

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Mine YILDIZ

**ENDEMİK BİR TÜR OLAN STACHYS PETROKOSMOS BİTKİ
EKSTRAKTININ METABOLİK AKTİVATÖR VARLIĞINDA VE
YOKLUĞUNDA İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK VE
ANTİ-GENOTOKSİK ETKİSİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDEMİK BİR TÜR OLAN STACHYS PETROKOSMOS BİTKİ
EKSTRAKTININ METABOLİK AKTİVATÖR VARLIĞINDA VE
YOKLUĞUNDA İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK VE ANTI-
GENOTOKSİK ETKİSİ**

Ayşe Mine YILDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 05/05/2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu
İle Kabul Edilmiştir.

.....
Prof.Dr.Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
DANIŞMAN

.....
Prof.Dr.Mehmet TOPAKTAŞ
ÜYE

.....
Doç.Dr.Ümit LÜLEYAP
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2009YL1

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere
tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDEMİK BİR TÜR OLAN STACHYS PETROKOSMOS BİTKİ EKSTRAKTININ METABOLİK AKTİVATÖR VARLIĞINDA VE YOKLUĞUNDA İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK VE ANTI-GENOTOKSİK ETKİSİ

Ayşe Mine YILDIZ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Yıl : 2010, Sayfa: 70
Jüri : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Doç. Dr. Ümit LÜLEYAP

Bu çalışma *Stachys petrokosmos* (Sp) yaprak ekstraktının metabolik aktivatör (S9mix) varlığında ve yokluğunda insan lenfositlerinde genotoksik ve anti-genotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla insan lenfositleri, S9mix'in varlığında ve yokluğunda Sp bitkisinin 1.5, 3.0 ve 6.0 µl/ml'lik konsantrasyonlarındaki yaprak metanol ekstraktları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Sp bitki ekstraktının in vitro genotoksik etkisi, kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormalliği (KA) ve mikronükleus (MN) testleriyle, sitotoksik etkisi de nükleus bölünme indeksi (NBI), proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeksin (MI) saptanmasıyla belirlenmiştir. Ayrıca Sp yaprak ekstraktının mitomycin C ve cyclophosphamide karşı anti-genotoksik etkisi de yine S9mix yokluğunda ve varlığında çalışılmıştır.

S9mix yokluğunda Sp yaprak ekstraktı tek başına KKD sayısını sadece en yüksek dozlarda artırmış, KA'yı tüm dozlarda uyarmış fakat MN sayısını artırmamıştır. Bununla birlikte Sp yaprak ekstraktı Mitomycin C'nin KA oluşumu üzerindeki etkisini azaltmıştır. Sp yaprak ekstraktının tek başına sadece yüksek dozlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu, yine sadece yüksek dozlarda Mitomycin C'nin sitotoksik etkisini artırdığı saptanmıştır. S9mix varlığında Sp yaprak ekstraktının genotoksik ve sitotoksik olmadığı, fakat Cyclophosphamide'in KKD ve MN oluşumu üzerindeki etkisini azaltarak anti-genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Stachys petrokosmos*, insan periferik lenfositleri, kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği, mikronükleus

ABSTRACT

MSc THESIS

THE GENOTOXIC AND ANTI-GENOTOXIC EFFECTS OF AN ENDEMIC SPECIES STACHYS PETROKOSMOS PLANT EXTRACT IN HUMAN LYMPHOCYTES IN THE ABSENCE AND PRESENCE OF METABOLIC ACTIVATOR

Ayşe Mine YILDIZ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Year : 2010, Pages: 70
Jury : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Assoc. Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP

In the present study, the genotoxic and anti-genotoxic effects of *Stachys petrokosmos* leaf extracts (Sp) were investigated in human lymphocytes. For this reason the cells were treated with 1.5, 3.0 and 6.0 µl/ml concentrations of Sp leaf methanol extracts for 24 and 48 hours treatment periods in the absence and presence of metabolic activator (S9mix). The sister chromatid exchange (SCE), chromosome aberration (CA) and micronucleus (MN) tests were used for investigating the effects genotoxicity of Sp. Nuclear division index (NDI), proliferation index (PI) and mitotic index (MI) were also calculated to determine the cytotoxicity of Sp. In addition, the anti-genotoxic effects of Sp against genotoxicity of mitomycin C and cyclophosphamide were also investigated in the absence and presence of S9mix.

