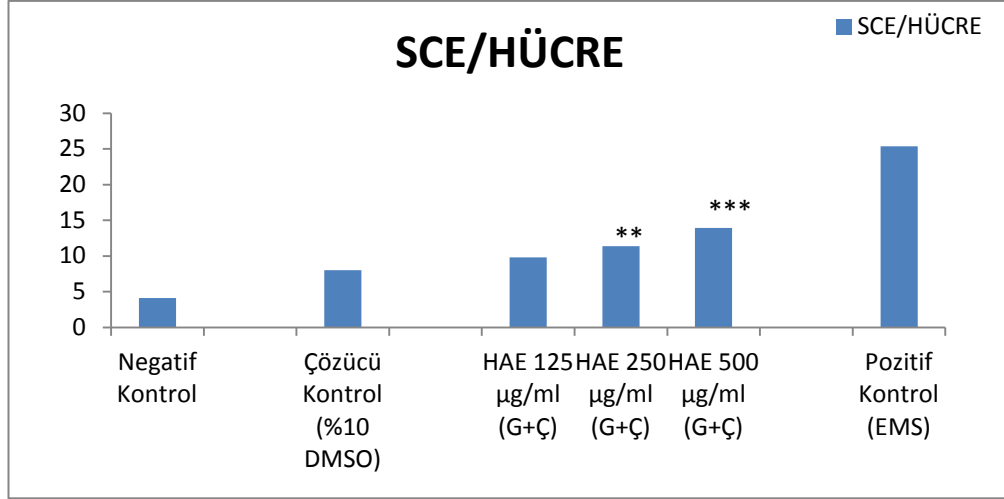
b : % 50 DMSO çözücü kontrolü ile karşılaştırma

\* : p<0,05

\*\* : p<0,005

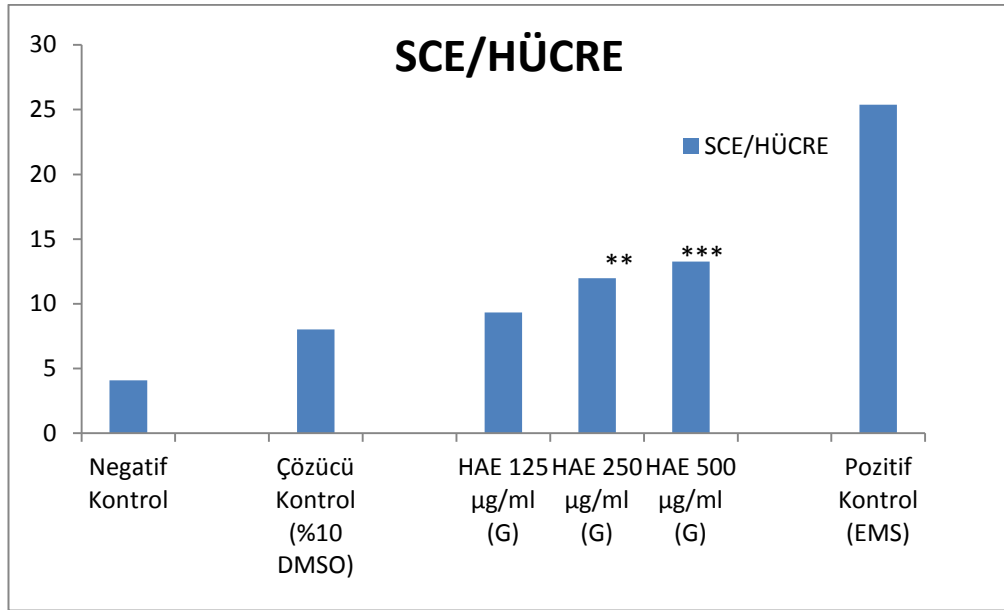
\*\*\*: p<0,0001

HAE (Gövde+Çiçek), HAE (Gövde) ve HAE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen SCE/Hücre verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda SCE/Hücre oranına bakıldığında, HAE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 8,02 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 9,82, 250 µg/ml'lik doz grubu 11,39, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 13,94 olduğu ve çözücü kontrole göre 250 ve 500 µg/ml'lik doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.1. p<0,005, p<0,0001 sırasıyla).



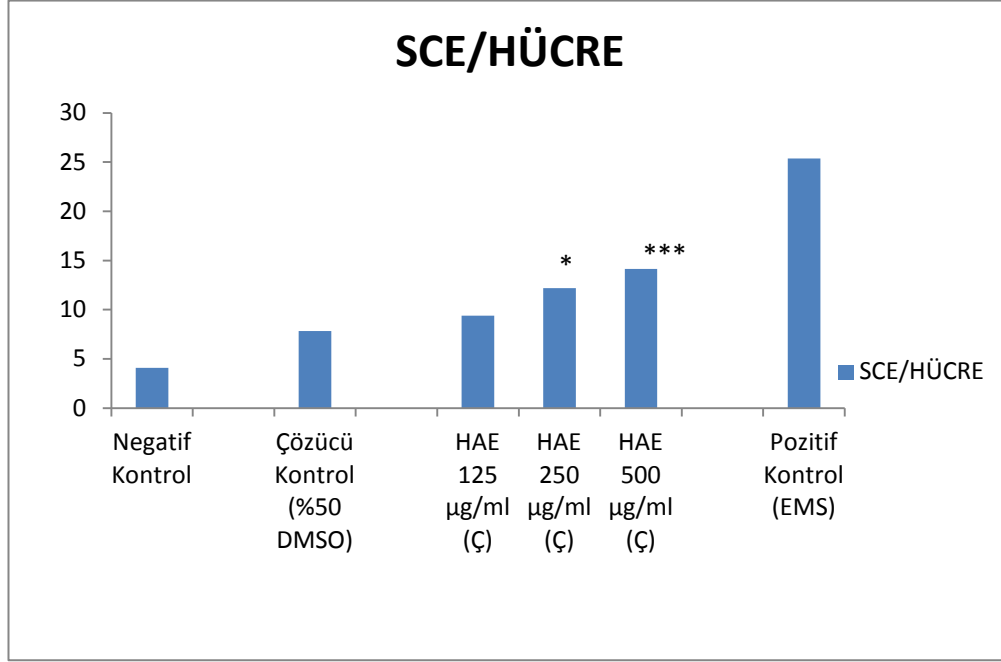
**Şekil 4.3.1.** HAE(Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (\*\*:  $p<0,005$ , \*\*\*:  $p<0,0001$ )

HAE (Gövde) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 8,02 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 9,32, 250 µg/ml'lik doz grubu 11,98, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 13,25 olduğu ve çözücü kontrole göre yine 250 ve 500 µg/ml'lik doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.2.  $p<0,005$ ,  $p<0,0001$  sırasıyla).



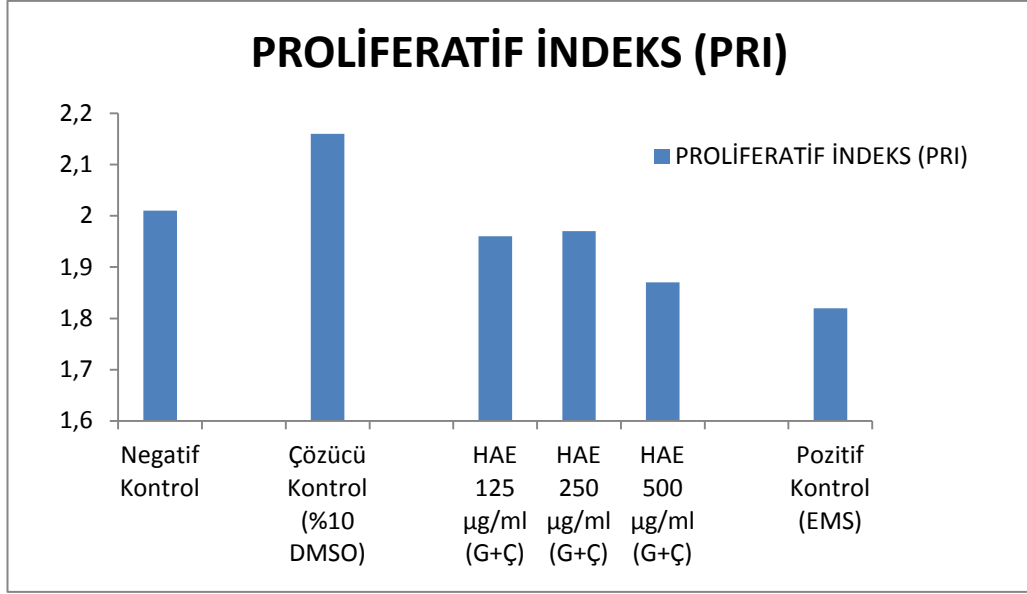
**Şekil 4.3.2.** HAE(Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (\*\*:  $p<0,005$ , \*\*\*:  $p<0,0001$ )

HAE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 7,84 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 9,41, 250 µg/ml'lik doz grubu 12,20, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 14,13 olduğu ve çözücü kontrole göre 250 ve 500 µg/ml'lik doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.3.  $p<0,05$ ,  $p<0,0001$  sırasıyla).



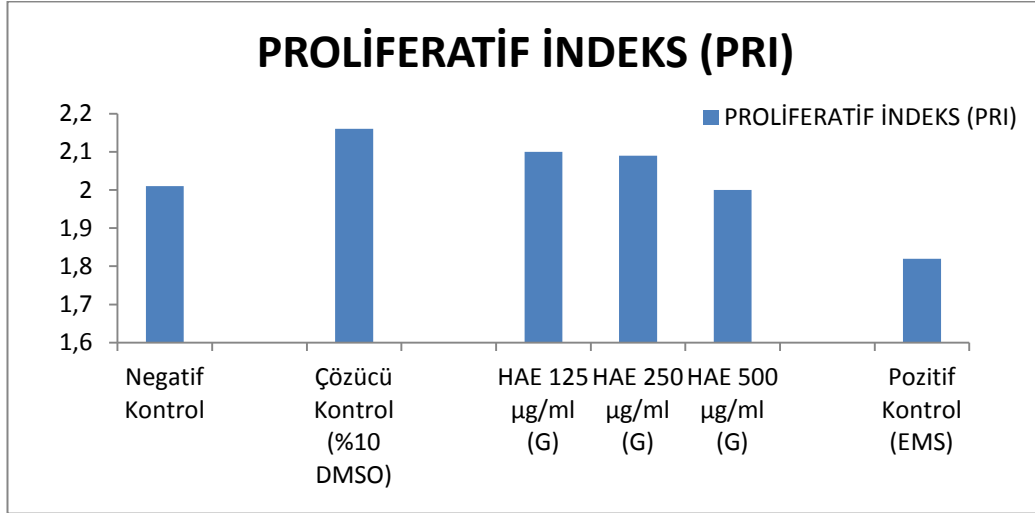
**Şekil 4.3.3** HAE(Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranlarını (\*:  $p<0,05$ , \*\*\*:  $p<0,0001$ )

HAE (Gövde+Çiçek), HAE (Gövde) ve HAE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen Proliferatif indeks (PRI) verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda Proliferatif indeks (PRI) değerlerine bakıldığında, HAE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 2,16 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 1,96, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,97, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,87 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalışın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.3.4.).



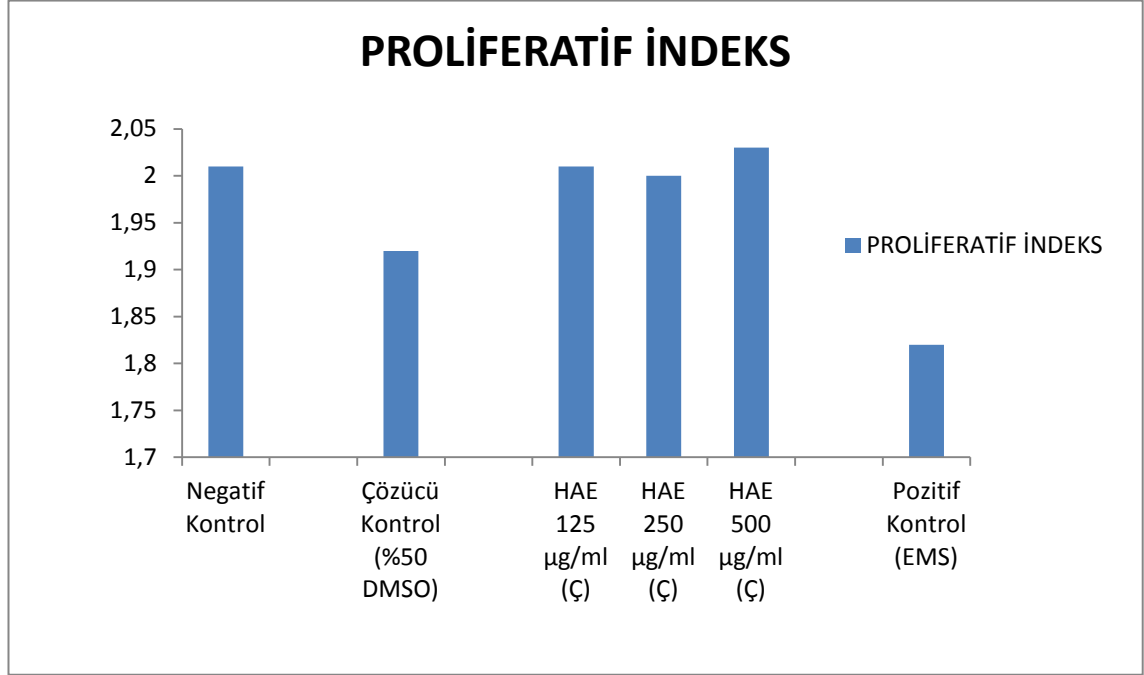
**Şekil 4.3.4.** HAE(Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları

HAE (Gövde) için proliferatif indeks; çözücü kontrol grubunda (% 10 DMSO) 2,16 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 2,10, 250 µg/ml'lik doz grubu 2,09, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 2,00 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalışın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.3.5.).



**Şekil 4.3.5.** HAE(Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları

Proliferatif indeks değerlerinin HAE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 1,92 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 2,01, 250 µg/ml'lik doz grubu 2,00, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 2,03 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalışın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.3.6.).



**Şekil 4.3.6.** HAE(Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları

HOE (gövde+çiçek), HOE (gövde) % %0 DMSO'da, HOE (çiçek) ise % 10 DMSO'da çözülerek 250, 500 ve 750 µg/ml dozları teste alındı. İnsan lenfosit kültür yöntemi ile bireyler arasında elde edilen SCE ve PRI verileri Çizelge 4.3.2. de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.3.2.** HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin ortalama değerleri

Madde	Doz (µg/ml)	N	SCE/Hücre	Proliferatif İndeks (PRI)
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	4.09±2.03	2.01±0.17
<b>Çözücü Kontrol a</b>	% 10 DMSO	4	8.02±0.60	2.16±0.06
<b>Çözücü Kontrol b</b>	% 50 DMSO	4	7.85±2.42	1.92±0.08
<b>HOE (Gövde + Çiçek)b</b>	250	4	10.67±2.19	1.96±0.27
	500	4	12.47±2.18*	1.76±0.13
	750	4	15.28±1.64**	1.71±0.11
<b>HOE (Gövde)b</b>	250	4	8.70±0.82	1.85±0.32
	500	4	12.21±0.60**	1.81±0.23
	750	4	13.81±0.50***	1.67±0.18
<b>HOE (Çiçek)a</b>	250	4	9.06±0.88	1.99±0.11
	500	4	13.38±0.48***	2.03±0.11
	750	4	16.88±1.54***	1.96±0.05
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	4	25.37±10.25	1.82±0.22

a: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 10 DMSO)

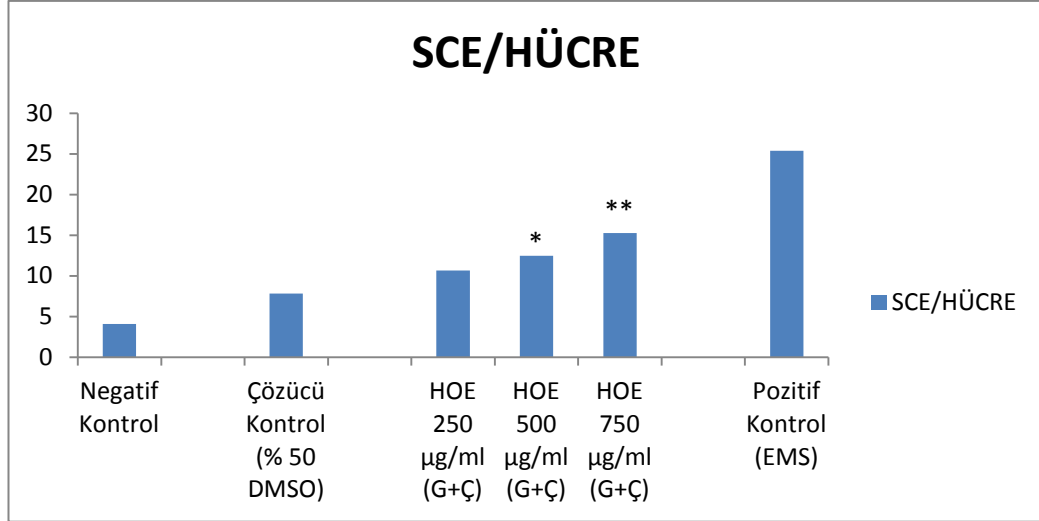
b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 50 DMSO)

\*: p<0,05

\*\* : p<0,005

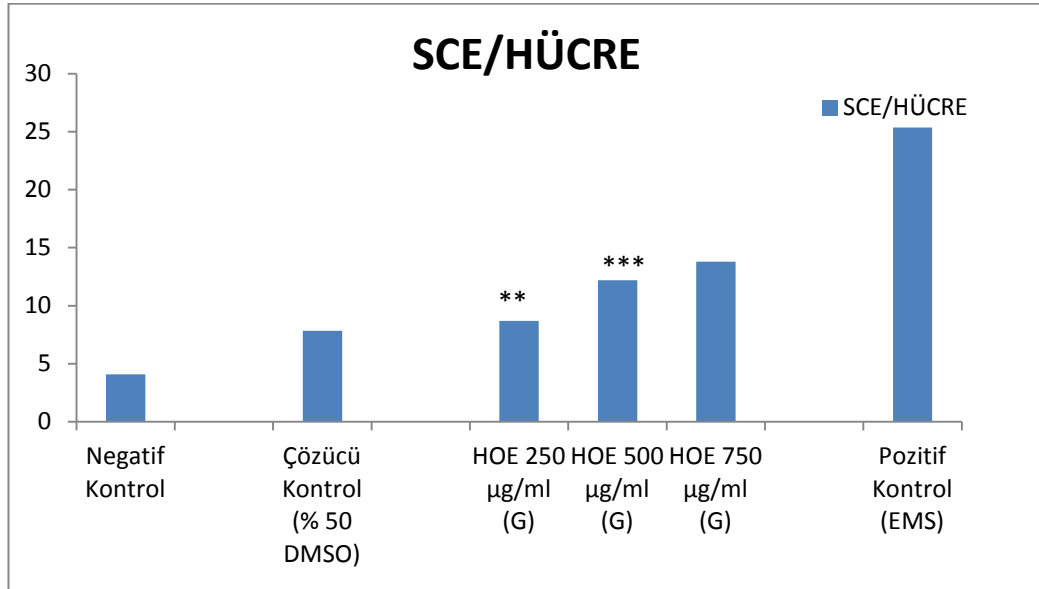
\*\*\*: p<0,0001

HOE (Gövde+Çiçek), HOE (Gövde) ve HOE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen SCE/Hücre verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda SCE/Hücre oranına bakıldığında, HOE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 7,85 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 10,67, 250 µg/ml'lik doz grubu 12,47, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 15,28 olduğu ve çözücü kontrole göre 500 ve 750 µg/ml'lik doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.7. p<0,05, p<0,005 sırasıyla).



**Şekil 4.3.7.** HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,005$ )

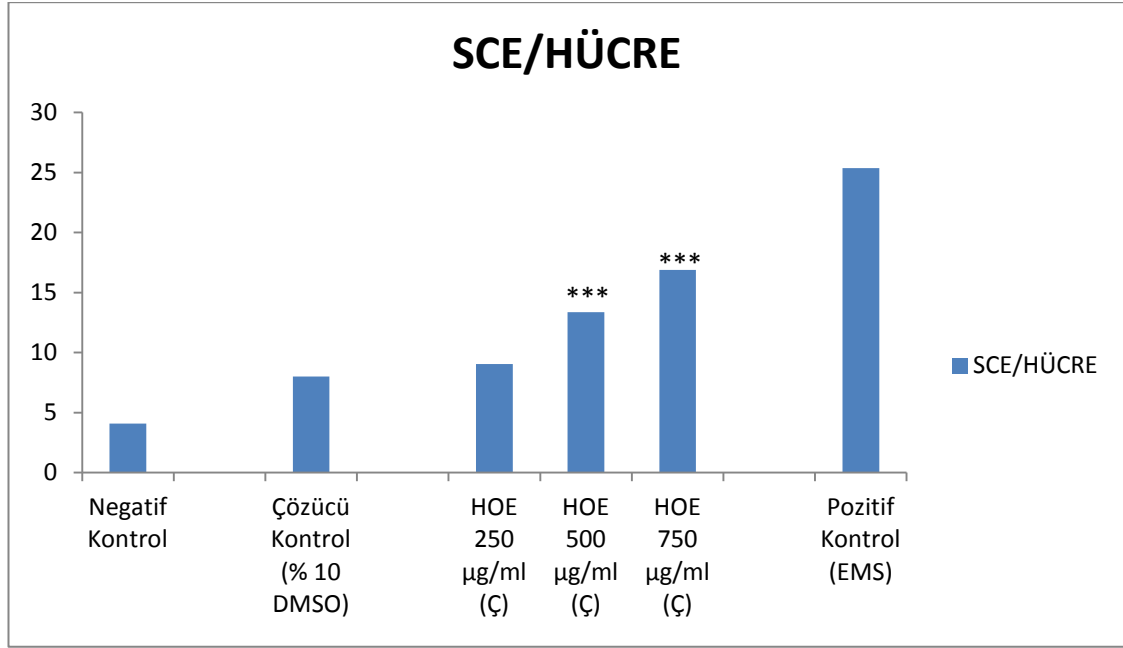
HOE (Gövde) için SCE frekansı; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 7,85 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 8,70, 250 µg/ml'lik doz grubu 12,21, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 13,81 olduğu ve çözücü kontrole göre 500 ve 750 µg/ml'lik doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.8.  $p < 0,005$ ,  $p < 0,0001$  sırasıyla).



**Şekil 4.3.8.** HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (\*\*:  $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ )

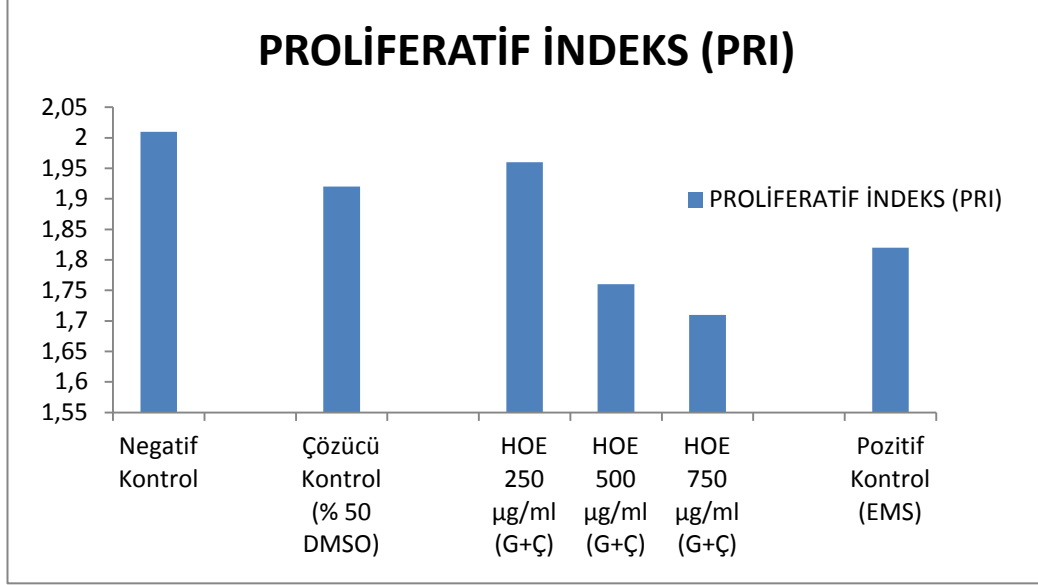


HOE (Çiçek) için SCE frekansı; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 8,02 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 9,06, 250 µg/ml'lik doz grubu 13,38, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 16,88 olduğu ve çözücü kontrole göre 500 ve 750 µg/ml'lik doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.9.  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  sırasıyla).



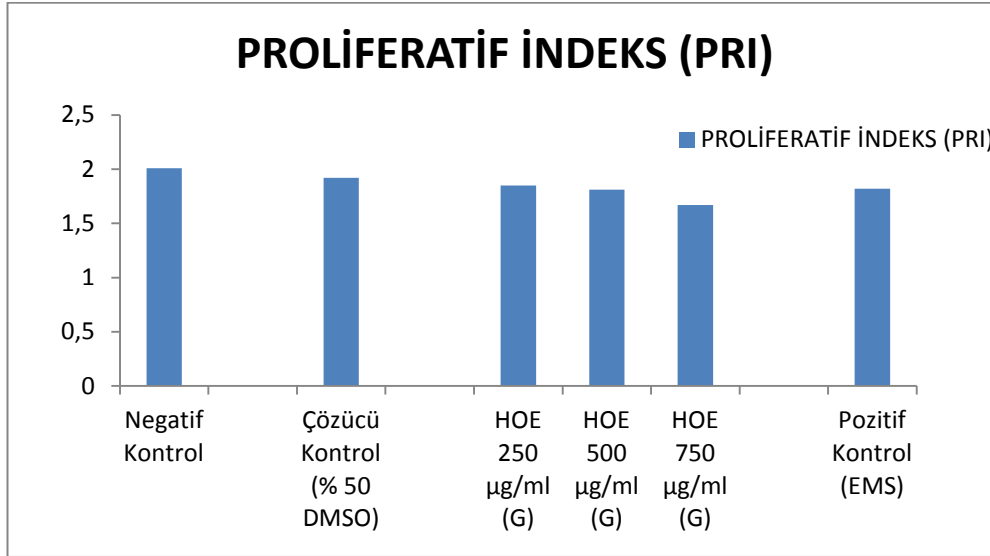
**Şekil 4.3.9.** HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin SCE/Hücre oranları (\*\* $p<0,0001$ )

HOE (Gövde+Çiçek), HOE (Gövde) ve HOE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen Proliferatif indeks (PRI) verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda Proliferatif indeks (PRI) değerlerine bakıldığında, HOE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 1,92 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,96, 500 µg/ml'lik doz grubu 1,76, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,71 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalışın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.3.10.).



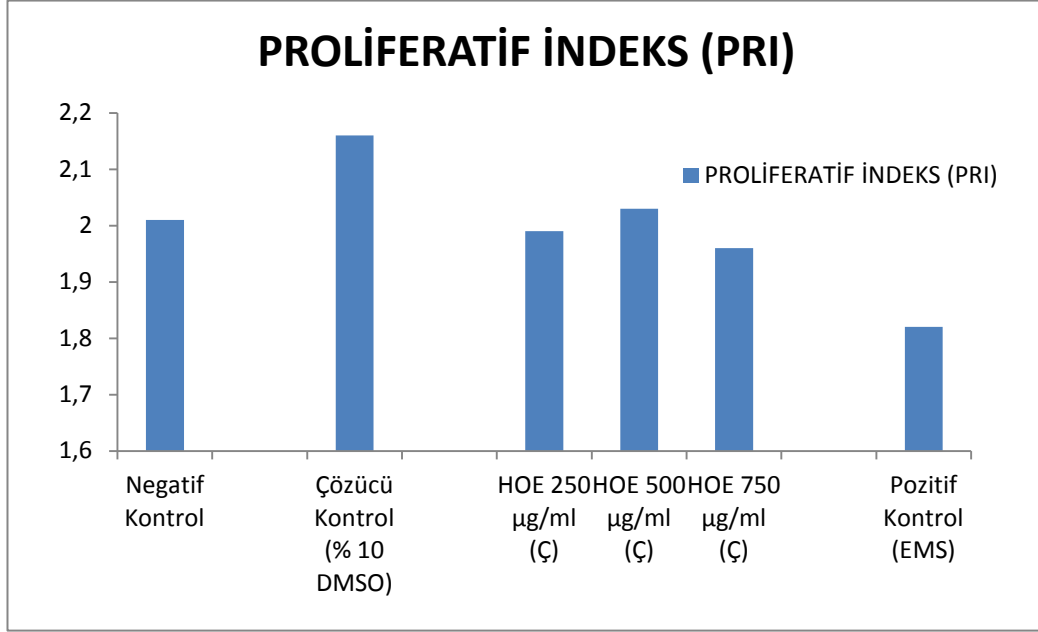
**Şekil 4.3.10.** HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları

HOE (Gövde) için proliferatif indeksin; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 1,92 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,85, 500 µg/ml'lik doz grubu 1,81,750 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,67 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalışın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.3.11.).



**Şekil 4.3.11.** HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları

HOE (Çiçek) için proliferatif indeksin; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 2,16 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,99, 500 µg/ml'lik doz grubu 2,03, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,96 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalışın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.3.12.).

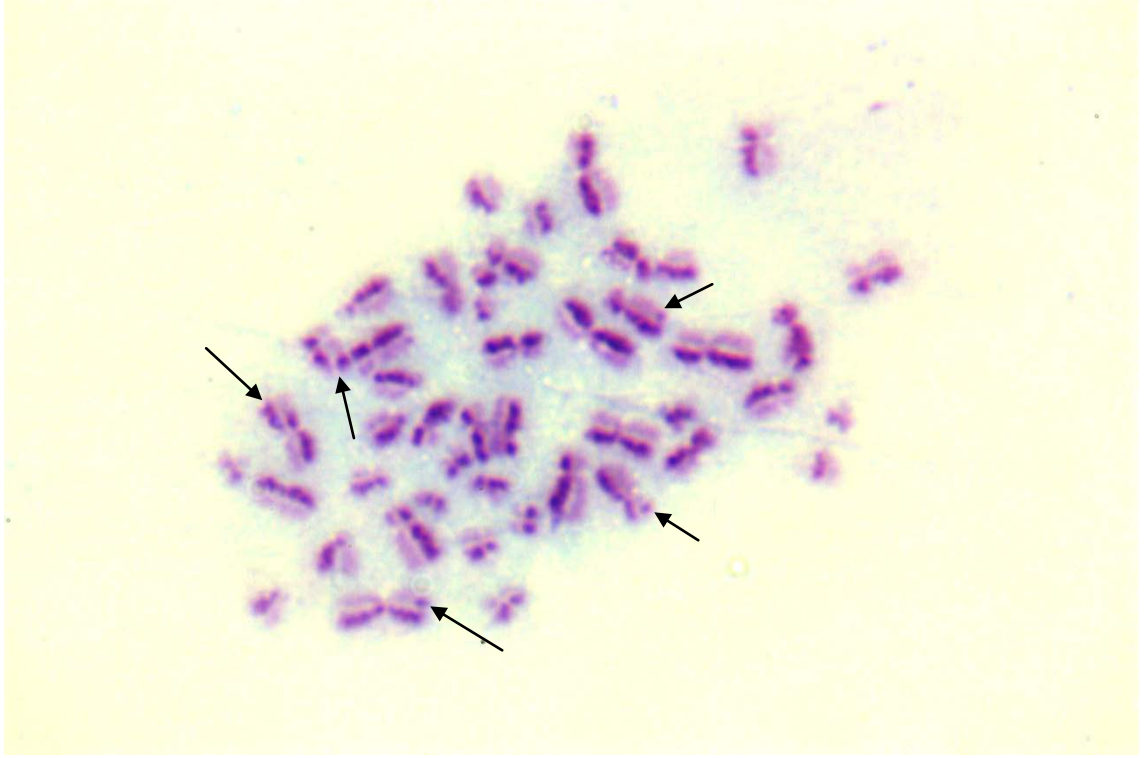


**Şekil 4.3.12.** HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) testinin proliferatif indeks (PRI) oranları

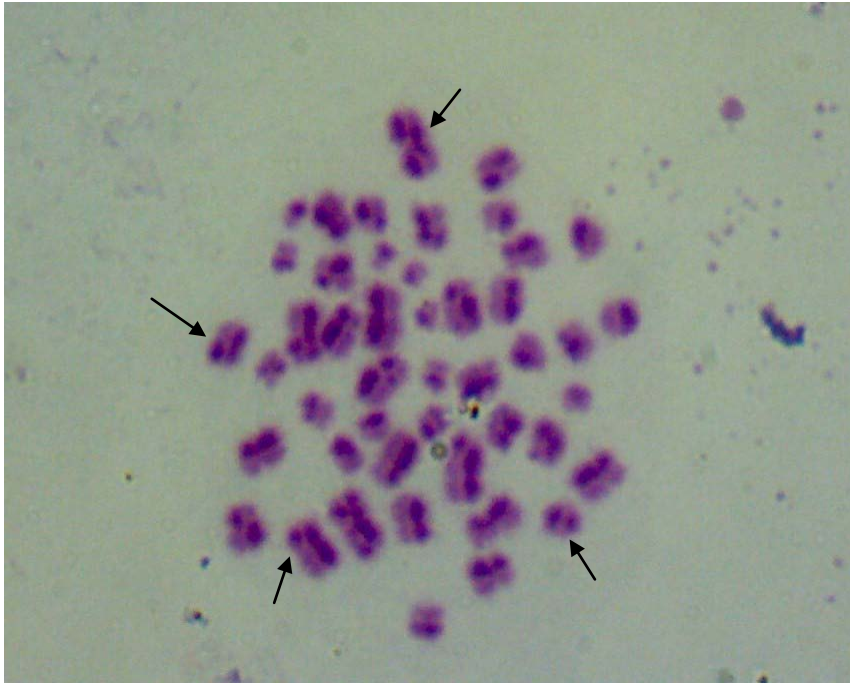
HAE (Gövde+Çiçek), (Gövde), (Çiçek) kısımlarının 125, 250 ve 500 µg/ml'lik dozları ile elde edilen tüm Kardeş Kromatid Değişimi Testi verileri Çizelge 4.3.1 ve Şekil 4.3.1-6'da verilmektedir.

Yine aynı şekilde HOE (Gövde+Çiçek), (Gövde), (Çiçek) kısımlarının 250, 500 ve 750 µg/ml'lik dozları ile elde edilen tüm Kardeş Kromatid Değişimi Testi verileri Çizelge 4.3.2 ve Şekil 4.3.7-12'de verilmektedir.

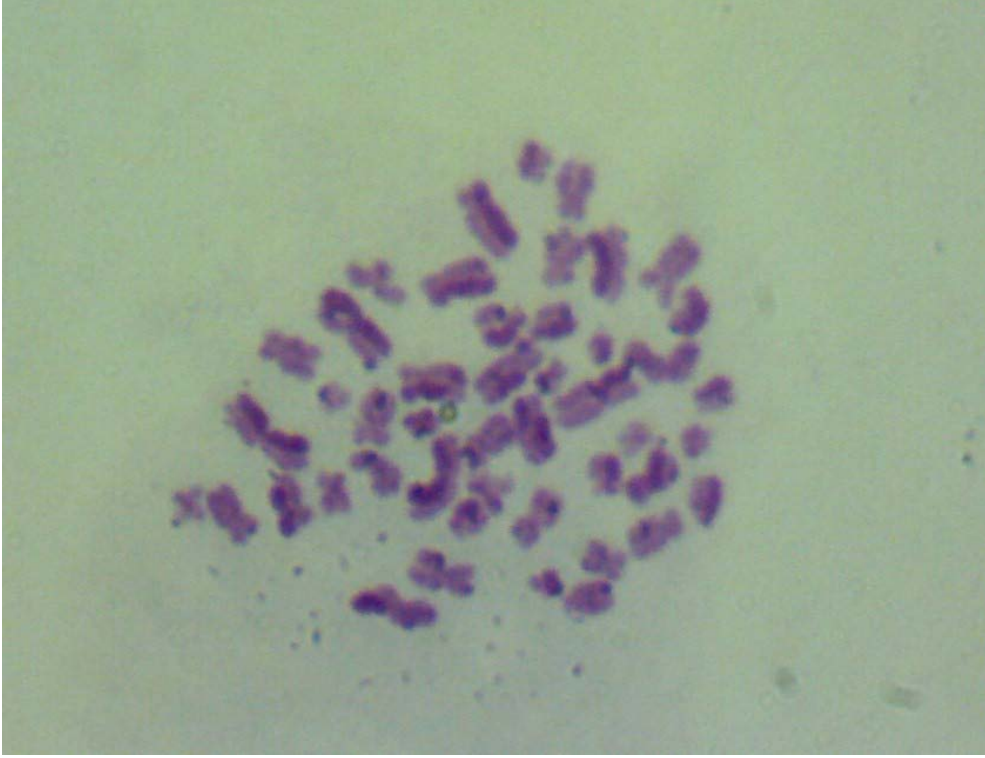
HAE ve HOE ile gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişimi Testi sonucunda gözlenen SCE'li metafaz safhasındaki kromozom fotoğrafları Şekil 4.3.13-15'de görülmektedir.



**Şekil 4.3.13.** 125 µg/ml HAE (Gövde) uygulaması ile Kardeş Kromatid Değişimi Testi sonucunda gözlenen SCE'li hücre ve kromozom örneği (SCE'ler ok işareti ile gösterilmiştir)



**Şekil 4.3.14.** 750 µg/ml HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması ile Kardeş Kromatid Değişimi Testi sonucunda gözlenen SCE'li hücre ve kromozom örneği (SCE'ler ok işareti ile gösterilmiştir)



**Şekil 4.3.15.** 750 µg/ml HOE (Gövde) uygulaması ile Kardeş Kromatid Değişimi Testi sonucunda gözlenen M3 fazındaki metafaz plağı (M3: Üçüncü mitoz bölünmeyi geçirmiş)

#### 4.4. In Vitro Mikronükleus Test Sonuçları

HAE (gövde+çiçek), HAE (gövde) % 10 DMSO'da, HAE (çiçek) ise % 50 DMSO'da çözülerek 125, 250 ve 500 µg/ml dozları teste alındı. İnsan lenfosit kültür yöntemi ile Mikronükleus Testi sonucunda bireyler arasında elde edilen MN ve NDI verileri Çizelge 4.4.1. de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.4.1.** HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin ortalama değerleri

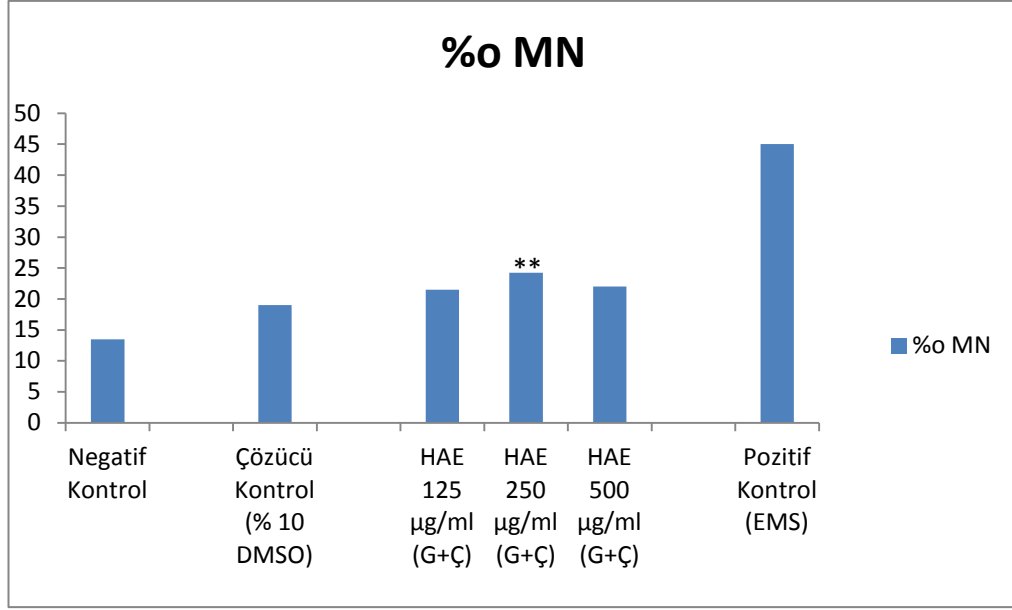
Madde	Doz (µg/ml)	N	% o MN	Nükleer Bölünme İndeksi (NDI)
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	13.50±1.00	1.18±0.08
<b>Çözücü Kontrol a</b>	% 10 DMSO	4	19.00±2.16	1.14±0.02
<b>Çözücü Kontrol b</b>	% 50 DMSO	4	15.50±1.91	1.16±0.06
<b>HAE (Gövde + Çiçek)a</b>	125	4	21.50±1.91	1.16±0.05
	250	4	24.25±0.96**	1.12±0.05
	500	4	22.00±2.45	1.11±0.06
<b>HAE (Gövde)a</b>	125	4	19.25±2.22	1.31±0.02**
	250	4	20.25±3.30	1.29±0.04**
	500	4	21.25±2.22	1.30±0.03**
<b>HAE (Çiçek)b</b>	125	4	14.20±1.64	1.22±0.13
	250	4	16.00±1.41	1.18±0.10
	500	4	16.75±3.40	1.19±0.08
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	4	45.00±7.1	1.15±0.18

a: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 10 DMSO)

b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 50 DMSO)

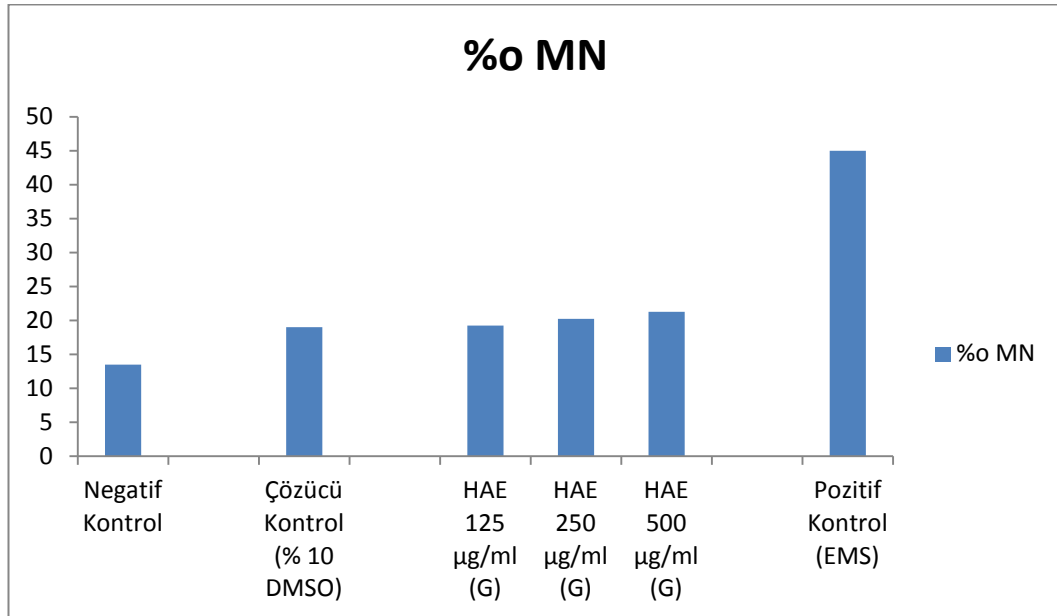
\*\* : p<0,005

HAE (Gövde+Çiçek), HAE (Gövde) ve HAE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen mikronükleuslu binükleat hücre verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda %o MN oranına bakıldığında, HAE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 19,00 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 21,50, 250 µg/ml'lik doz grubu 24,25, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 22,00 olduğu ve çözücü kontrole göre 250 µg/ml'lik doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4.1. p<0,005).



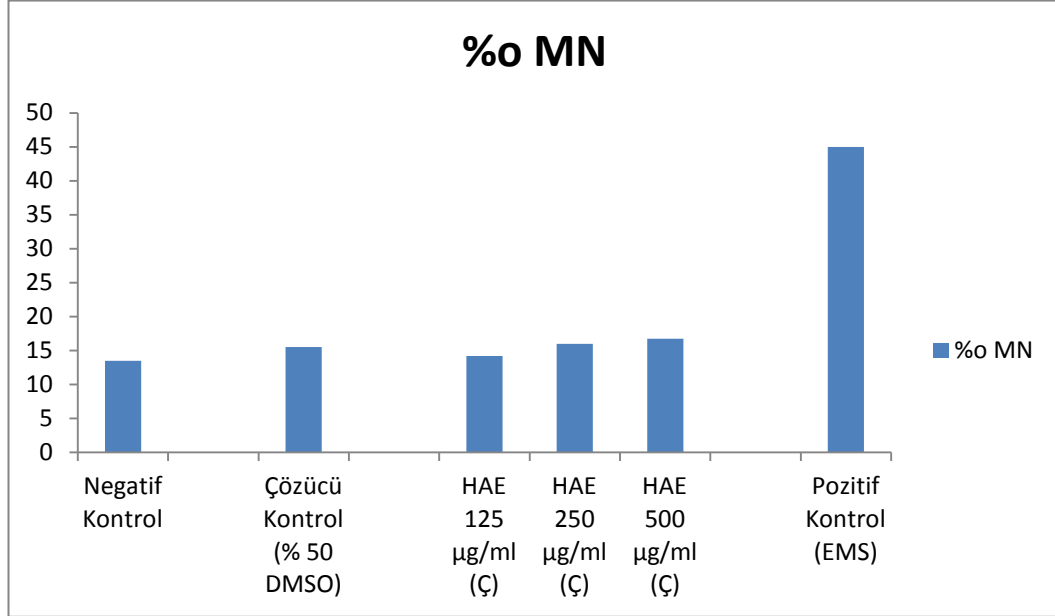
**Şekil 4.4.1.** HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları (\*\*: p<0,005)

HAE (Gövde) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 19,00 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 19,25, 250 µg/ml'lik doz grubu 20,25, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 21,25 olduğu ve hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4.2).



**Şekil 4.4.2.** HAE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları

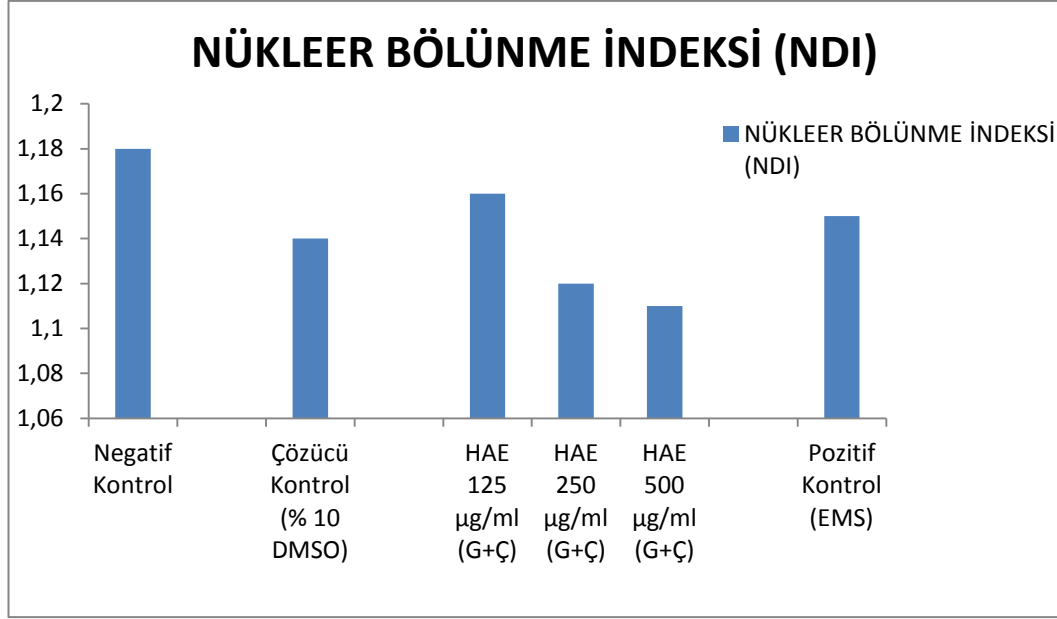
HAE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 15,50 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 14,20, 250 µg/ml'lik doz grubu 16,00, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 16,75 olduğu ve hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4.3).



**Şekil 4.4.3.** HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları

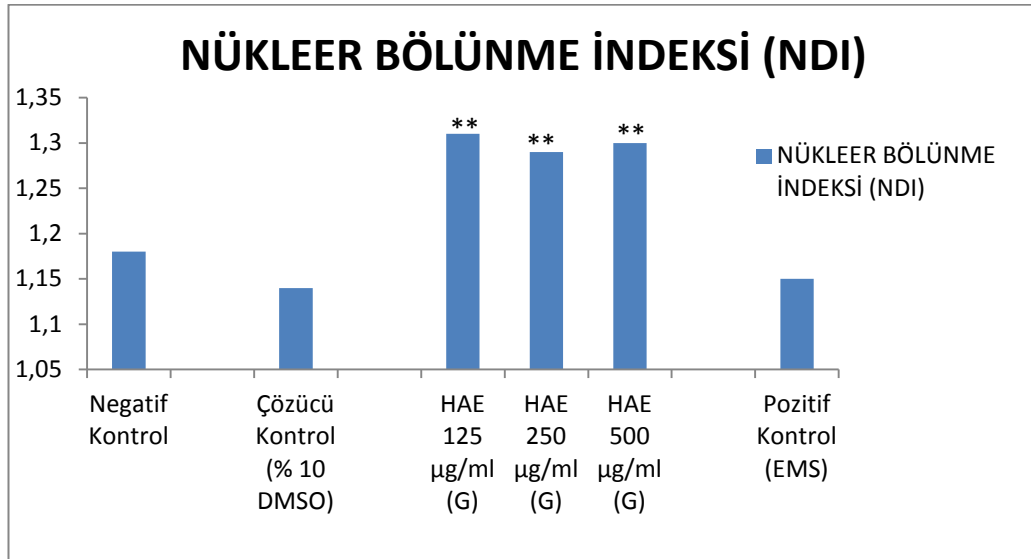
HAE (Gövde+Çiçek), HAE (Gövde) ve HAE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen mono, bi, tri ve tetranükleuslu hücre verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda Nükleer Bölünme İndeksi (NDI) oranına bakıldığında, HAE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 1,14 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 1,16, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,12, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,11 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4.4).





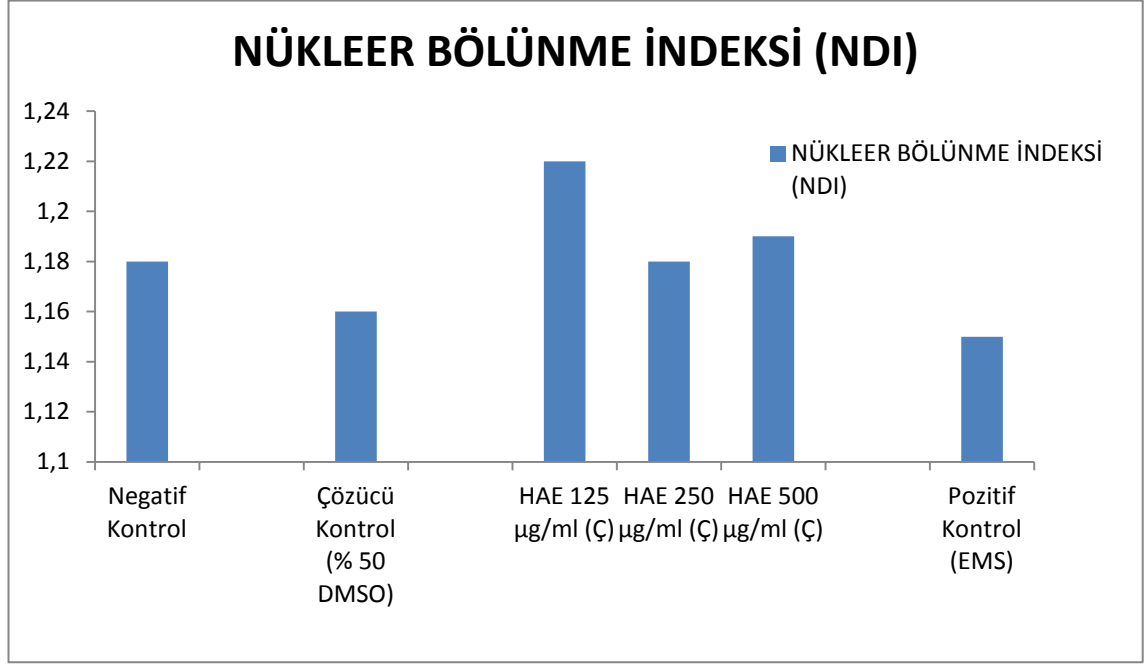
**Şekil 4.4.4.** HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları

HAE (Gövde) için; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 1,14 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 1,31, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,29, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,30 olduğu ve 125, 250 ve 500 µg/ml'lik her üç dozun da NDI oranını çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdıkları gözlemlendi (Şekil 4.4.5,  $p < 0,005$ ,  $p < 0,005$ ,  $p < 0,005$  sırasıyla).



**Şekil 4.4.5.** HAE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları (\*\*:  $p < 0,05$ )

HAE (Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 1,16 iken, 125 µg/ml'lik doz grubu 1,22, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,18, 500 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,19 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4.6).



**Şekil 4.4.6.** HAE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları

HOE (gövde+çiçek), HOE (gövde) % 50 DMSO'da, HOE (çiçek) ise % 10 DMSO'da çözülerek 250, 500 ve 750 µg/ml dozları teste alındı. İnsan lenfosit kültür yöntemi ile Mikronükleus Testi sonucunda bireyler arasında elde edilen MN ve PRI verileri Çizelge 4.4.2. de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.4.2.** HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin ortalama değerleri

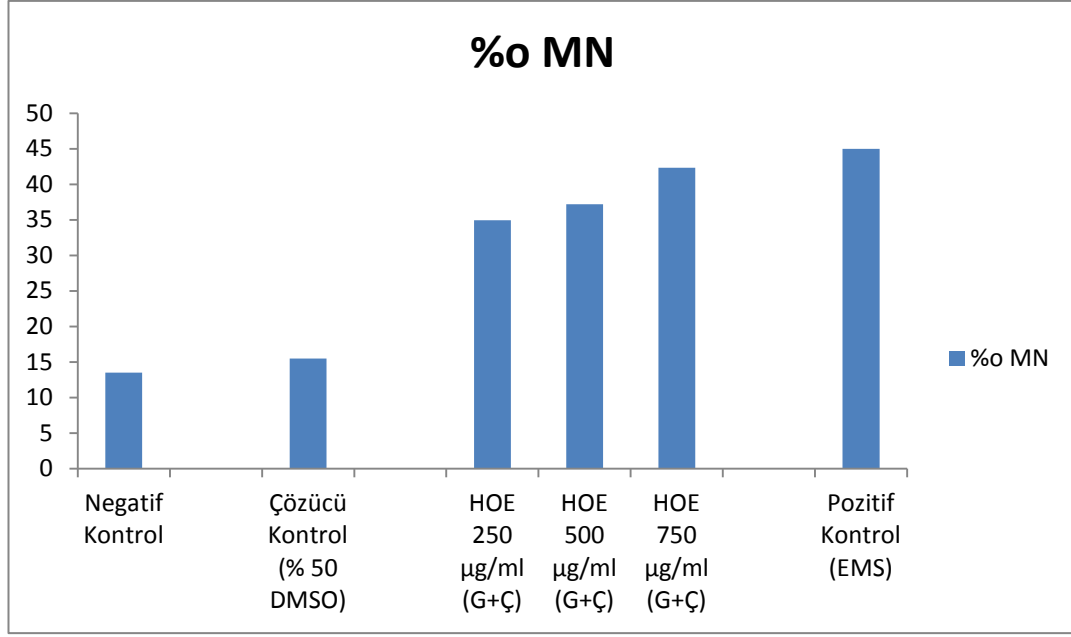
<b>Madde</b>	<b>Doz (µg/ml)</b>	<b>N</b>	<b>%o MN</b>	<b>Nükleer Bölünme İndeksi (NDI)</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	13.50±1.00	1.18±0.08
<b>Çözücü Kontrol a</b>	% 10 DMSO	4	19.00±2.16	1.14±0.02
<b>Çözücü Kontrol b</b>	% 50 DMSO	4	15.50±1.91	1.16±0.06
<b>HOE (Gövde + Çiçek)b</b>	250	4	34.93±13.33	1.17±0.57
	500	4	37.20±8.90	1.17±0.07
	750	4	42.35±12.93	1.18±0.02
<b>HOE (Gövde)b</b>	250	4	15.75±0.50	1.22±0.16
	500	4	14.25±2.87	1.23±0.11
	750	4	21.25±3.30*	1.23±0.10
<b>HOE (Çiçek)a</b>	250	4	18.90±4.50	1.13±0.06
	500	4	20.73±4.87	1.17±0.12
	750	4	24.38±4.61	1.15±0.10
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	4	45.00±7.1	1.15±0.18

a: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 10 DMSO)

b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma (% 50 DMSO)

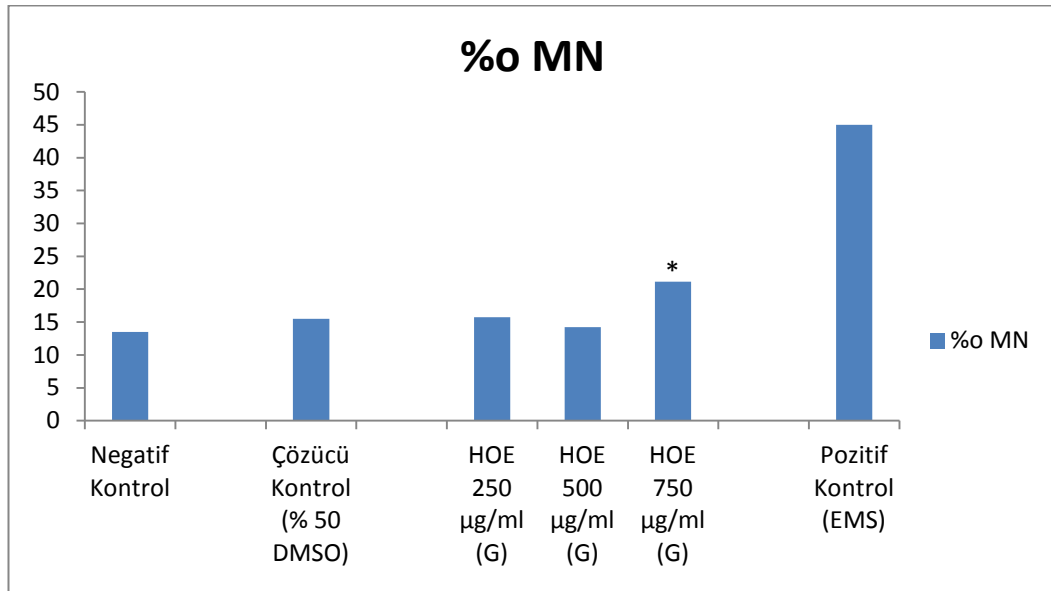
\*: p<0,05

HOE (Gövde+Çiçek), HOE (Gövde) ve HOE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen mikronükleuslu binükleat hücre verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda %o MN oranına bakıldığında, HOE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 15,50 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 34,93, 500 µg/ml'lik doz grubu 37,20, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 42,35 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4.7.).



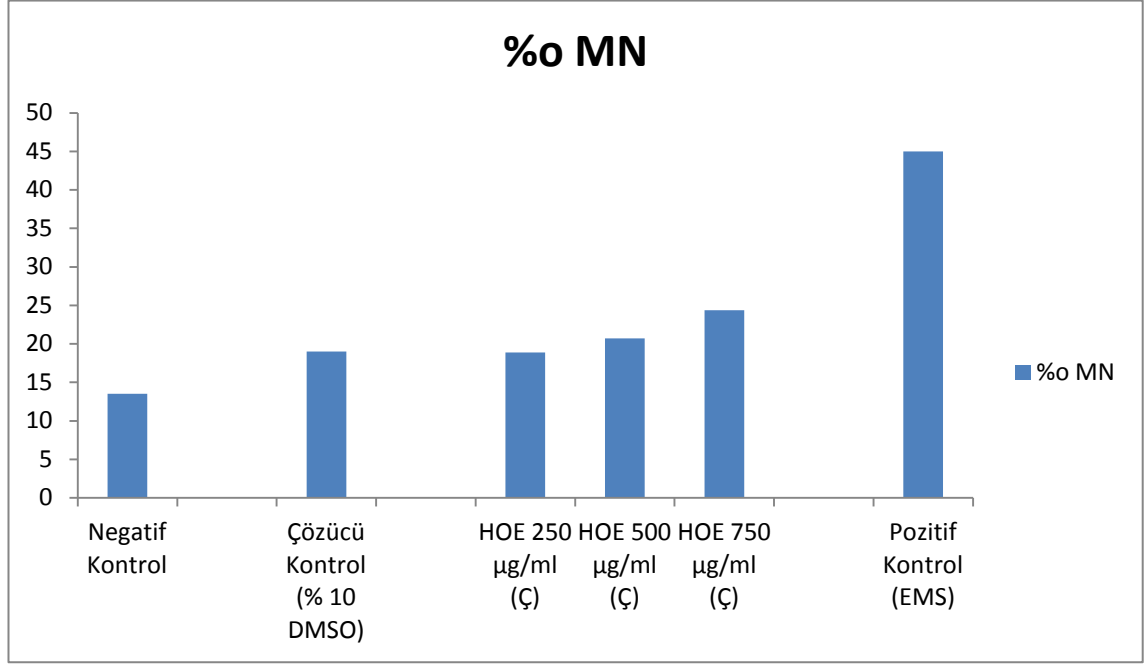
**Şekil 4.4.7.** HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları

HOE (Gövde) için MN frekansı; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 15,50 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 15,75, 500 µg/ml'lik doz grubu 14,25, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 21,25 olduğu ve çözücü kontrole göre 750 µg/ml'lik doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4.8.  $p < 0,05$ ).



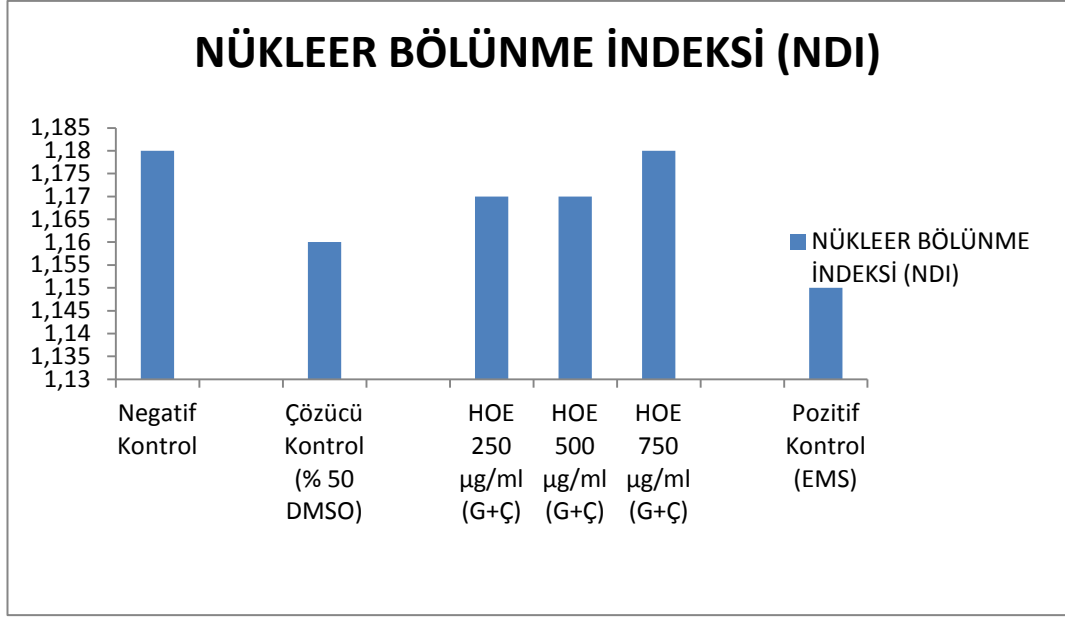
**Şekil 4.4.8.** HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları (\*:  $p < 0,05$ )

HOE (Çiçek) için MN frekansı; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 19,00 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 18,90, 500 µg/ml'lik doz grubu 20,73, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 24,38 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4.9.).



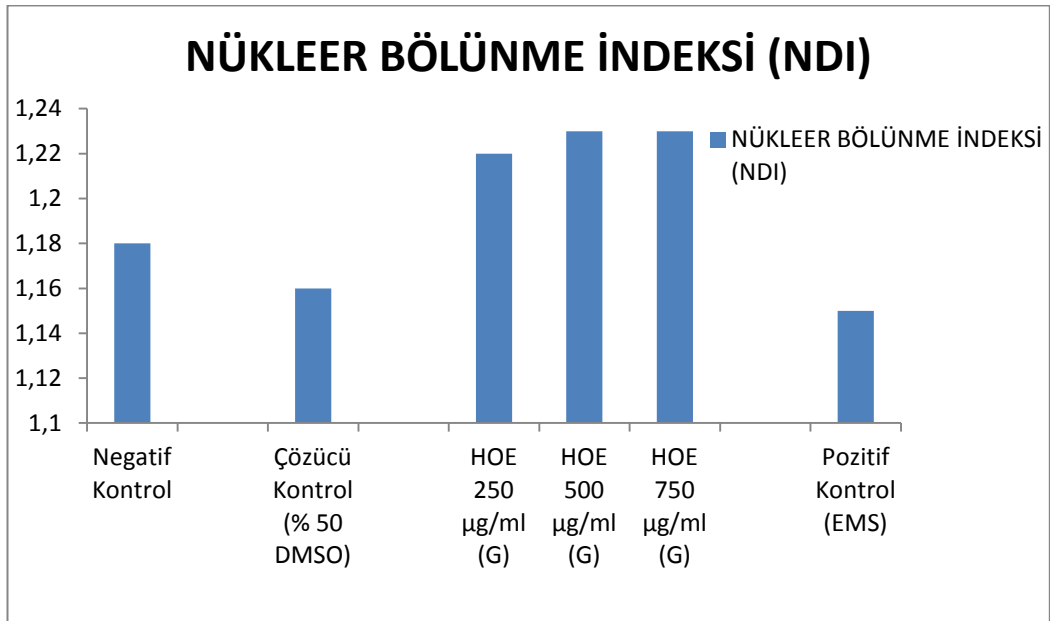
**Şekil 4.4.9.** HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin %o MN oranları

HOE (Gövde+Çiçek), HOE (Gövde) ve HOE (Çiçek) uygulaması ile meydana gelen mono, bi, tri ve tetranükleuslu hücre verilerine uygulanan varyans analizi ve Tukey testi sonucunda Nükleer Bölünme İndeksi (NDI) oranına bakıldığında, HOE (Gövde+Çiçek) için; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 1,16 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,17, 500 µg/ml'lik doz grubu 1,17, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,18 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4.10.).



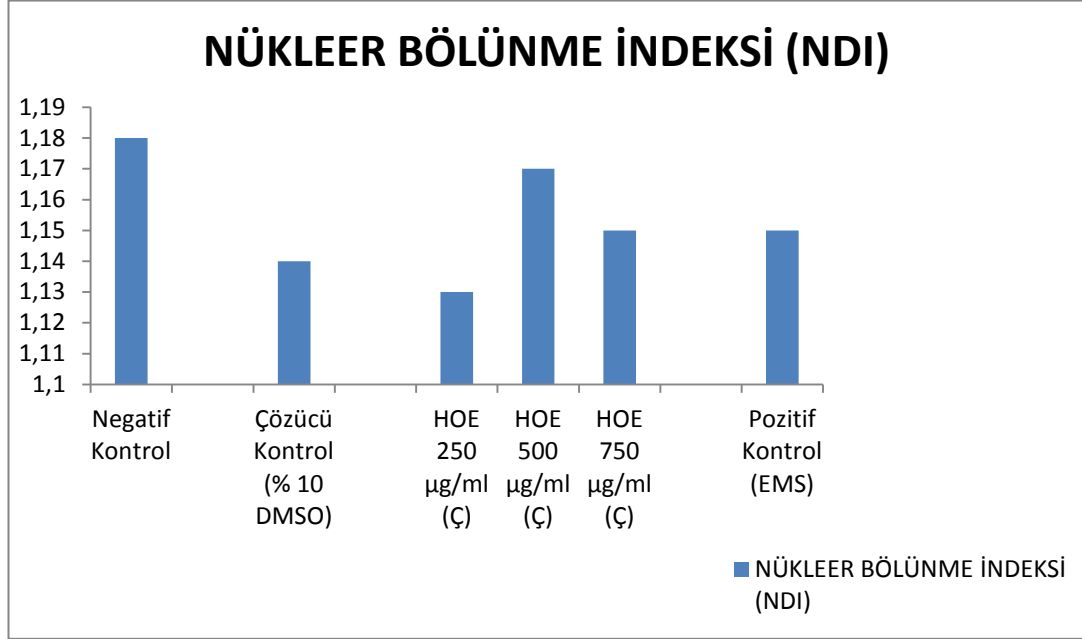
**Şekil 4.4.10.** HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları

HOE (Gövde) için NDI değerleri; çözücü kontrol grubu (% 50 DMSO) 1,16 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,22, 500 µg/ml'lik doz grubu 1,23, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,23 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4.11.).



**Şekil 4.4.11.** HOE (Gövde) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları

HOE (Çiçek) için NDI değerleri; çözücü kontrol grubu (% 10 DMSO) 1,14 iken, 250 µg/ml'lik doz grubu 1,13, 500 µg/ml'lik doz grubu 1,17, 750 µg/ml'lik doz grubunda ise 1,15 olduğu ve çözücü kontrole göre hiçbir doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4.12.).

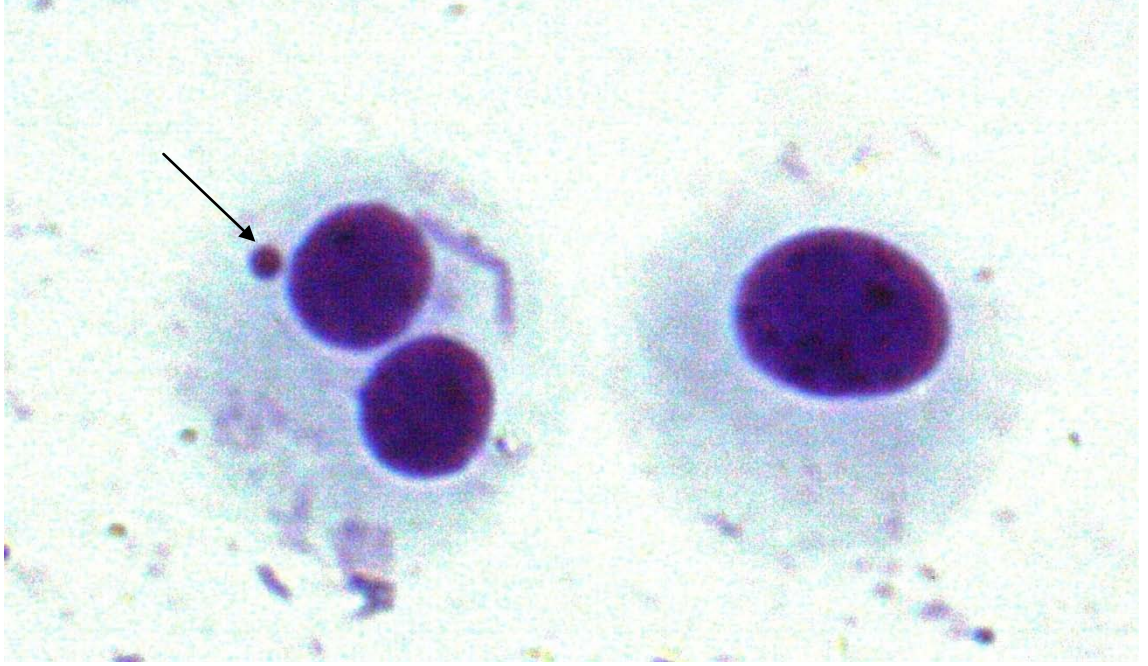


**Şekil 4.4.12.** HOE (Çiçek) uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin NDI oranları

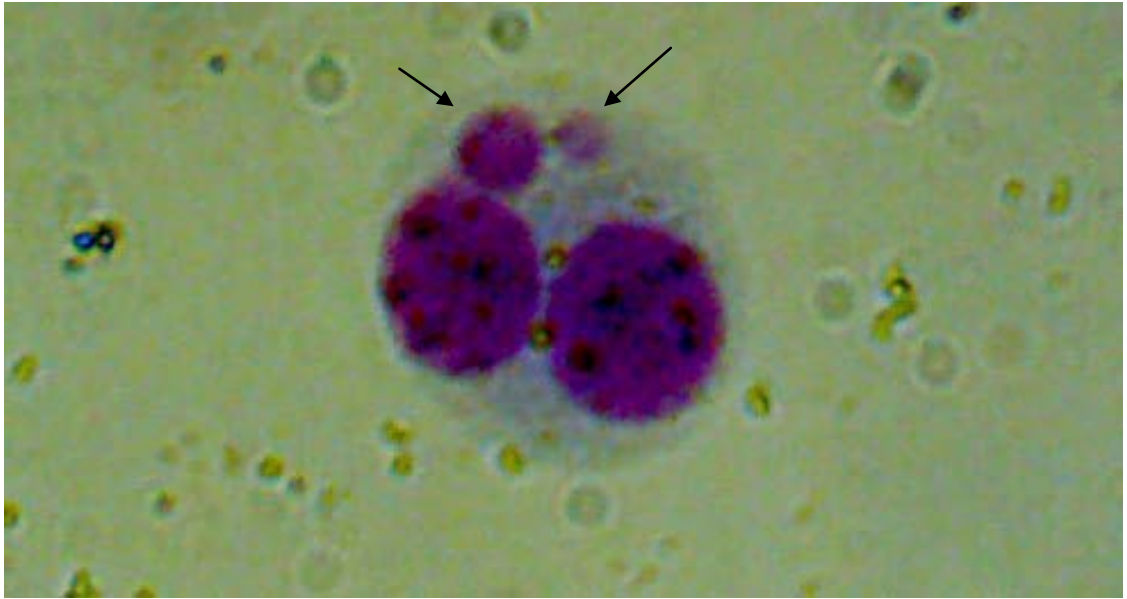
HAE (Gövde+Çiçek), (Gövde), (Çiçek) kısımlarının 125, 250 ve 500 µg/ml'lik dozları ile elde edilen tüm Mikronükleus Testi verileri Çizelge 4.4.1 ve Şekil 4.4.1-6'da verilmektedir.

Yine aynı şekilde HOE (Gövde+Çiçek), (Gövde), (Çiçek) kısımlarının 250, 500 ve 750 µg/ml'lik dozları ile elde edilen tüm Mikronükleus Testi verileri Çizelge 4.4.2 ve Şekil 4.4.7-12'da verilmektedir.

HAE ve HOE ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu hücre fotoğrafları Şekil 4.4.13-15'de görülmektedir.

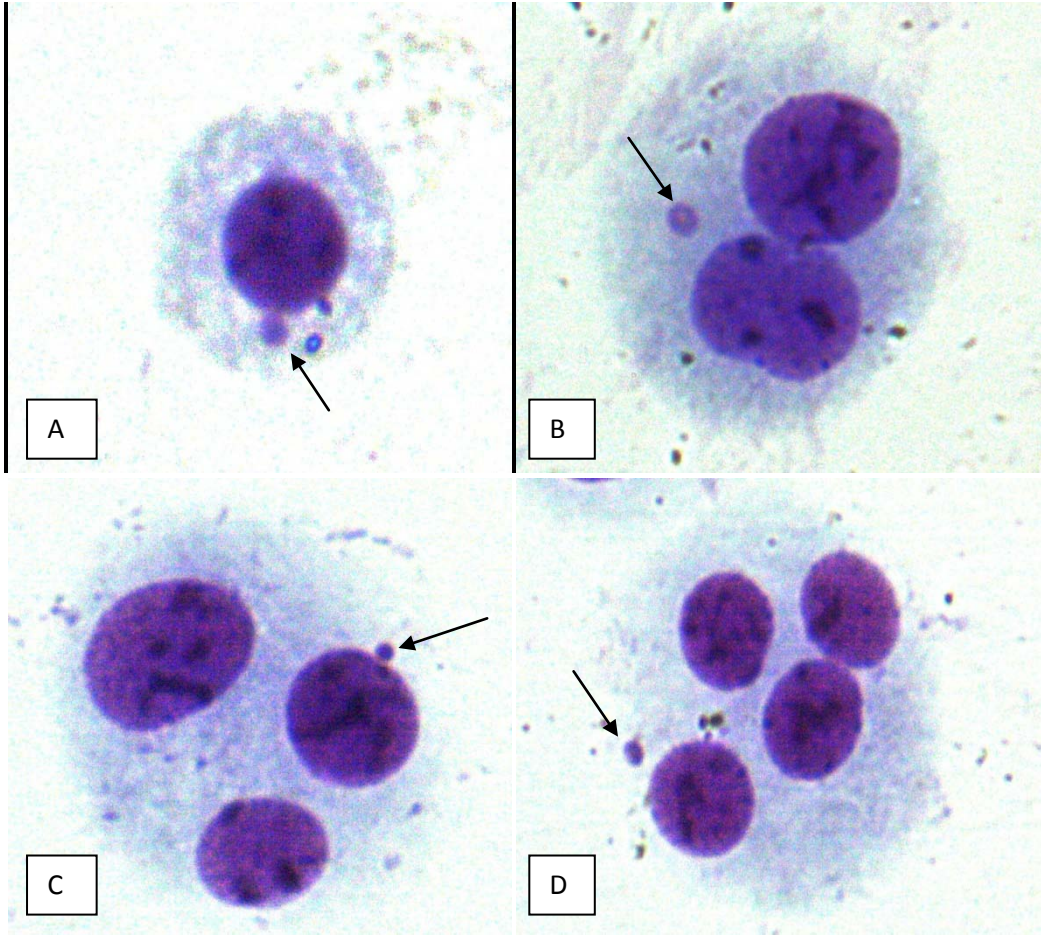


**Şekil 4.4.13.** 500 µg/ml HAE (Gövde) uygulaması ile Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu binükleat hücre ve mononükleat hücre örneği (→, Mikronükleus)



**Şekil 4.4.14.** 750 µg/ml HOE (Gövde) uygulaması ile Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu binükleat hücre örneği (→, Mikronükleuslar)





**Şekil 4.4.15.** 500 µg/ml HAE (Gövde) uygulaması ile Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu A-mononükleat, B-Binükleat, C-trinükleat hücre ve D-tetranükleat hücre örnekleri (→, Mikronükleuslar)

#### **4.5. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektrofözezi) Sonuçları**

HAE (gövde+iek), 10 DMSO'da çözölerek 125, 250 ve 500 µg/ml dozları teste alındı. Komet Testi sonucunda elde edilen komet alanı, komet uzunluğu, komet yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzunluğu, olive moment uzunluğu ve kafa % DNA verileri izelge 4.5.1.'de, genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi verileri ise izelge 4.5.2.'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.5.1.** HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet testi sonuçları

Madde	Doz (µg/ml)	N	Komet Alanı	Komet Uzunluğu (µm)	Komet Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk % DNA	Kuyruk Moment Uzunluğu (µm)	Olive Moment Uzunluğu (µm)	Kafa % DNA
<b>Negatif Kontrol</b>	-	200	420.06±101.38	29.28±2.84	7281.50±2591.96	3.93±1.22	3.31±2.15	12.99±1.38	0.42±0.28	96.69±2.15
<b>Çözücü Kontrol</b>	% 10 DMSO	200	463.55±101.77	32.34±3.70	7446.29±2259.07	5.22±1.49	4.99±2.46	13.89±1.51	0.70±0.37	95.01±2.46
	125	200	951.91±867.38***	50.25±25.48***	17355.72±7253.33***	17.59±25.21***	10.00±16.37*	22.01±11.97***	3.85±9.83**	90.00±16.37*
<b>HAE (Gövde+Çiçek)</b>	250	200	1088.43±997.63***	53.41±28.14***	17747.58±6990.68***	20.45±28.47***	12.81±20.68***	23.42±13.39***	5.39±12.43***	87.19±20.68***
	500	200	1049.98±898.37***	52.67±25.38***	16624.74±5875.06***	22.08±26.74***	18.61±27.44***	23.02±12.01***	6.70±12.52***	81.39±27.44***
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	200	4920.52±1159.02	124.32±15.77	37987.38±16089.37	110.71±16.24	96.72±9.19	58.34±7.49	56.94±9.25	3.28±9.19

\*; p<0.05

\*\*; p<0.005

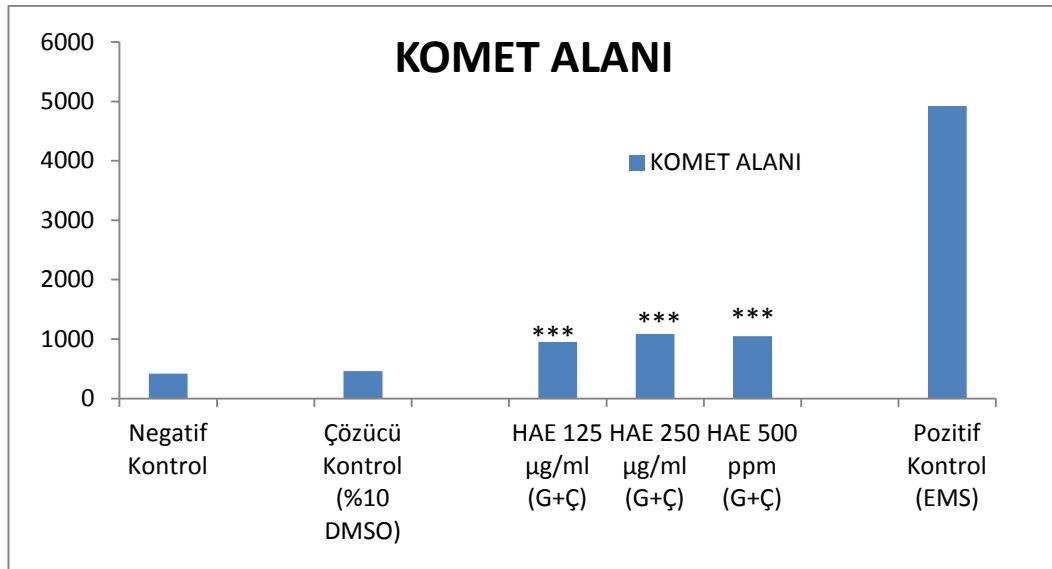
\*\*\*; p<0.0001

**Çizelge 4.5.2.** HAE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet testinin Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerleri

Madde	Doz (µg/ml)	N	Genetik Hasar İndeksi	Hasarlı Hücre Yüzdesi
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	0.14±0.10	0.01±0.01
<b>Çözücü Kontrol</b>	% 10 DMSO	4	0.08±0.04	0.01±0.01
<b>HAE (Gövde + Çiçek)</b>	125	4	0.62±0.18**	0.17±0.07**
	250	4	0.64±0.20**	0.18±0.08**
	500	4	1.06±0.25***	0.28±0.05***
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	4	3.92±0.06	1.00±0.01

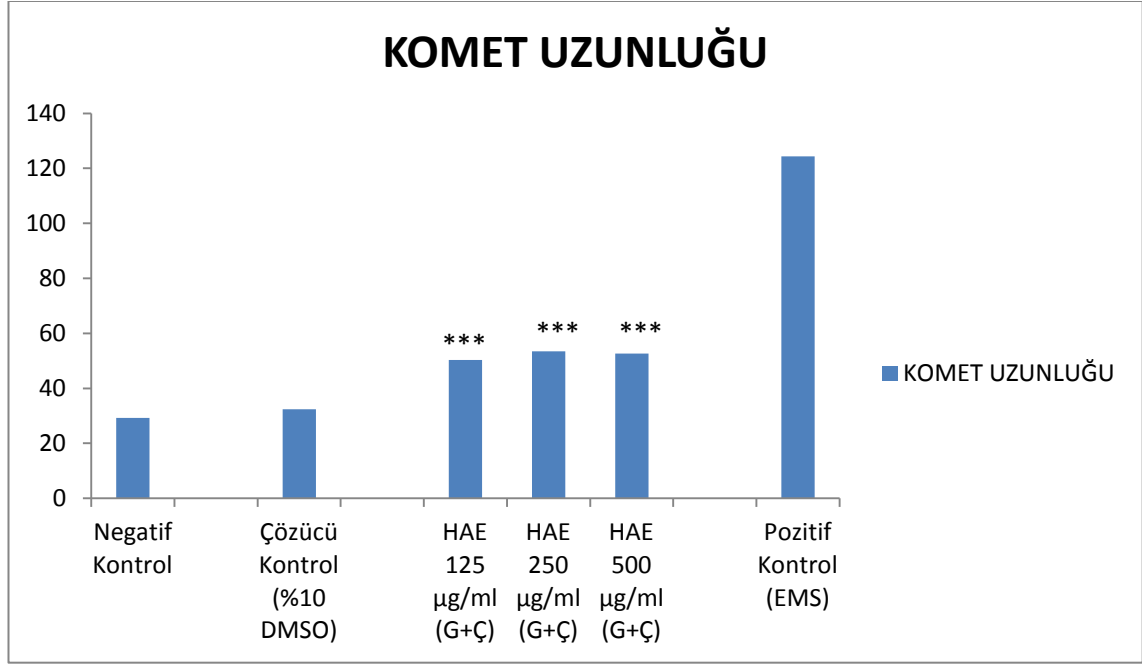
\*\*; p<0.005  
\*\*\*; p<0.0001

HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, komet alanı oranının çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda 463,55, 125 µg/ml doz grubunda 951,91, 250 µg/ml doz grubunda 1088,43 ve 500 µg/ml doz grubunda 1049,88 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.1. , p<0,0001, p<0,0001, p<0,0001).



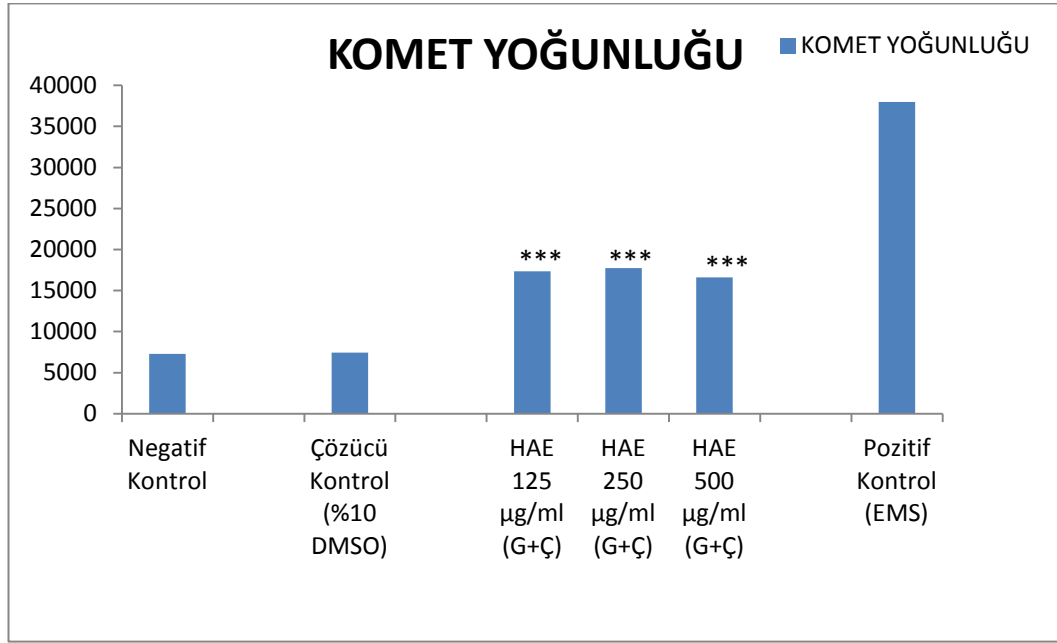
**Şekil 4.5.1.** HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Alanı oranları karşılaştırılması (\*\*\*: p<0,0001)

HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, komet uzunluğu oranının çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda 32,34  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  doz grubunda 50,25  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  doz grubunda 53,41  $\mu\text{m}$  ve 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  doz grubunda 52,67  $\mu\text{m}$  olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.2.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



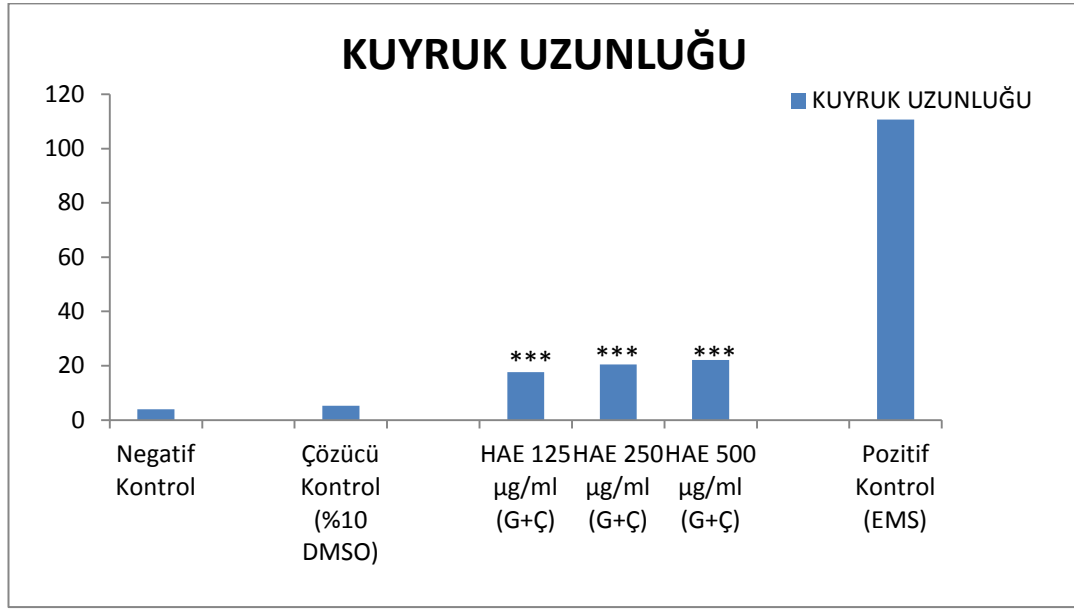
**Şekil 4.5.2.** HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Uzunluğu oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, komet yoğunluğu oranının çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda 7446,29, 125 µg/ml doz grubunda 17355,72, 250 µg/ml doz grubunda 17747,58 ve 500 µg/ml doz grubunda 16624,74 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.3.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



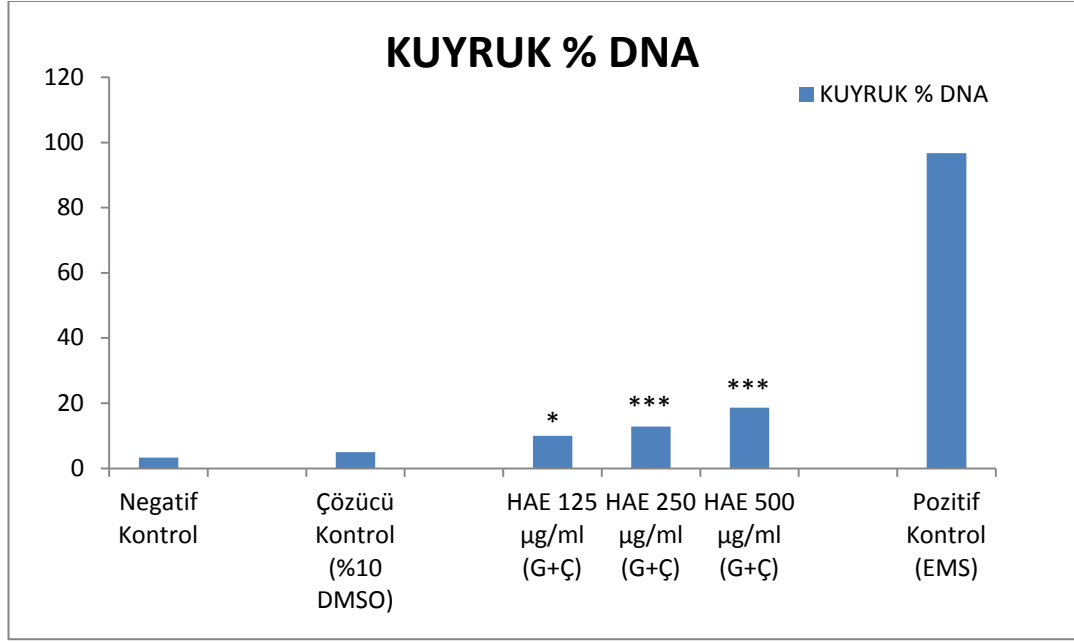
Şekil 4.5.3. HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Yoğunluğu oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Kuyruk Uzunluğu oranının çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda 5,22 µm, 125 µg/ml doz grubunda 17,59 µm, 250 µg/ml doz grubunda 20,45 µm ve 500 µg/ml doz grubunda 22,08 µm olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.4.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



**Şekil 4.5.4.** HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Uzunluğu oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

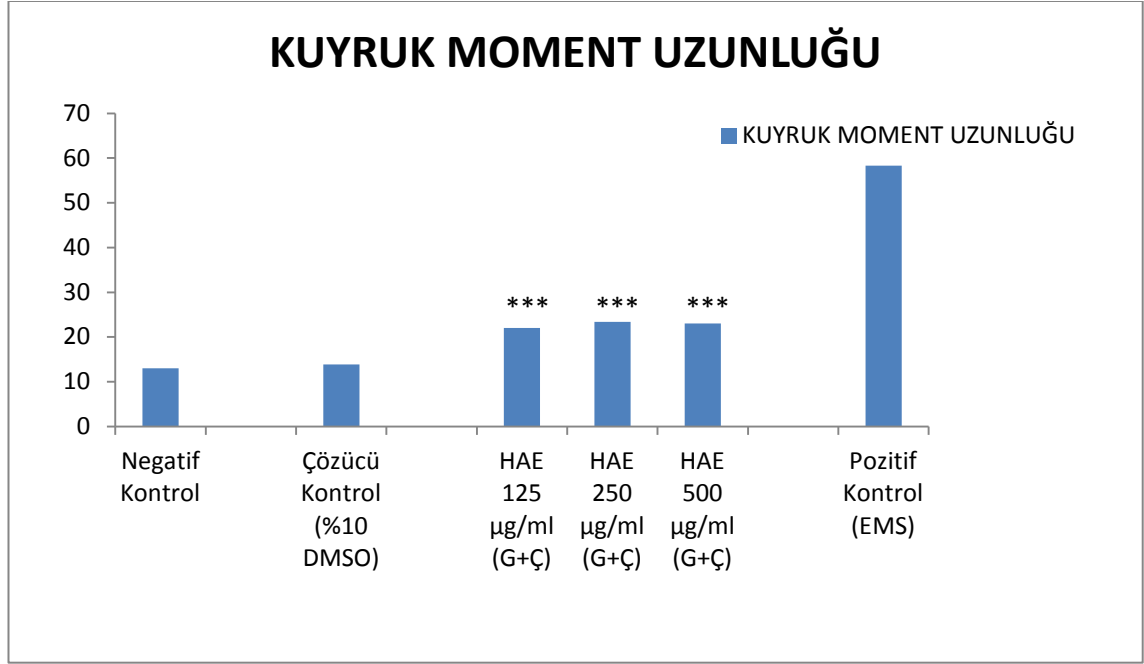
HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Kuyruk % DNA oranının çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda % 4,99, 125 µg/ml doz grubunda % 10,00, 250 µg/ml doz grubunda % 12,81 ve 500 µg/ml doz grubunda % 18,61 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.5.,  $p<0,05$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



**Şekil 4.5.5.** HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk % DNA oranları (\*:  $p<0,05$ , \*\*\*:  $p<0,0001$ ).

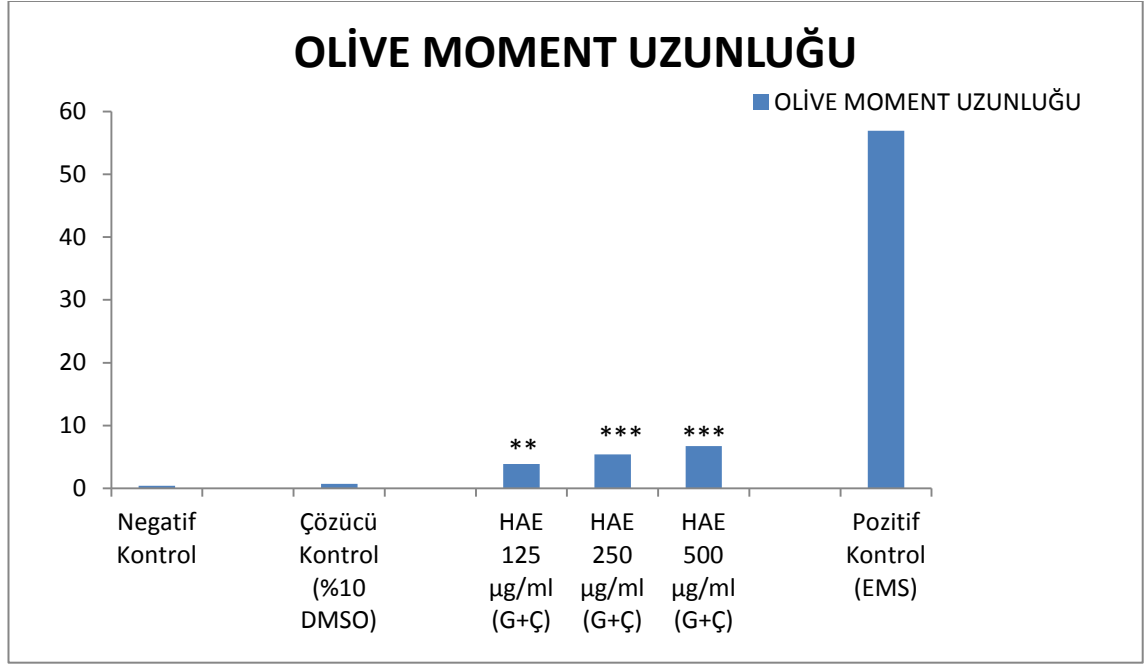


HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Kuyruk Moment Uzunluğu oranının çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda 13,89  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 22,01  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 23,42  $\mu\text{m}$  ve 500  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 23,02  $\mu\text{m}$  olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.6.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



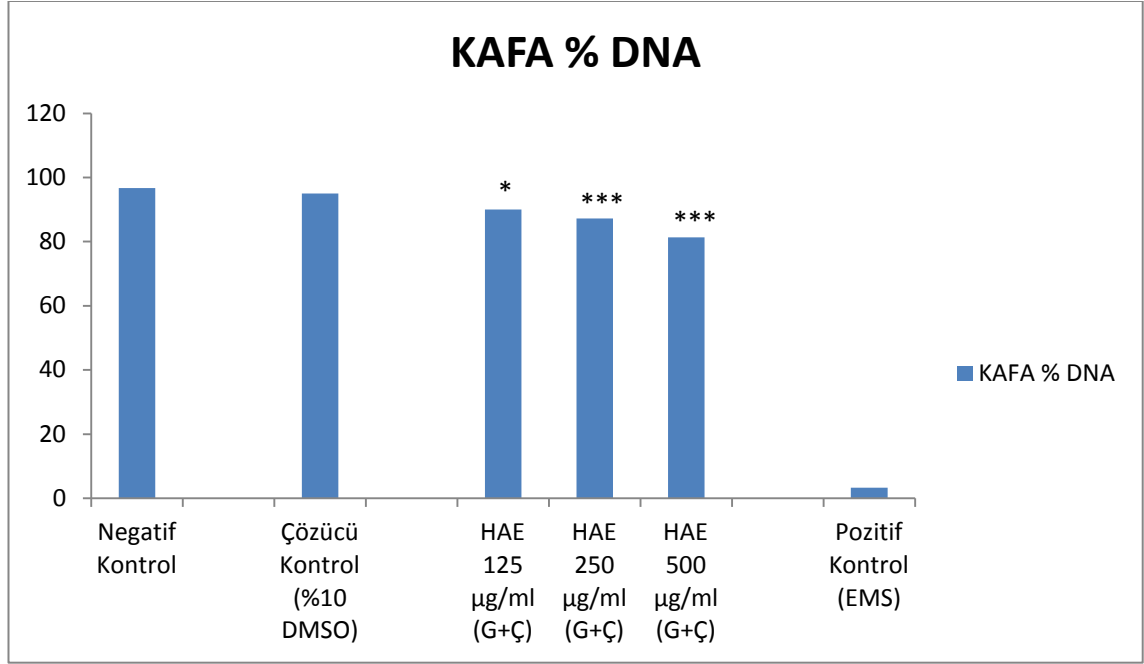
**Şekil 4.5.6.** HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Moment Uzunluğu oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Olive Moment Uzunluğu oranının çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda 0,70  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 3,85  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 5,39  $\mu\text{m}$  ve 500  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 6,70  $\mu\text{m}$  olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.7.,  $p<0,005$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



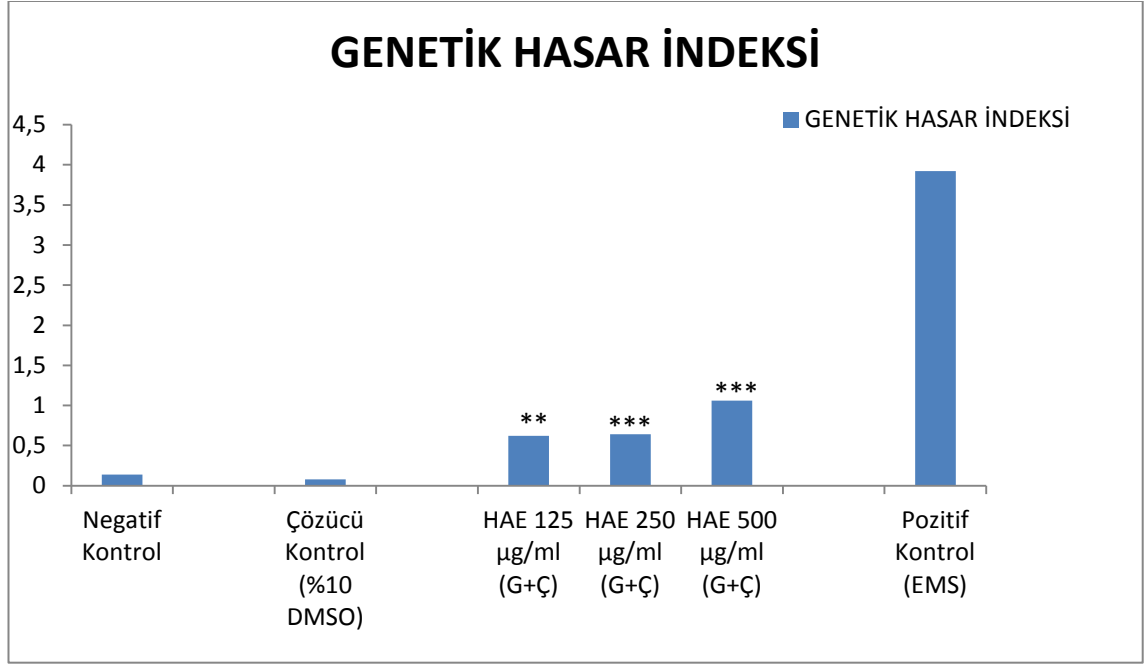
**Şekil 4.5.7.** HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Olive Moment Uzunluğu oranları (\*\*:  $p<0,005$ , \*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Kafa % DNA oranının çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda % 95,01, 125 µg/ml doz grubunda % 90,00, 250 µg/ml doz grubunda % 87,19 ve 500 µg/ml doz grubunda % 81,39 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir azalış meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.5.8.,  $p<0,05$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



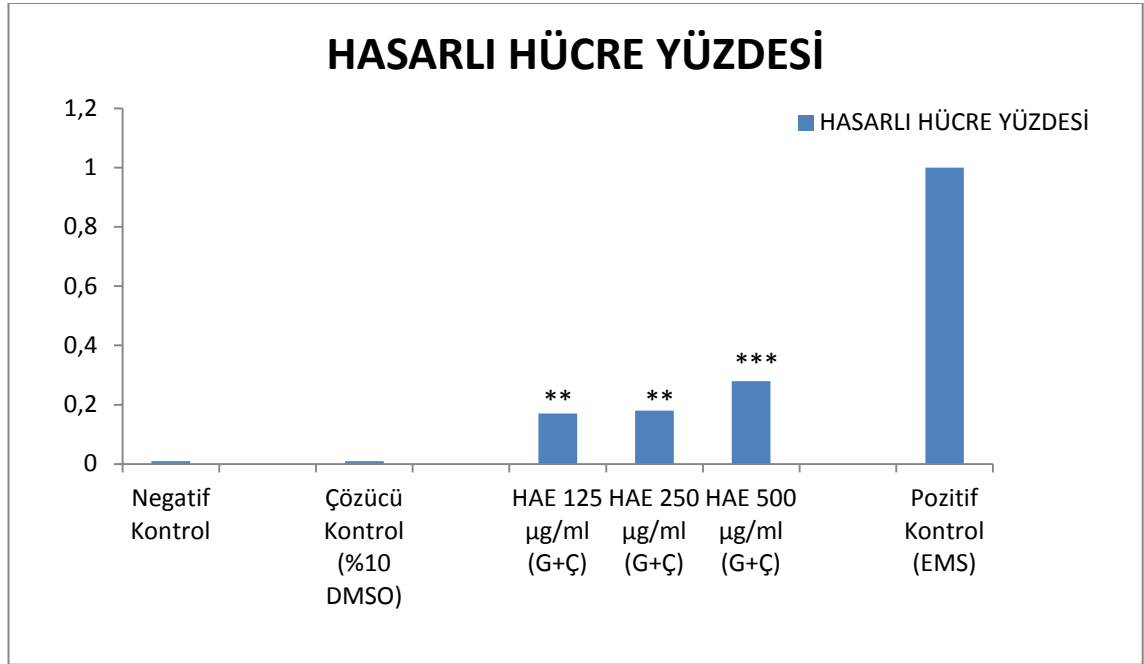
**Şekil 4.5.8.** HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kafa % DNA oranları (\*:  $p<0,05$ , \*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçlarına göre Genetik Hasar İndeksi verileri değerlendirildiğinde bu oranın; çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda 0,08, 125 µg/ml doz grubunda 0,62, 250 µg/ml doz grubunda 0,64 ve 500 µg/ml doz grubunda 1,06 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.5.9.,  $p<0,005$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



**Şekil 4.5.9.** HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi oranları (\*\*:  $p<0,005$ , \*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HAE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçlarına göre Hasarlı Hücre Yüzdesi verileri değerlendirildiğinde bu oranın; çözücü (% 10 DMSO) kontrol grubunda % 0,01, 125 µg/ml doz grubunda % 0,17, 250 µg/ml doz grubunda % 0,18 ve 500 µg/ml doz grubunda % 0,28 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.5.10., p<0,005, p<0,005, p<0,0001).



**Şekil 4.5.10.** HAE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Hasarlı Hücre Yüzdesi oranları (\*\*: p<0,005, \*\*\*: p<0,0001).

HOE (gövde+çiçek), % 50 DMSO'da çözülerek 250, 500 ve 750 µg/ml dozları teste alındı. Komet Testi sonucunda elde edilen komet alanı, komet uzunluğu, komet yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzunluğu, olive moment uzunluğu ve kafa % DNA verileri Çizelge 4.5.3. 'de, genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi verileri ise Çizelge 4.5.4.'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.5.3.** HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet testi sonuçları

Madde	Doz (µg/ml)	N	Komet Alanı	Komet Uzunluğu (µm)	Komet Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk % DNA	Kuyruk Moment Uzunluğu (µm)	Olive Moment Uzunluğu (µm)	Kafa % DNA
<b>Negatif Kontrol</b>	-	200	420.06±101.38	29.28±2.84	7281.50±2591.96	3.93±1.22	3.31±2.15	12.99±1.38	0.42±0.28	96.69±2.15
<b>Çözücü Kontrol</b>	%50 DMSO	200	433.72±100.09	29.96±3.71	6361.28±1984.13	4.23±1.31	3.96±2.09	13.28±1.47	0.53±0.29	96.04±2.09
	250	200	822.18±812.85***	45.33±22.25***	14504.09±6826.61***	15.74±23.09***	11.88±20.12***	19.66±10.47***	4.09±10.82**	88.12±20.12***
<b>HOE (Gövde+Çi çek)</b>	500	200	1080.95±1110.83***	52.65±29.14***	16602.42±7595.55***	21.41±29.95***	14.13±23.57***	23.09±13.63***	6.10±13.51***	85.87±23.57***
	750	200	1194.12±1209.71***	54.94±29.62***	17480.72±8892.79***	24.00±30.64***	18.15±26.71***	24.09±13.93***	7.66±14.66***	81.85±26.71***
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	200	4920.52±1159.02	124.32±15.77	37987.38±16089.37	110.71±16.24	96.72±9.19	58.34±7.49	56.94±9.25	3.28±9.19

\*\*; p<0,005

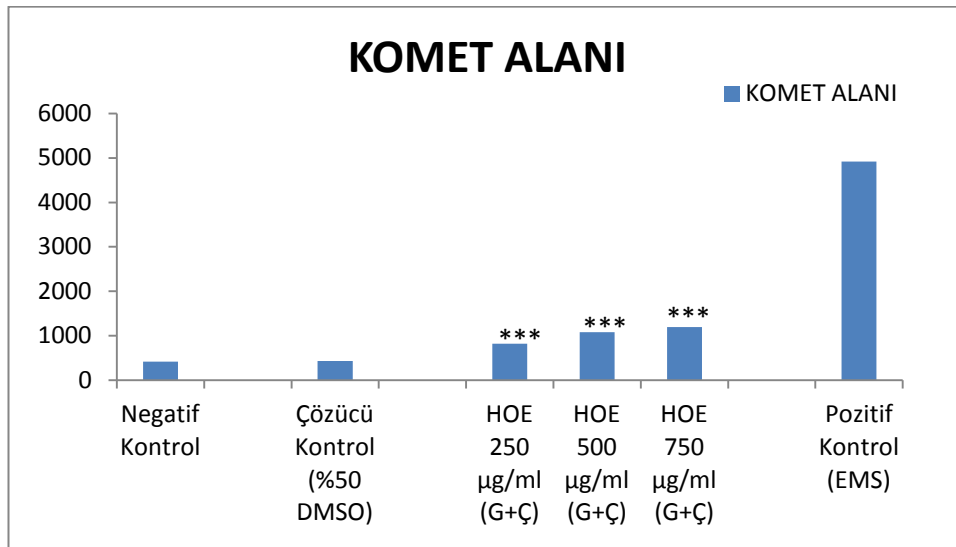
\*\*\*; p<0,0001

**Çizelge 4.5.4.** HOE uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerleri

Madde	Doz (ppm)	N	Genetik Hasar İndeksi	Hasarlı Hücre Yüzdesi
<b>Negatif Kontrol</b>	-	4	0.14±0.10	0.01±0.01
<b>Çözücü Kontrol</b>	% 50 DMSO	4	0.21±0.12	0,00±0,00
<b>HOE (Gövde + Çiçek)</b>	250	4	0.65±0.06***	0.17±0.02***
	500	4	0.77±0.13***	0.21±0.01***
	750	4	1.05±0.09***	0.29±0.03***
<b>Pozitif Kontrol (EMS)</b>	1250	4	3.92±0.06	1.00±0.01

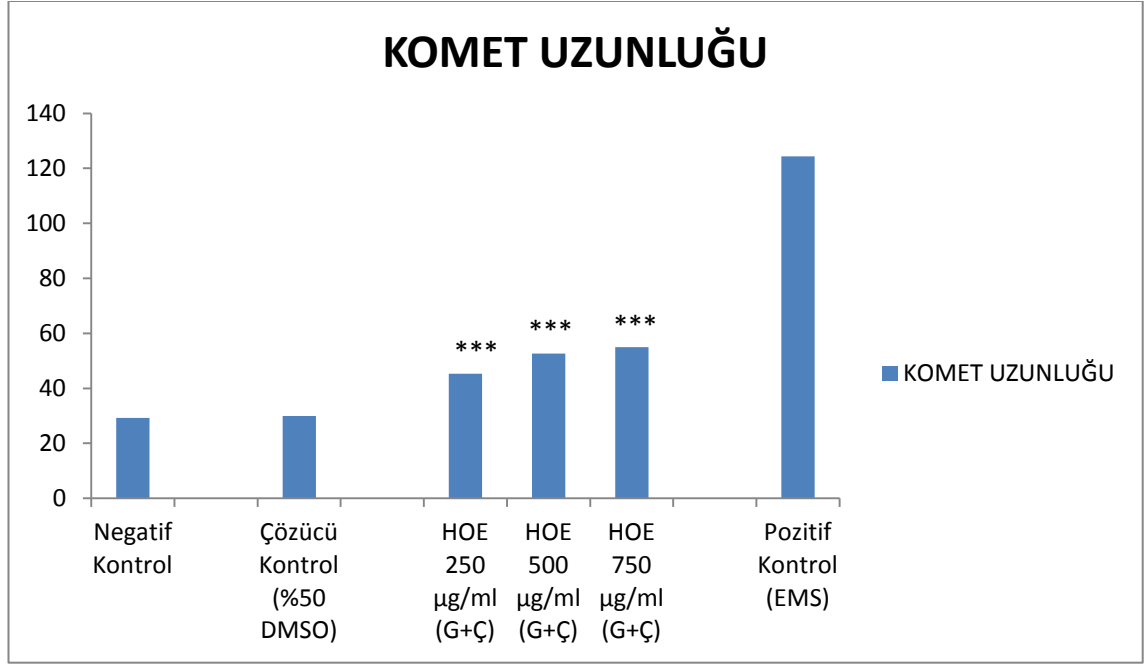
\*\*\*; p<0,0001

HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Komet Alanı oranının çözücü (% 50 DMSO) kontrol grubunda 433,72, 250 µg/ml doz grubunda 822,18, 500 µg/ml doz grubunda 1080,95 ve 750 µg/ml doz grubunda 1194,12 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.11. , p<0,0001, p<0,0001, p<0,0001).



**Şekil 4.5.11.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Alanı oranları (\*\*\*: p<0,0001).

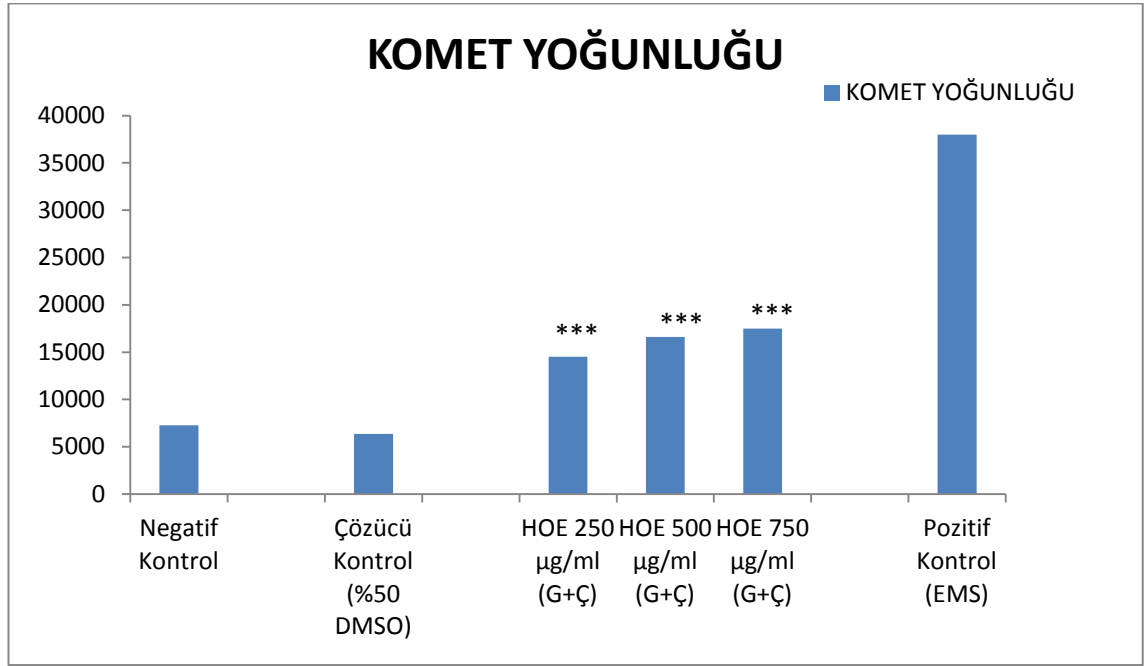
HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Komet Uzunluğu oranının çözücü (% 50 DMSO) kontrol grubunda 29,96 µm, 250 µg/ml doz grubunda 45,33 µm, 500 µg/ml doz grubunda 52,65 µm ve 750 µg/ml doz grubunda 54,94 µm olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.12.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



**Şekil 4.5.12.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Uzunluğu oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

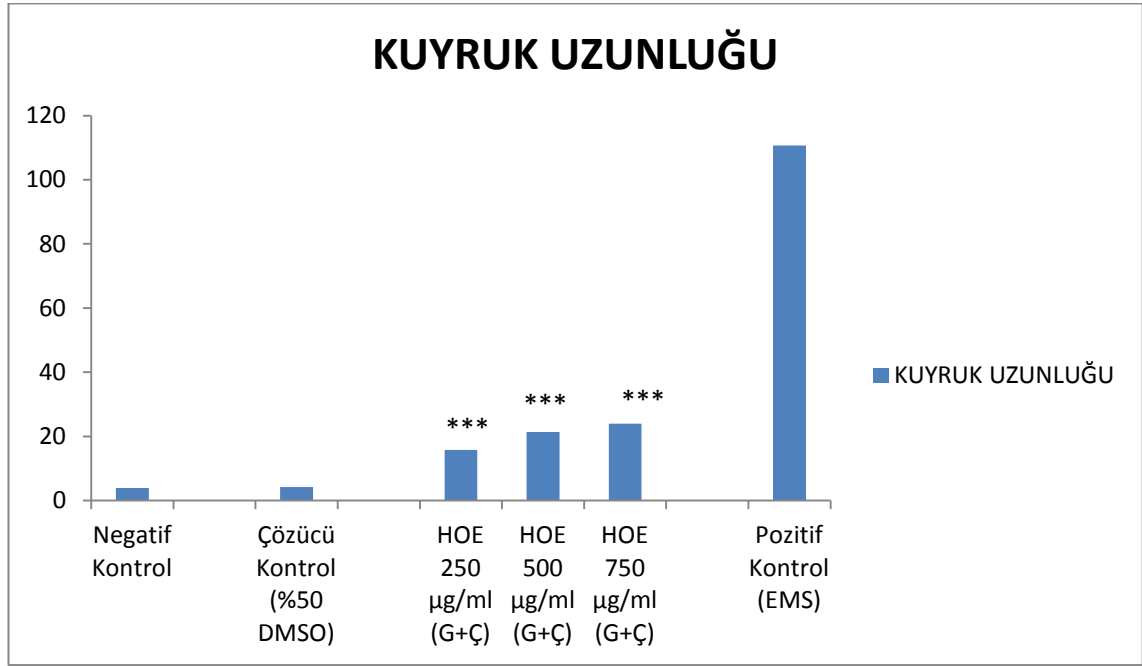


HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, komet yoğunluğu oranının çözücü (% 50 DMSO) kontrol grubunda 6361,28, 250 µg/ml doz grubunda 14504,09, 500 µg/ml doz grubunda 16602,42 ve 750 µg/ml doz grubunda 17480,72 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.13.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



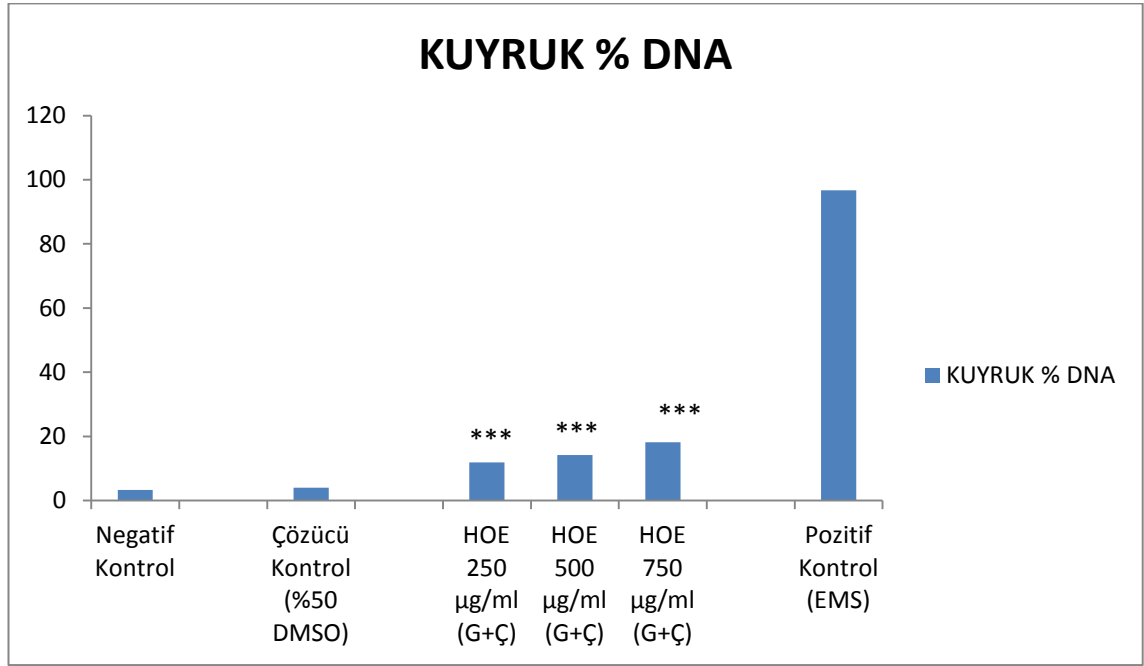
**Şekil 4.5.13.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Yoğunluğu oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Kuyruk Uzunluğu oranının çözücü (% 50 DMSO) kontrol grubunda 4,23  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 15,74  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 21,41  $\mu\text{m}$  ve 750  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 24,00  $\mu\text{m}$  olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.14.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



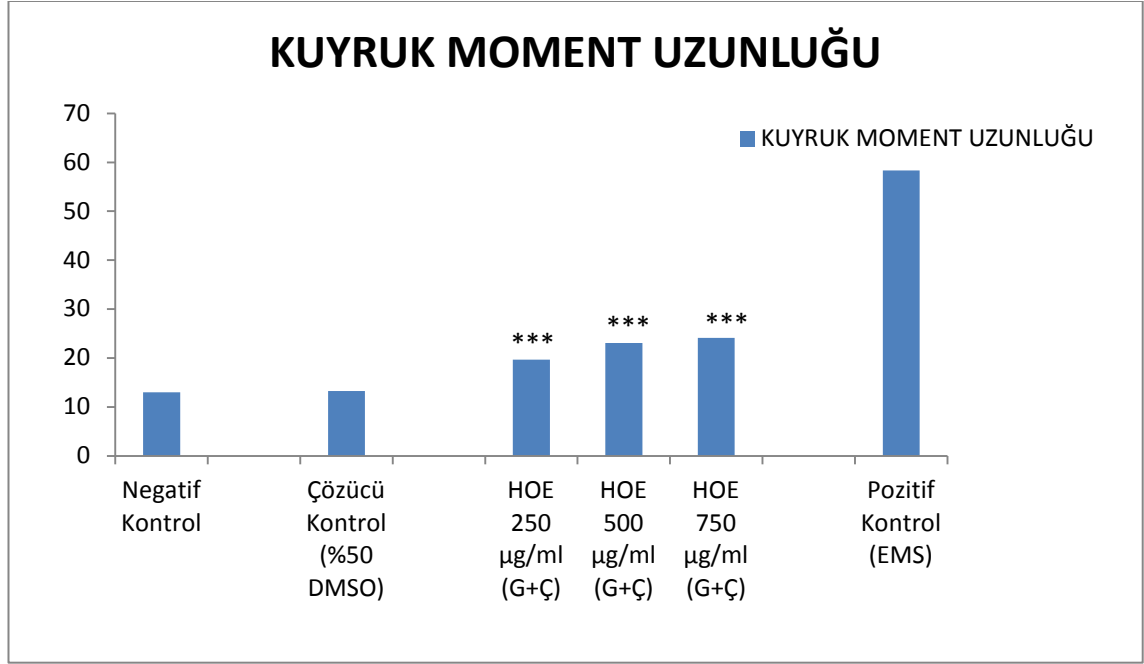
**Şekil 4.5.14.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Uzunluğu oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Kuyruk % DNA oranının çözücü (% 50 DMSO) kontrol grubunda % 3,96, 250 µg/ml doz grubunda % 11,88, 500 µg/ml doz grubunda % 14,13 ve 750 µg/ml doz grubunda % 18,15 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.15.,  $p<0,001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



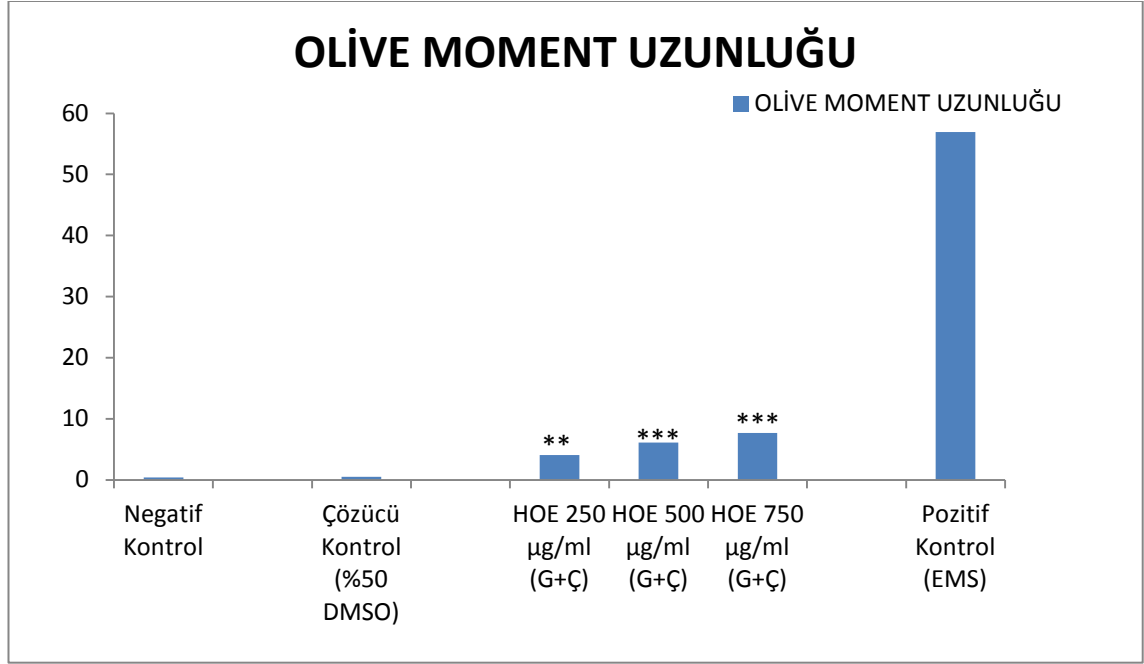
**Şekil 4.5.15.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk % DNA oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Kuyruk Moment Uzunluğu oranının çözücü (% 50 DMSO) kontrol grubunda 13,28  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 19,66  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 23,09  $\mu\text{m}$  ve 750  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 24,09  $\mu\text{m}$  olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.16.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



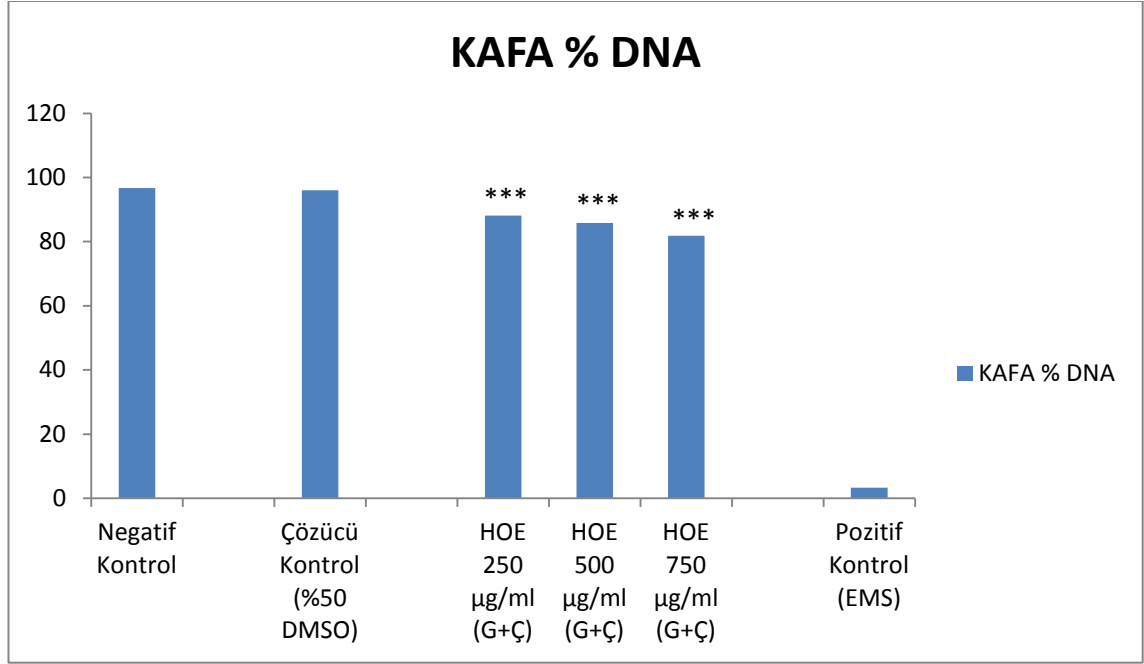
**Şekil 4.5.16.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Moment Uzunluğu oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Olive Moment Uzunluğu oranının çözücü (% 50 DMSO) kontrol grubunda 0,53  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 4,09  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 6,10  $\mu\text{m}$  ve 750  $\mu\text{g/ml}$  doz grubunda 7,66  $\mu\text{m}$  olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.5.17.,  $p<0,005$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



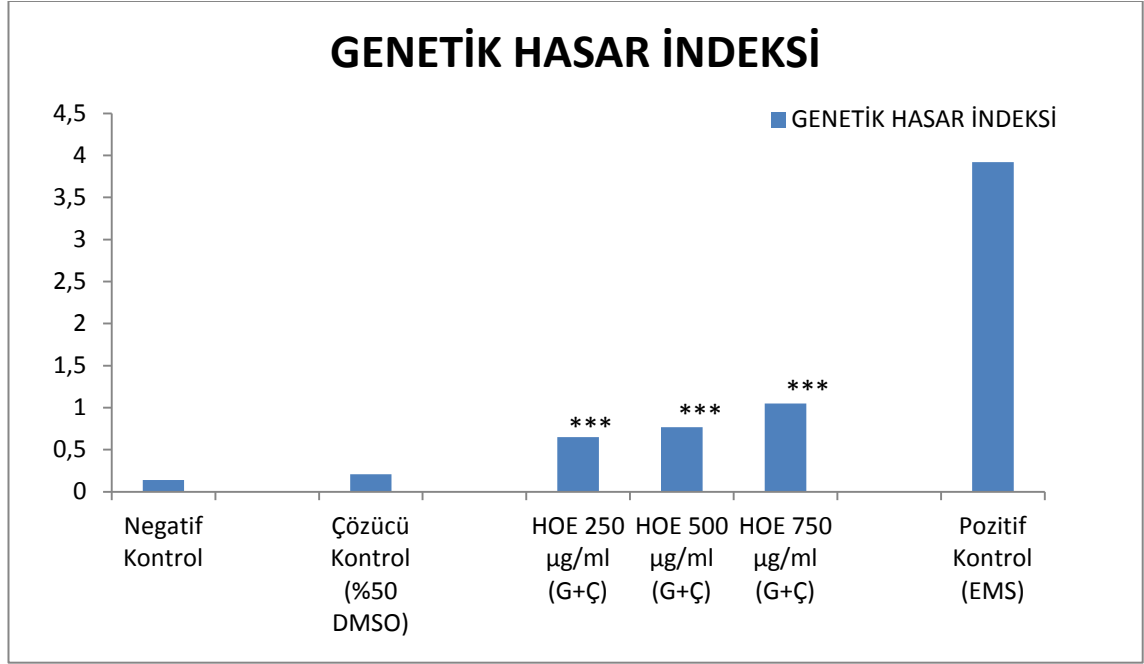
**Şekil 4.5.17.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Olive Moment Uzunluğu oranları (\*\*:  $p<0,005$ , \*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Kafa % DNA oranının çözücü (% 50 DMSO) kontrol grubunda % 96,04, 250 µg/ml doz grubunda % 88,12, 500 µg/ml doz grubunda % 85,87 ve 750 µg/ml doz grubunda % 81,85 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir azalış meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.5.18.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



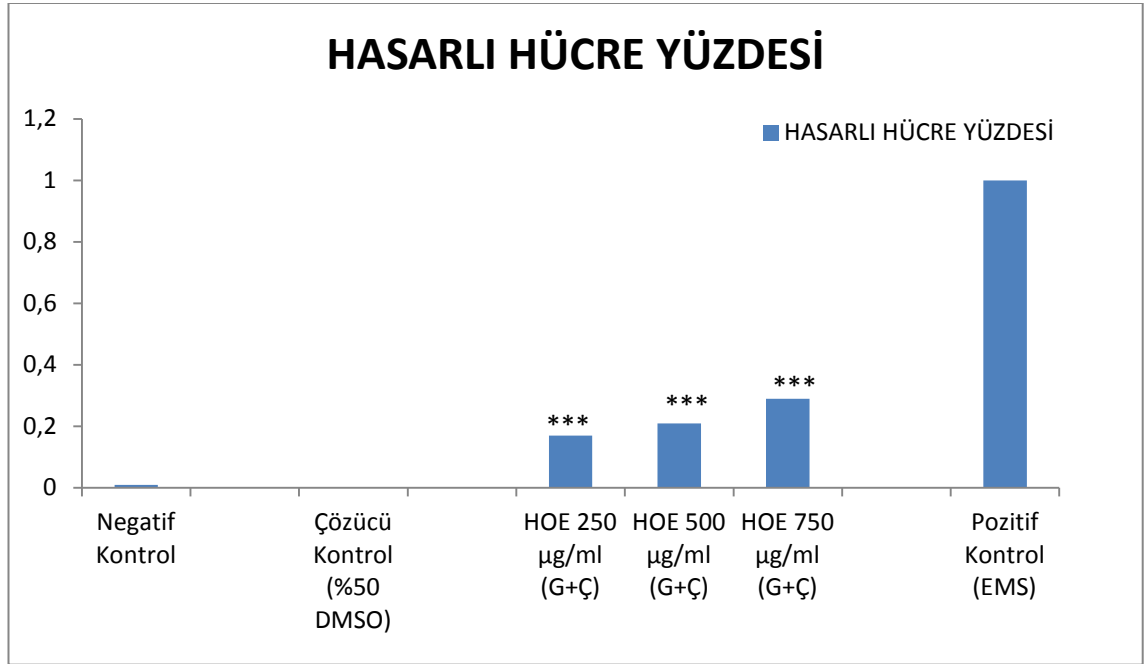
**Şekil 4.5.18.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kafa % DNA oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçlarına göre Genetik Hasar İndeksi verileri değerlendirildiğinde bu oranın; çözücü (% 50 DMSO) kontrol grubunda 0,21, 250 µg/ml doz grubunda 0,65, 500 µg/ml doz grubunda 0,77 ve 750 µg/ml doz grubunda 1,05 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.5.19.,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ).



**Şekil 4.5.19.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi oranları (\*\*\*:  $p<0,0001$ ).

HOE (Gövde+Çiçek) uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçlarına göre Hasarlı Hücre Yüzdesi verileri değerlendirildiğinde bu oranın; çözücü (%5DMSO) kontrol grubunda % 0,00, 250 µg/ml doz grubunda % 0,17, 500 µg/ml doz grubunda % 0,21 ve 750 µg/ml doz grubunda % 0,29 olduğu ve çözücü kontrol grubuna göre her üç doz grubunda da doza bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.5.20., p<0,0001, p<0,0001, p<0,0001).



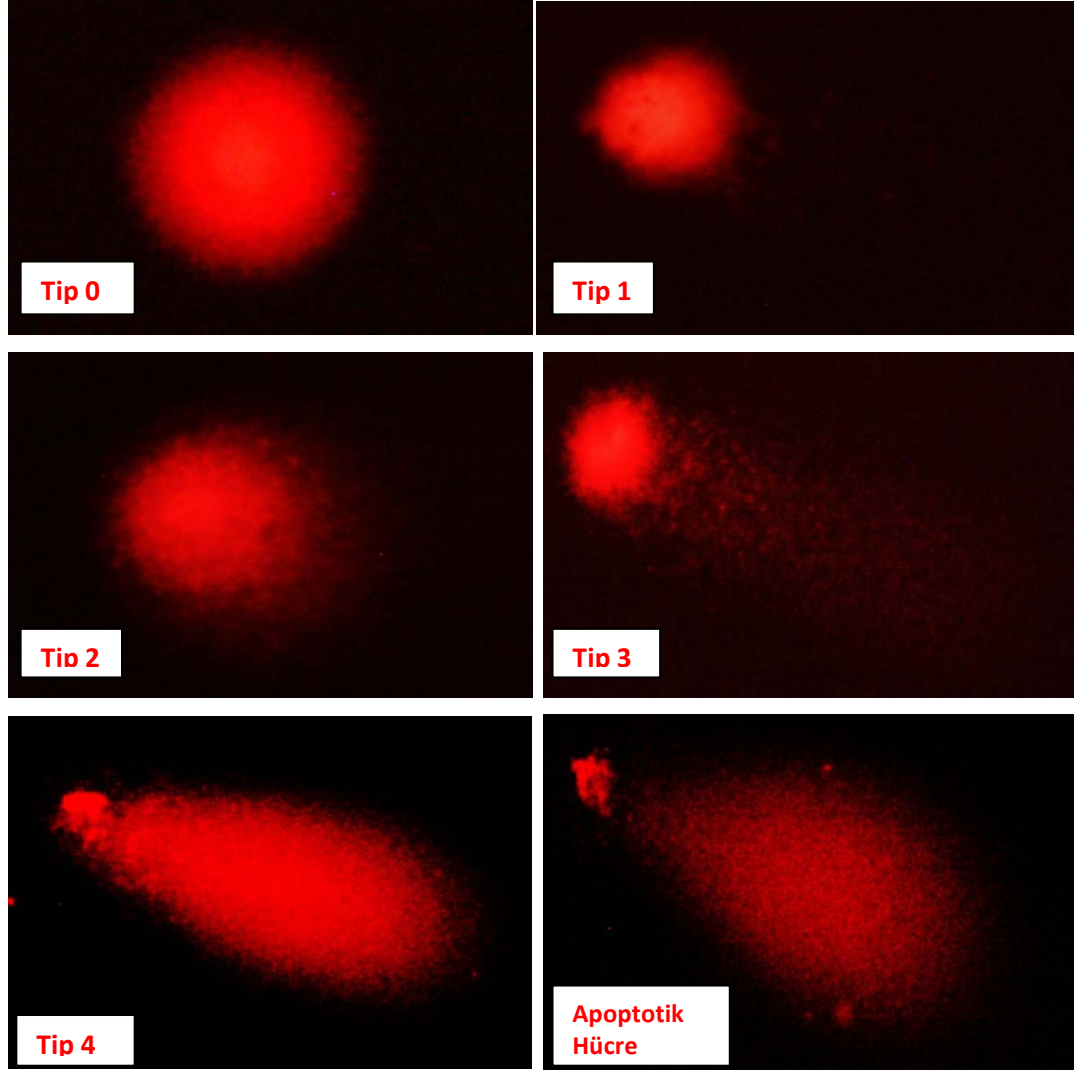
**Şekil 4.5.20.** HOE uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Hasarlı Hücre Yüzdesi oranları (\*\*\*: p<0,0001).

HAE (Gövde+Çiçek) kısmının 125, 250 ve 500 µg/ml'lık dozları ile elde edilen tüm KOomet Testi verileri Çizelge 4.5.1-2 ve Şekil 4.5.1-10'da verilmektedir.

Yine aynı şekilde HOE (Gövde+Çiçek) kısmının 250, 500 ve 750 µg/ml'lık dozları ile elde edilen tüm Komet Testi verileri Çizelge 4.5.2-4 ve Şekil 4.5.10-20'da verilmektedir.

HAE ve HOE ile gerçekleştirilen Komet Testi sonucunda gözlenen hücre tiplerinin fotoğrafları Şekil 4.5.21.'de görülmektedir.





**Şekil 4.5.21.** Komet testi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutba doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. Tip 0-Hasarsız DNA, Tip 1-Çok az hasarlanmış DNA, Tip 2-Az hasarlanmış DNA, Tip 3-Hasarlanmış DNA, Tip 4-Çok hasarlanmış DNA, Apoptotik hücre-Tümüyle hasarlanmış DNA

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tıbbi bitkilerin çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanımı son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir. Bunun sebepleri arasında da bitkilerin doğal yapıya sahip olmaları, üretimlerinin kolay ve ucuz olması, sentetik ilaçlara göre çok daha az yan etkiye sahip olmaları ile birden fazla etkiye sahip olmaları sayılabilir.

Tıbbi bitkilerin farmakolojik aktiviteleri içerdikleri kimyasal bileşiklerden kaynaklanmaktadır. *Hypericum* cinsine ait türlerin de çeşitli hastalıklarda kullanılmalarında sorumlu olan antidepresan, analjezik, antifungal, antitümöral, antineoplastik, antiinflamatuvar, antiviral, antiretroviral gibi farmakolojik aktivitelerinin, *Hypericum* türlerinin en temel iki bileşeni olan hiperisin ve hiperforinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Conforti ve ark. 2007).

Hiperisin ve hiperforin sitotoksosite açısından değerlendirildiğinde; kanser fotodinamik terapisinde hiperisinin kullanılabileceği düşüncesi daha önce ortaya atılmıştır (Agostinis 2002). Hiperforinin ise test edilen kanser hücre hatlarında büyümeyi inhibe ettiği ve kaspaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Hostanska ve ark. 2003). Yapılan bir çalışmada, *H.perforatum*'un metanol ekstraktının önemli ölçüde prostat tümör büyümesini azalttığını göstermiştir (Martarelli ve ark. 2004). *H.hookerianum*'dan izole edilen beş ekstrakt, MCF-7, NCI-H460 ve SF 268 insan tümör hücre hattı büyümesine karşı test edilmiştir. Bu ekstraktlardan ikisi üç hücre hattına karşı önemli inhibitör etki göstermiştir (Wilairat ve ark. 2005). Wistar sıçanlar MT-50 memeli karsinoma hücreleri ile aşılansmış ve hiperforinin peri-tümöral enjeksiyonlarıyla muamele edilmişlerdir. Hiperforin önemli bir şekilde tümör büyümesini inhibe etmiş, tümör hücrelerinin apoptozisini indüklemiş, tümör vaskülezasyonunu azaltmış (Schempp ve ark. 2005) ve tümör yayılması ile metastazı sınırlamıştır (Dell ve ark. 2007). Güney Brezilya'daki altı *Hypericum* türünün metanolik ekstraktları HT-29 ve H-460 kanser hücre hatlarına karşı taranmıştır. Bu türlerden üçünün kanser hücrelerine karşı aktif olduğu (Ferraz ve ark. 2005) ve *H.perforatum*'un lipofilik ekstraktının T24 ve NBT-II mesane kanser hücrelerine karşı antineoplastik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Skalkos ve ark. 2005). Hiperforinin antidepresan aktiviteden sorumlu olan temel bileşik olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda hiperforinin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda farklı tümör hücre hatlarına

karşı antitümör etkisinin olduğu, hem murin hem de insan tümör hücrelerinde apoptozisle ilişkili sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiş ve metastatik büyümeyi kontrol ettiği bulunmuştur (Dona ve ark. 2004). Ayrıca antiinflamatuvar ve antiangiogenic etkileri de mevcuttur (Dona ve ark. 2004).

Yapılan literatür çalışmalarında çalışmada kullandığımız *Hypericum adenotrichum* ve *Hypericum olympicum* türlerinin biyolojik aktivitelerine dair çalışmalar rapor edilmiştir. Türkiye'ye endemik olan *H.adenotrichum*'un ikincil metabolitleri; hiperforin, hiperisin, pseudohiperisin, klorojenik asit, rutin, hiperosit, quersitrin, quersetin, kaempferol, apigenin-7-O-glukozid ve amentoflavonun çeşitli seviyelerdeki konsantrasyonları, hiperforin hariç olmak üzere, HPLC ile belirlenmiştir (Çırak ve ark. 2009). Bir diğer çalışmada da *H. adenotrichum*'un antikanser özellikleri araştırılmış ve bu bitkinin etkili bir p53-bağımsız antineoplastik özelliğinin de olduğu gösterilmiştir (Özmen ve ark. 2009). *H. olympicum* ile yapılan bir çalışmada bu bitkinin stamenlerinde hiperisin ve pseudohiperisin bileşiklerinin yaklaşık olarak eşit miktarda buldukları belirlenmiştir (Kitanov 2001). *Hypericum olympicum*'un esansiyel yağının içeriği ise bir başka çalışmada belirlenmiş, bu bileşiklerin (E)-anethole (% 30,7) ve  $\beta$ -farnesene (% 12,4) olduğu gösterilmiştir (Gudzic ve ark. 2001).

Hiperisin ve hiperforinin genotoksisite çalışmalarına bakıldığında ise; hiperisinin karanlıkta düşük toksik etkili olduğu rapor edilmiştir (Siboni ve ark. 2003). Yapılan bir diğer çalışmada da hiperisin karanlık ortamda ve yüksek dozda (10  $\mu$ M/L) insan lenfositlerinde genotoksik olduğu gösterilmiştir (Kaştan Yücel 2006). Analjezik ve anti-depresif etkileri nedeniyle Brezilya'da halk tıbbında kullanılan *H.brasiliense* ekstraktının muhtemel klastojenik etkisi Wistar sıçanların kemik iliği hücrelerinde *in vivo* test edilmiş ve *H.brasiliense* ekstraktının çalışılan test sistemlerinde MN ve kromozom aberasyonları (CA) miktarlarını istatistiki olarak önemli ölçüde indüklediği bildirilmiştir (Espósito ve ark. 2005). *Hypericum perforatum* L. etanol ekstraktının sitogenetik etkisi kültüre edilmiş insan lenfositlerinde çalışılmış, bu bitki ekstraktının kromozomal aberasyonları (CA) ve anormal metafaz frekansını arttırdığı bulunmuştur (Saadat 2006). Psikiyatrik hastalıkların tedavisinde besin takviyesi olarak kullanılan, içeriği *Hypericum perforatum* (Sarı kantaron), *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) ve *Spirulina* (Filamentöz siyanobakteri) karışımından medyana gelen St. John's Wort

takviye edici gıda maddesinin (SJWS) genotoksik/antigenotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Bunun için *in vivo* olarak mikronükleus (MN) ve kromozom aberasyonu (CA) testleri gerçekleştirilmiştir. (SJWS) doza bağımlı olarak, femoradaki polikromatik eritrositlerde MN frekansını arttırmış ve fare testisi kromozomlarında aberasyonlara neden olmuştur. *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) ve *Spirulina* (Filamentöz siyanobakteri) bu karışımda çok az miktarda bulunması ve karışımın çok büyük bir kısmını *Hypericum perforatum* (Sarı kantaron) oluşturmasından dolayı bu genotoksik etkinin *Hypericum perforatum*'dan kaynaklandığı düşünülmüştür (Aleisa 2008). Fotosensitizer hiperisinin, iki farklı baş ve boyun skuamöz hücre karsinoması (HNSCC) hücre hatları üzerinde genotoksik etkisi comet yöntemiyle karanlıkta çalışılmıştır. Hiperisinin test edilen tüm dozlarında genotoksik olduğu bulunmuştur (Gyenge ve ark. 2012).

Yapılan literatür taramasında *H. adenotrichum* ve *H. olympicum* subsp. *olympicum* türleri ile yapılmış herhangi bir *in vitro* genotoksisite ve/veya antigenotoksisite çalışmasına rastlanmamıştır. Çalışmamız bu açıdan orjinal olarak değerlendirilmektedir. Tıbbi bitkilerin genotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesi, bu ürünlerin pazarlanması ve farmasötik ürünlerin onaylanmaları açısından en önemli klinik olmayan güvenlilik çalışmalarındandır. Ayrıca tıbbi bitkilerin genotoksisite çalışmaları bu bitkilerin olası mutajenik ve karsinojenik risklerinin belirlenmesi için de oldukça önemlidir. Bu çalışmada da, *Hypericum* cinsine ait Kuzeydoğu Türkiye'ye endemik olan *H.adenotrichum* ve genellikle Güneydoğu Avrupa'da yayılış gösteren *H.olympicum* subsp. *olympicum*'un genotoksisite ve/veya antigenotoksisite açısından güvenilirlik sınırları insan lenfositlerinde *in vitro* Kromozom Aberasyonu (CA), Kardeş Kromatid Değişimi (SCE), Mikronükleus (MN) ve Komet testleri ile belirlenmeye çalışıldı.

Kromozom aberasyonu test sonuçları değerlendirildiğinde, HAE ve HOE gövde+çiçek, gövde ve çiçek ekstraktaları çözücü kontrol grubuna göre; HAE (Gövde) 500 µg/ml'lik dozu kromatid gap oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlendi ( $p<0,05$ ). HOE (Gövde)'nin 250 µg/ml'lik dozu kromozom kırığı oluşumunu anlamlı bir şekilde arttırdığı ( $p<0,05$ ), 750 µg/ml'lik dozu ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde nümerik aberasyon (kromozom takımı sayısında azalma) meydana getirdiği

belirlendi. Her iki ekstrakta da toplam aberasyonlar açısından anlamlı bir artış gözlenmedi. HAE'nin her biri çözücü kontrole göre 250 ve 500 µg/ml dozlarında SCE oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdi ( $p<0,05$ ,  $p<0,005$ ,  $p<0,001$ ). HOE'nin her biri çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında ise 250 ve 500 µg/ml doz gruplarında SCE oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,05$ ,  $p<0,005$ ,  $p<0,001$ ). HAE dozlarının meydana getirdiği mikronükleus oranları değerlendirildiğinde yalnızca gövde+çiçek ekstraktının çözücü kontrole göre 250 µg/ml dozunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldi ( $p<0,05$ ). HOE her birine bakıldığında her üç doz için de yalnızca gövde ekstraktının 750 µg/ml dozunun çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir MN artışı meydana getirdiği gözlemlendi ( $p<0,05$ ). HAE'lerin komet testi verilerine göre, komet alanı, komet uzunluğu, komet yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzunluğu ve olive moment uzunluğu oranlarında her üç doz grubunda da çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışın, kafa % DNA'da ise anlamlı bir azalışın olduğu belirlendi. Genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi oranları çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında yine üç doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,005$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  sırasıyla). HOE'lerin Komet testi verilerine göre, komet alanı, komet uzunluğu, komet yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzunluğu ve olive moment uzunluğu oranlarında her üç doz grubunda da çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışın, kafa % DNA'da ise anlamlı bir azalışın olduğu belirlendi. Genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi oranları çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında yine üç doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  sırasıyla).

Dört farklı genotoksisite testinden elde ettiğimiz sonuçlar *Hypericum adenotrichum* ve *Hypericum olympicum* subsp. *olympicum* türlerinin insan lenfosit kültürlerinde genotoksik etkiler meydana getirdiğini ortaya koyarak birbirlerini doğrular niteliktedir. Bununla birlikte, elde ettiğimiz sonuçlar *Hypericum*'un farklı türleriyle yapılan genotoksisite çalışmaları ile uyumlu görünmektedir (Saadat 2005, Esposito 2006, Aleisa 2008, Gyenge ve ark. 2012).

Çalışma sonunda elde edilen verilerin daha sonra yapılacak benzer çalışmalara veya geliştirilecek *in vivo* çalışmalara kaynak ve yararlı olacağı kanısındayız. Sonuçlar

doğrultusunda bu çalışma, *Hypericum adenotrichum* ve *Hypericum olympicum* türlerinin genotoksik etkisini ortaya koyması ve *Hypericum* türlerinin genotoksitesisi ile ilgili literatürdeki boşlukları doldurmasından dolayı orijinal olarak değerlendirilmektedir.

*Hypericum* cinsine ait bu iki tür genotoksik özellikler gösterdiğinden dolayı bu bitkilerin, bazı spesifik populasyonlar, özellikle de çocuklar ve hamile bayanlar, tarafından kullanılmasında dikkatli ve temkinli olunmalıdır. Ya da bu bitkilerden elde edilecek bitkisel bileşiklerin ilaç olarak kullanılmaları durumunda doz ayarlamalarının yapılması önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., Witte, P.A.M. 2002.** Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34: 221-241.
- Aguilar-Santamaria, L., Ramirez, G., Herrera-Arellano, A., Zamilpa, A., Jimenez, J.E., Alonso-Cortes, D., Cortes-Gutierrez, E.I., Ledesma, N., Tortoriello, J. 2007.** Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 35-40.
- Al-Zubairi, A.S., Abdul, A.B., Syam, M.M. 2010.** Evaluation of the genotoxicity of zerumbone in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, 24: 707-712.
- Aleisa, A.M. 2008.** Cytological and Biochemical Effects of St. John's Wort Supplement (A Complex Mixture of St. John's Wort, Rosemary and Spirulina) on Somatic and Germ Cells of Swiss Albino Mice. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 5(5): 408-417.
- Altıntaş, N., Örenay, S., Aşçı, M., Reyhan, E., Türk, M., Yolosiğmaz, A., Altıntaş, N. 2005.** Karaciğer Kist Hidatiği Tedavisinde Albendazol Kullanan Hastalarda Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Çalışması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(4): 235-237.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E. 1975.** Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31: 347-364.
- Anathi, R., Chandra, N., Santhiya, S.T., Ramesh, A. 2010.** Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 127: 558-560.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. 2011.** Genetik Toksikite Testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3): 221-229.
- Auerbach, C., Robson, J.M., Carr, J.G. 1947.** The chemical production of mutations. *Science*, 105: 243.
- Başaran, A.A. 2012.** Ülkemizdeki bitkisel ilaçlar ve ürünlerde yasal durum. *Türk Eczacıları Birliği Yayını / Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*, 27-28: 22-26.
- Başer, K.H.C. 2003.** Industrial plants as sources of dietary supplements: Dietary Supplements of Plant Origin, Ed.: Maffei, M., Taylor and Francis, London, pp: 31-42.
- Baytop, T. 1984.** Türkiye'de Bitkilerle Tedavi (Geçmişten Bugüne). İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 3255.
- Beerhues, L. 2006.** Hyperforin. *Phytochemistry*, 67: 2201-2207.

**Betti, A.H., Stein, A.C., Dallegrave, E., Wouters, A.T.B., Watanabe, T.T.N., Driemier, D., Buffon, A., Rates, S.M.K. 2012.** Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 2349-2355.

**Biri, A., Civelek, E., Karahalil, B., Şardaş, S. 2002.** Assessment of DNA Damage in Woman Using Oral Contraceptives. *Mutat. Res.*, 521: 113-119.

**Bobrov, N., Cavarga, I., Longauer, F., Rybarova, S., Fedorocko, P., Brezani, P., Miskovsky, P., Mirossay, L., Stubna, J. 2007.** Histomorphological changes in murine fibrosarcoma after hypericin-based photodynamic therapy. *Phytomedicine*, 14(2-3): 172-178.

**Boeira, J.M., Fenner, R., Betti, A.H., Provensi, G., Lacerda, L.A., Barbosa, P.R., Gonzales, F.H.D., Correa, A.M.R., Driemeier, D., Dall'Alba, M.P., Pedrosa, A.P., Gossman, G., Silva, J., Rates, S.M.K. 2010.** Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 128: 526-532.

**Bozkurt, G., Yüksel, M., Karaboğaz, G., Sut, N., Savran, O., Palanduz, Ş., Yiğitbaşı, O.N., Algüneş, Ç. 2003.** Sister Chromatid Exchanges in Lymphocytes of Nuclera Medicine Physicians. *Mutat. Res.*, 535: 205-213.

**Brondz, I., Greibrokk, T., Aasen, A.J. 1983.** *n*-Alkanes of *hypericum perforatum*: a revision. *Phytochemistry*, 22(1): 295-296.

**Brusick, D. 1980.** Chapter 2 – Fundamentals of Genetic Toxicology: Principles of Genetic Toxicology, Plenum Press, New York, pp: 11-44.

**Büyükleyla, M., Rencüzoğulları, E. 2009.** The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 943-947.

**Cardoso, R.S., Takahashi-Hyodo, S., Peitl Jr., P., Ghilardi-Neto, T., Sakamoto-Hojo, E.T. 2001.** Evaluation of Chromosomal Aberrations, Micronuclei, and Sister Chromatid Exchanges in Hospital Workers Chronically Exposed to Ionizing Radiation. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 21: 431-439.

**Cavalcanti, B.C., Ferreira, J.R.O., Cabral, I.O., Magalhaes, H.I.F., Oliveira, C.C., Rodrigues, F.A.R., Rocha, D.D., Barros, F.W.A., Silva, C.R., Junior, H.V.N., Canuto, K.M., Silveira, E.R., Pessoa, C. Moraes, M.O. 2012.** Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in cultured human leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11): 4051-4061.

**Cherdshewasart, W., Sutjit, W., Pulcharoen, K., Panriansaen, R., Chulasiri M. 2008.** Antimutagenic potential of the Thai herb, *Mucuna collettii* Lace. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 96-103.



- Chu, E.H.Y., Malling, H.V. 1968.** Mammalian cell genetics, II. Chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 61: 1306-1312.
- Clive, D., Spector, J.F.S. 1975.** Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the TK locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.*, 31: 17-29.
- Cloutier, J.F., Castonguay, A., O'Connor, T.R., Drouin R. 2001.** Alkylating agent and chromatin structure determine sequence context-dependent formation of alkylpurines. *J. Mol. Biol.*, 306(2): 169-188.
- Conforti, F., Loizzo, M.R., Statti, A.G., Menichini, F. 2007.** Cytotoxic activity of antioxidant constituents from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Nat. Prod. Res.*, 21: 42-46.
- Çakır, A., Kordali, S., Kilic, H., Kaya, E. 2005.** Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(3): 245-246.
- Çırak, C., Ivanauskas, L., Janulis, V., Radusiene, J. 2009.** Chemical constituents of *Hypericum adenotrichum* Spach, an endemic Turkish species. *Natural Product Research*, 23(13): 1189-1195.
- Davis, P.H. 1965.** Flora of Turkey and The East Aegean Islands. 1. Edinburgh University Press, Edinburgh, 567 p.
- Davis, P.H. 1967.** Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, 2: 355-401.
- Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. 1988.** Flora of Turkey and The East Aegean Islands (Supplement). Edinburgh University Press, Edinburgh, 10: 96-103.
- Dean, B.J., Danford, N. 1984.** Assay for The Detection of Chemically Induced Chromosome Damage in Cultured Mammalian Cells. In. Venitt, S. and Parry, J.M., *Mutagenicity Testing a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, Washington, p: 187-332.
- Delitheos, A., Tiligada, E., Yannitsaros, A., Bazos, I. 1997.** Antiphage activity in extracts of plants growing in Greece. *Phytomedicine*, 4(2): 117-124.
- Dell Aica, I., Caniato, R., Biggin, S., Garbisa, S. 2007.** Matrix proteases, green tea and St. John's wort: biomedical research catches up with folk medicine. *Clin. Chim. Acta.*, 381: 69-77.
- Demirel, S., Zamani, A. 2002.** Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3): 123-27.

**Demma, J., Engidawork, E., Hellman, B. 2009.** Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 136-142.

**Djelic, N., Spremo-Potparevic, B., Bajic, V., Djelic, D. 2006.** Sister chromatid exchange and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with thyroxine in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1-2): 1-7.

**Dona, M., Dell'Aica, I., Pezzato, E., Sartor, L., Calabrese, F., Barbera, M.D., Donella-Deana, A., Appendino, G., Borsarini, A., Caniato, R., Garbisa, S., 2004.** Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, 64: 6225–6232.

**Edziri, H., Mastouri, M., Mahjoub, A., Anthonissen, R., Mertens, B., Cammaerts, S., Gevaert, L., Verschaeve, L. 2011.** Toxic and mutagenic properties of extracts from Tunisian traditional medicinal plants investigated by the neutral red uptake, VITOTOX and alkaline comet assays. *South African Journal of Botany*, 77(3): 703-710.

**Ergun, B. 2010.** Toksikoloji, Besin Güvenliği ve Çevre Sağlığı. Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 253 s.

**Eroğlu, E.H., Hamzaoğlu, H., Aksoy, A., Budak, Ü., Albayrak, S. 2009.** Cytogenetics effect of Helichrysum in human lymphocytes cultures. *Turk J Biol., TÜBİTAK*, 34: 253-259.

**Eroğlu, E.H., Hamzaoğlu, H., Aksoy, A., Budak, Ü., Albayrak, S. 2009.** Genotoxic potential of Senecio trapezuntinus in cultured human lymphocytes. *Caryologia*, 62(4): 303-308.

**Esposito, A.V., Pereira, D.M.V., Rocha, L.M., Carvalho, J.C.T., Maistro, L.E. 2005.** Evaluation of the genotoxic potential of the Hypericum brasiliense (Guttiferae) extract in mammalian cell system in vivo. *Genetics and Molecular Biology*, 28(1): 152-155.

**Essawi, T., Srour, M. 2000.** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70: 343–349.

**Evans, H.J. 1976.** Cytological methods for detecting chemical mutagens: Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection, Ed.: Hollaender, A., Plenum Press, New York, pp. 1–29.

**Farnsworth, N. R., Akerev, O., Bingel, A.S. 1985.** The Bulletin of WHO. 63: 9865-9871.

**Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M.S., 2011.** Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1): 52-67.

- Fenech, M. 2000.** The *in vitro* Micronucleus Technique. *Mutat. Res.*, 455: 81-95.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P., Zeng, E.Y. 2005.** Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 239-246.
- Ferraz, A., Faria, DH., Benneti, M.N., da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., Henriques, A., von Poser, G.L. 2005.** Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine*. 12: 112-115.
- Gadano, A., Gurni, A., Lopez, P., Ferraro, G., Carballo, M. 2002.** *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 11-16.
- Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M. Jr, Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. 1994.** Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations. *Mutat. Res.*, 312(3): 241–261.
- Gastpar, M., Singer, A., Zeller, K. 2005.** Efficacy and tolerability of hypericum extract STW3 in long-term treatment with a once-daily dosage in comparison with sertraline. *Pharmacopsychiatry*, 38(2): 78-86.
- Grant, W.F. 1994.** The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.*, 310(2): 175–185.
- Grant, W.F. 1978.** Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. *Environmental Health Perspectives*, 27, pp: 37-43.
- Grant, W.F. 2001.** Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations. *Mutation Research*, 488: 91-116.
- Green, M.H.L., Muriel, W.J. 1976.** Mutagen testing using *trp+* reversion in *Escherichia coli*. *Mutat Res.*, 38: 3–32.
- Gudzic, B., Dordevic, S., Palic, R., Stojanovic, G. 2001.** Essential oils of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum perforatum* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(3): 201-203.
- Gunatilaka, A.A.L., Balasubramaniam, S., Kumar, V. 1979.** 2,3-Dimethoxyxanthone from *Hypericum mysorensis*. *Phytochemistry*, 18(1): 182-183.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C. 2000.** Flora of Turkey and The East Aegean Islands (Supplement 2). Edinburgh University Press, Edinburgh, 11: 71-72.
- Gyenge, E.B., Forny, P., Lüscher, D., Laass, A., Walt, H., Maake, C. 2012.** Effects of hypericin and a chlorin based photosensitizer alone or in combination in squamous cell carcinoma cells in the dark. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9(4), 321-331.

**Hanawalt, P.C., Haynes, R.H. 1965.** Repair replication of DNA in bacteria: irrelevance of chemical nature of base defect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19: 462–467.

**Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. 2004.** Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, Churchill Livingstone, Edinburgh.

**Hernandez, N.E., Tereschuk, M.L., Abdala, L.R. 2000.** Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 317–322.

**Hostanska, K., Reichling, J., Bommer, S., Weber, M., Saller, R. 2003.** Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum L.*) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm*, 56: 121-132.

**Hunt, E.J., Lester, C.E., Lester, E.A., Tackett, R.L. 2001.** Effect of St. John's wort on free radical production. *Life Sciences*, 69(2): 181-190.

**Ishiguro, K., Yamaki, M., Kashihara, M., Takagi, S., Isoi, K. 1990.** A chromene from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry*, 29(3): 1010-1011.

**Ishiguro, K., Nagareya, N., Fukumoto, H. 1998.** A phloroglucinol derivative from cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. *Phytochemistry*, 47(6): 1041-1043.

**Jacobson-Kram, D., Albertini, R.J., Brandda, R.F., Falta, M.T., Iype, P.T., Kolodner, K., Liou, S.-H., McDiarmid, M.A., Morris, M., Nicklas, J.A., O'Neill, J.P., Poirier, M.C., Putman, D., Strickland, P.T., Williams, J.R., Xiao, S. 1993.** Measurement of chromosomal aberrations, sister chromatid exchange, HPRT mutations and DNA adducts in peripheral lymphocytes of human populations potentially at increased risk for cancer. *Environ. Health Persp.*, 101: 121–125.

**Jagetia, G.C., Jayakrishnan, A., Fernandes, D., Vidyasagar, M.S. 2001.** Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutation Research*, 491: 9-16.

**Jaloszynski, P., Kujawski, M., Wasowicz, M., Szulc, R., Szyfter, K. 1999.** Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439(2): 199-206.

**Josephy, P.D., Gruz, P., Nohmi, T. 1997.** Recent advances in the construction of Bacterial genotoxicity Assays. *Mutat. Res.*, 386: 1-23.

**Kakunaga, T. 1973.** A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from BALB/3T3. *Int. J. Cancer*, 12: 463–473.

- Kao, F.T., Puck, T.T. 1968.** Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 60: 1275– 1281.
- Karamanoğlu, K. 1974.** Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Bitkilerin Sinonimleriyle Birlikte Yetiřtiđi Yerler ve Genel Yayılma Alanları, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi, 1, Ankara.
- Kaştan Yüzel, N. 2006.** Kantaron otundan (*Hpericum perforatum* L.) elde edilen hyperisin maddesinin insan lenfosit kültürlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD) üzerine etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta.
- Kersten, B., Zhang, J., Brendler-Swaab, S.Y., Kasper, P., Müller, L. 1999.** The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutat. Res.*, 445: 55-71.
- Khan, F., Sherwani, A.F., Afzal, M. 2009.** Chromosomal aberration and micronucleus studies of two topoisomerase (II) targeting anthracyclines. *Journal of Environmental Biology*, 30(3): 409-412.
- Kihlman, B. A. 1975.** Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.*, 31: 401.
- Kitanov, G.M. 2001.** Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 171-178.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. 1986.** Concepts of Genetics. Merrill Pub. Co., USA, 699 pp.
- Koçyiğit, M. 2005.** Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kohler, S.W., Provost, G.S., Fieck, A., Kretz, P.L., Bullock, W.O., Putman, D.L., Sorge, J.A., Short, J.M. 1991.** Analysis of spontaneous and induced mutations in transgenic mice using a lambda ZAP/lacI shuttle vector. *Environ. Mol. Mutagen*, 18(4): 316–321.
- Kramer P.J. 1998.** Genetic Toxicology. *J Pharm Pharmacol*, 50: 395-405.
- Kuhnlein, U., Tsang, S.S., Edwards, J. 1979.** Characterization of DNA damages by filtration through nitrocellulose filters: a simple probe for DNA-modifying agents. *Mutat. Res.*, 64 (3): 167–182.
- Landi, S., Iazzolino, E., Barale, R. 2000.** Are Baseline Frequencies of SCEs, CAs and MN in Human Lymphocytes related to hematological values? *Mutat. Res.*, 469: 159-166.

**Larsen, K.H., Brash, D., Cleaver, J.E., Hart, R.W., Maher, V.M., Painter, R.B., Sega, G.A. 1982.** DNA repair assays as tests for environmental mutagens. A report of the US EPA Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 98(3): 287–318.

**Lazutka, J.R., Mierauskiene, J., Slapsyte, G., Dedonyte, V. 2001.** Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Menta piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 39: 485-492.

**LeBouf, R.A., Kerckaert, G. 1987.** Enhanced morphological transformation of early passage Syrian hamster embryo cells cultured in medium with a reduced bicarbonate concentration and pH. *Carcinogenesis*, 8: 680–697.

**Lewin, R. 2000.** Modern İnsanın Kökeni, TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Çeviri: N. Özüaydın, 7. basım, TÜBİTAK, Ankara.

**Lynch, B., Simon, R., Roberts, A. 2011.** In vitro and in vivo assessment of the genotoxic activity of aloesin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 61: 215-221.

**Mahata, J., Basu, A., Ghoshal, J., Sarkar, N., Roy, A.K., Poddar, G., Nandy, A.K., Banerjee, A., Ray, K., Natarajan, A.T., Nillson, R., Giri, K. 2003.** Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in Individuals Exposed to Arsenic Through Drinking Water in West Bengal, India. *Mutat. Res.*, 534: 133-143.

**Mannel, M. 2004.** Drug interactions with St John's wort: mechanisms and clinical implications. *Drug Saf.*, 27: 773-797.

**Martarelli, D., Martarelli, B., Pediconi, D., Nabissi, M.I., Perfumi, M., Pompei, P. 2004.** *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice. *Cancer Lett.*, 210: 27-33.

**Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. 2006.** Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11): 1515-1531.

**McDiarmid, M.A., Jacobson-Kram, D., Koloder, K., Deeter, D.P., Lachiver, R.M., Scott, B.G., Petrucelli, B., Gustavison, D., Putman, D. 1995.** Increased frequencies of sister chromatid exchange in soldiers deployed to Kuwait. *Mutagenesis*, 10: 263–265.

**Meruelo, D., Lavie, G., Lavie, D. 1988.** Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci., U S A*, 85(14): 5230-4.

**Miadokova, E., Chalupa, I., Vlckova, V., Sevcovicova, A., Galova, E., Vlcek, D., Kopaskova, M., Hercegova, A. 2008.** In vitro genotoxicity assessment of non-photoactivated hypericin. *Toxicology Letters*, 180(5): 111-112.

**Minozzo, R., Deimling, L.I., Gigante, L.P., Santos-Mello, R. 2004.** Micronuclei in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead. *Mutation Research*, 565: 53-60.

**Miskovsky, P., 2002.** Hyperisin—a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Curr Drug Targets*, 3(1): 55-84

**Mitchell, A.D., Casciano, D.A., Meltz, M.L., Robinson, D.E., San, R.H., Williams, G.M., Von Halle, E.S. 1983.** Unscheduled DNA synthesis tests. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 123: 363–410.

**Mitchell, A.D., Auletta, A.E., Clive, D., Kirby, P.E., Moore, M.M., Myhr, B.C. 1997.** The L5178Y/tk+/- Mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 394(1–3): 177–303.

**Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000.** The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, 455: 29-60.

**Muhammad, H., Gomes-Carneiro, M.R., Poça, K.S., De-Oliveira, A.C.A.X., Afzan, A., Sulaiman, S.A., Ismail, Z., Paumgarten, F.J.R. 2011.** Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2): 647-653.

**Muller, H.J. 1927.** Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66: 84-87.

**Neagoe, I., Macri, B. M., Flonta, M. L. 2004.** Hyperici herba extract interaction with artificial lipid bilayers. *J Pharm Pharmacol.*, 56: 1283-1289.

**Nigro, M.M.L., Palermo, A.M., Medry, M.D., Carballo, M.A. 2003.** Cytogenetic Evaluation of Nitroimidazole Derivatives. *Toxicol. In Vitro*, 17: 35-40.

**Nilan, R.A. and Vig, B.K. 1976.** Plant test systems for detection of chemical mutagens: Chemical Mutagens; Principles and Methods for Their Detection. Ed.: Hollander, Plenum Pres, New York, 4, pp: 143.

**Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T., Shinagawa H. 1985.** Evaluation of the New System (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(5): 219-229.

**Okem, A., Finnie, J.F., Staden, J.V. 2012.** Pharmacological, genotoxic and phytochemical properties of selected South African medicinal plants used in treating stomach-related ailments. *Journal of Ethnopharmacology*, 139: 712-720.

**Okpanyi, S.N., Lidzba, H., Scholl, B.C., Miltenburger, H.G. 1990.** Genotoxicity of a standardized *Hypericum* extract. *Arzneimittelforschung*, 40 (8): 851-855.

**Ono, T., Sekiya, T., Takahashi, T., Sasaki, Y.F., Izumiyama, F., Nishidate, E., Tsuda, S., Ohta, T. 1997.** The genotoxicity of diaveridine and trimethoprim. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 3(4): 297-306.

**Palombo, E.A. 2006.** Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: mode of action and the effects on intestinal functions. *Phytotherapy Research*, 20: 717–724.

**Polya, G.M. 2003.** Biochemical Targets of Plant Bioactive Compounds: A Pharmacological Reference Guide to Sites of Action and Biological Effects. CRC Press, Florida.

**Pouwels, P.H., Knijnenburg, C.M., van Rotterdam, J., Cohen, J.A. 1968.** Structure of the replicative form of bacteriophage phi X174. VI. Studies on alkali-denatured doublestranded phi X DNA. *J. Mol. Biol.*, 32: 169–182.

**Quillardet, P., de Bellecombe, C., Hofnung, M. 1985.** The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutation Research*, 147: 79-95.

**Randerath, K., Liehr, J.G., Gladek, A., Randerath, E. 1989.** Use of the 32P-postlabelling assay to study transplacental carcinogens and transplacental carcinogenesis. *IARC Sci. Publ.*, 96: 189–205.

**Rasmussen, R.E., Painter, R.B. 1966.** Radiation-stimulated DNA synthesis in cultured mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 29(1): 11–19.

**Reddy, M.V. 2000.** Methods for testing compounds for DNA adduct formation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 32(3): 256– 263.

**Ribeiro, J.C., Andrade, S.F., Bastos, J.K., Maistro, E.L. 2009.** Evaluation of the genotoxic potential of *Austroplenckia populnea* (Reiss) Lundell chloroform fraction from barkwood extract in rodent cells in vivo. *Braz. J. Biol.*, 69(4): 1141-1147.

**Robinson, D.R., Goodall, K., Albertini, R.J., O'Neill, J.P., Finette, B., Sala-Trepat, M., Moustacchi, E., Bates, A.D., Beare, D.M., Green, M.H., Cole, J. 1994.** An analysis of in vivo *hprt* mutant frequency in circulating T-lymphocytes in the normal human population: a comparison of four datasets. *Mutat. Res.*, 313: 227–247.

**Robson, N.K.B. 1977.** Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 1. Infrageneric classification. *Bulletin of the British Museum of Natural History (Botany)* 5: 295-355.

**Rodriguez-Mercado, J.J., Rolden-Reyes, E., Altamirano-Lozano, M. 2003.** Genotoxic Effects of Vanadium (IV) in Human Peripheral Blood Cells. *Toxicol. Letters*, 144: 359-369.



**Romero-Jimenez, M., Campos-Sanchez, J., Analla, M., Munoz-Serrano, A. Alonso-Moraga, A. 2005.** Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Research*, 585: 157-155.

**Rozgaj, R., Kasuba, V., Fucic, A. 2002.** Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, 16: 187-192.

**Russell, L.B., Selby, P.B., von Halle, E., Sheridan, W., Valcovic, L. 1981.** Use of the mouse spot test in chemical mutagenesis: interpretation of past data and recommendations for future work. *Mutat. Res.*, 86(3): 355-379.

**Saadat, M. 2006.** Effects of *Hypericum perforatum* L. and *Matricaria chamomilla* L. Extracts on the Human Chromosomes. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1(3): 289-292.

**San, R.H., Stich, H.F. 1975.** DNA repair synthesis of cultured human cells as a rapid bioassay for chemical carcinogens. *Int. J. Cancer*, 16(2): 284-291.

**Sanchez-Lamar, A., Fonseca, G., Fuentes, J.L., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Perticone, P., Degrassi, F., De Salvia, R. 2008.** *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 416-422.

**Santa Maria, S.R., Arana, M., Ramirez, O. 2007.** Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from male native miners working in the Peruvian Andes. *Genetics and Molecular Biology*, 30(4): 1135-1138.

**Schempp, C.M., Kiss, J., Kirkin, V., Averbeck, M., Haarhaus, B.S., Kremer, B., Termeer, C.C., Sleeman, J., Simon, J.C. 2005.** Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor in vitro and in vivo. *Planta Med.*, 71: 999-1004.

**Seidman, M., 1989.** The development of transient SV40 based shuttle vectors for mutagenesis studies: problems and solutions. *Mutat. Res.*, 220(2-3): 55-60.

**Sharifuddin, Y., Parry, E.M., Parry, J.M. 2012.** The genotoxicity and cytotoxicity assessments of andrographolide *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 1393-1398.

**Schmid, W. 1975.** The micronucleus test. *Mutat Res*, 31: 9-15.

**Siboni, G., Amit-Patito, I., Weizman, E., Waintraub-Porat, M., Weitman, H., Ehrenberg, B., Malik, Z. 2003.** Specificity of photosensitizer accumulation in undifferentiated versus differentiated colon carcinoma cells. *Cancer Lett.*, 30;196(1): 57-64.

**Siddique, Y.H., Ara, G., Beg, T., Faisal, M., Ahmad, M., Afzal, M. 2008.** Antigenotoxic role of *Centella asiatica* L. extract against cyproterone acetate induced genotoxic damage in cultured human lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, 22: 10-17.

**Silva, J., Freitas, T.R.O., Marinho, J.R., Speit, G., Erdtmann, B. 2000.** An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol.*, 23: 1.

**Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schnider, E.L. 1988.** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184–191.

**Skalkos, D., Stavropoulos, N.E., Tsimaris, I., Gioti, E., Stalikas, C.D., Nseyo, U.O., Ioachim, E., Agnantis, N.J. 2005.** The lipophilic extract of *Hypericum perforatum* exerts significant cytotoxic activity against T24 and NBT-II urinary bladder tumor cells. *Planta Med.*, 71: 1030-1035.

**Skare, J.A., Schrotel, K.R. 1984.** Alkaline elution of rat testicular DNA: detection of dna strand breaks after in vivo treatment with chemical mutagens. *Mutat. Res.*, 130: 295–303.

**Sosa, S., Pace, R., Bornacin, A., Morazzoni, P., Riva, A., Tubaro, A., Della Loggia, R. 2007.** Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. *J Pharm Pharmacol.*, 59: 703-709.

**Sparow, A.H., Underbrink, A.G., Rossi, H.H. 1972.** Mutations induced in *Tradescantia* by small doses of X-rays and neutrons: analysis of dose–response curves. *Science*, 176: 916–918.

**Suarez, S., Sueiro, R.A., Araujo, M., Pardo, F., Menendez, M.D., Pardinas, M.C., Alvarez, A. 2007.** Increased frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of subjects infected with *Helicobacter pylori*. *Mutation Research*, 626:162-170.

**Sütlüpnar, N. 2005.** Türkiye’de Doğal İlaçlarla Tedavinin Bugünkü Durumu. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul, 67 s.

**Tatar, A., Özkurt, Z., Hacımüftüoğlu, A., Yeşilyurt, A., Vançelik, S. 2009.** Evaluation of Ribavirin Genotoxicity with Sister Chromatid Exchange and Micronuclei Assays in Humans. *Turk J Med Sci. TÜBİTAK*, 39(2): 241-246.

**Tellez, M.G.O., Rodriguez, H.B., Olivares, G.Q., Sortibran, A.N.C., Cetto, A.A., Rodriguez-Arnaiz, R. 2007.** A phytotherapeutic extract of *Equisetum myriochaetum* is not genotoxic either in the *in vivo* wing somatic test of *Drosophila* or in the *in vitro* human micronucleus test. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 182-189.

**Tennant, R.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Zeiger, E., Haseman, J.K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B., et al. 1987.** Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science*, 236 (4804): 933–941.

**Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000.** Single Cell Gel/Comet Assay:

Guidelines for *in vitro* and *in vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen*, 35: 206–221.

**Toker, Z. 2002.** Bazı *Hypericum* türlerinin Uçucu Yağ Bileşenleri ve Bu Yağların Antimikrobiyal Aktiviteleri, *Doktora Tezi*, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

**Tokur, S. 1988.** Bazı *Hypericum* Türlerinin Ekolojisi Üzerinde Araştırmalar. *Doğa TU Botanik Dergisi*. 12(3): 323-331.

**Trifunovic, S., Vajs, V., Macura, S., Juranic, N., Djarmati, Z., Jankov, R., Milosavljevic, S. 1998.** Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 49(5): 1305-1310.

**Özmen, A., Bauer, S., Gridling, M., Singhuber, J., Krasteva, S., Madlener, S., Vo, T.P.N., Stark, N., Saiko, P., Fritzer-Szekeres, M., Szekeres, T., Aşkın-Çelik, T., Krenn, L., Krupitza, G. 2009.** *In vitro* anti-neoplastic activity of the ethnopharmaceutical plant *Hypericum adenotrichum* Spach endemic to Western Turkey. *Oncology Reports*, 22: 845-852.

**Valencia, R., Abrahamson, S., Lee, W.R., Von Halle, E.S., Woodruff, R.C., Wurgler, F.E., Zimmering, S. 1984.** Chromosome mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 134(1): 61–88.

**Van der Lelie, D., Regniers, L., Borremans, B., Provoost, A., Verschaeve, L. 1997.** The VITOTOX® test, an SOS bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity kinetics. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 389(2-3): 279-290.

**Verschaeve, L., Van Gompel, J., Thilemans, L., Regniers, L., Vanparrys, P., Van der Lelie, D. 1999.** VITOTOX® bacterial genotoxicity and toxicity test for the rapid screening of chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 33: 240-248.

**Vogel, E.W., Graf, U., Frei, H.J., Nivard, M.M. 1999.** The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci. Publ.*, 146: 427–470.

**Walker, G.C. 1985.** Inducible DNA repair systems. *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 425-457.

**Weigle, J.J. 1953.** Induction of mutation in a bacterial virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 38: 628–636.

**Werneke, U., Horn, O., Taylor, D. M. (2004).** How effective is St John's wort? The evidence revisited. *J Clin Psychiatry.*, 65: 611-617.

**Wilairat, R., Manosroi, J., Manosroi, A., Kijjoa, A., Nascimento, M.S.J., Pinto, M., Silva, A.M.S., Eaton, G., Herz, W. 2005.** Cytotoxicities of xanthones and cinnamate esters from *Hypericum hookerianum*. *Planta Med.*, 71: 680-682.

**Wilson, D.M., Thompson, L.H. 2007.** Molecular mechanisms of sister-chromatid Exchange. *Mutat Res.*, 616: 11–23.

**Wolf, G., Pieper, R., Obe, G. 1999.** Chromosomal Alterations in Peripheral Lymphocytes of Female Cabin Attendants. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75(7): 829-836.

**Yavuz, A., Topaktaş, M., İstifli, E.S. 2010.** In vitro genotoxic effects of benzoyl peroxide in human peripheral lymphocytes. *Turk J Biol, TÜBİTAK*, 34: 15-24.

**Young, R.R. 2002.** Genetic toxicology: Web resources. *Toxicology*, 173: 103-121.

**Zeiger, E., Haseman, J.K., Shelby, M.D., Margolin, B.H., Tennant, R.W. 1990.** Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16(Suppl 18): 1–14.

**Zimmermann, F.K., Schwaier, R. 1967.** Induction of mitotic gene conversion with nitrous acid, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine and other alkylating agents in *Sacchromyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 100: 63–76.

**Zinck, T., Chaffin, J. 1998.** Herbal health products: What family physicians need to know. *American Familiar Physician* 58: 1064–1065.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Necmiye BALIKÇI  
Doğum Yeri ve Tarihi : Kırcaali / 17.04.1987  
Yabancı Dili : İngilizce  
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)  
Lise : Bursa Anadolu Erkek Lisesi (2005)  
Lisans : Celal Bayar Üniversitesi- Fen-Edebiyat Fakültesi-  
Biyoloji Bölümü (2009)  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü-  
Biyoloji Ana Bilim Dalı / Genel Biyoloji Bilim Dalı  
(2013)  
Çalıştığı Kurum(lar) ve Yıl : -  
İletişim (e-posta) : necmiyebalikci@hotmail.com  
Yayınları\* : Genotoxic, cytotoxic and apoptotic effects of  
*Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. On breast cancer  
cells, *Environmental Toxicology*, 2012