In the absence of S9mix, Sp alone induced the SCE frequency at the highest concentrations and induced the CA at all concentration while it did not induce the MN frequency. In addition, Sp decreased the effect of mitomycin C on CA. Sp alone had a cytotoxic effect at the high concentrations only and it induced the cytotoxic effect of Mitomycin C also at the highest concentrations. In the presence of S9mix, it was obtained that Sp was not genotoxic and cytotoxic however, it had an anti-genotoxic effect via decreasing the effects of Cyclophosphamide on KKD and MN frequency.

Key Words: *Stachys petrokosmos*, human peripheral lymphocytes, sister chromatid exchange, chromosome aberration, micronucleus.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarından dolayı Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a ve Doç. Dr. Hasan Basri İLA'ya, Dr. Sebile AZIRAK'a, Biyolog Mehmet BÜYÜKLEYLA'ya, Arş.Grv.Erman Salih İstifli'ye, Biolog Nadire KOPAR'a ve Biolog Fezel NİZAM'a ayrıca teşekkür ederim.

Projemizi maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Araştırma Fonu yöneticilerine de teşekkür ederim (Proje no: FEF2009YL1).

İÇİNDEKİLERSAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XI
1.GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Tıbbi ve Aromatik Bitki Ekstraktları İle Yapılan Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları.....	5
2.2. Stachys Cinsine Ait Bitkilerin Ekstraktları İle Yapılmış Olan Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları.....	7
3. MATERYAL VE METOD.....	11
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	11
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	11
3.1.1.1. Stachys petrokosmos.....	11
3.1.1.2. Metanol.....	12
3.1.1.3. Kromozom Medyumu.....	12
3.1.1.4. Kolşisin (Kolkisin).....	12
3.1.1.5. Hipotonik Eriyik.....	13
3.1.1.6. Fiksatif.....	13
3.1.1.7. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd).....	13
3.1.1.8. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	13
3.1.1.9. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği.....	14
3.1.1.10. Giemsa.....	14
3.1.1.11. Entellan.....	14
3.1.1.12. Nitrik Asit (HNO ₃).....	14
3.1.1.13. Mitomycin C (MMC).....	15

3.1.1.14.Cyclophosphamide (Cyp) (Sigma).....	15
3.1.1.15.RPMI1640 Besi Yeri.....	15
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	15
3.1.2.1. Hassas Terazî.....	15
3.1.2.2. Santrifüj.....	15
3.1.2.3. Mikroskop.....	16
3.1.2.4. İnkübatör.....	16
3.2. Lamların Temizlenmesi.....	16
3.3. Ekstraksiyon.....	16
3.4. Genotoksisite Çalışmaları.....	17
3.4.1. Metabolik Aktivatör Yokluğunda Test Metodu.....	17
3.4.1.1. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması.....	17
3.4.1.1.(1) Hücre Kültürünün Yapılması ve Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi.....	17
3.4.1.1.(2) Preparatların Boyanması.....	18
3.4.1.1.(3) Mikroskobik İnceleme.....	19
3.4.1.2. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması.....	25
3.4.1.2.(1) Hücre Kültürünün Yapılması ve Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi.....	25
3.4.1.2.(2) Preparatların Boyanması.....	27
3.4.1.2.(3) Mikroskobik İnceleme.....	27
3.4.2. Metabolik Aktivatör Varlığında Test Metodu.....	29
3.4.2.1.S9 ve S9mix'in Hazırlanması	29
3.4.2.2.KKD ve KA Yöntemi.....	30
3.4.2.3. MN Yöntemi.....	30

3.5. Anti-genotoksisite Çalışmaları.....	30
3.6. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	31
3.7.İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32
4.1. BULGULAR.....	32
4.1.1. Metabolik Aktivatör Yokluğunda (S9mix) Yapılan Çalışmaların Sonuçları.....	32
4.1.1.1. Metabolik Aktivatör Yokluğunda (S9mix) Stachys petrokosmos (Sp) Yaprak Ekstraktının KKD Üzerindeki Etkisi.....	32
4.1.1.2. S9mix Yokluğunda Sp Yaprak Ekstraktının Kromozom Anormalliği (KA) Oluşumu ve Anormal Hücre (AH) Sayısı Üzerindeki Etkisi.....	36
4.1.1.3. S9mix Yokluğunda Sp Yaprak Ekstraktının Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkisi.....	41
4.1.1.4. S9mix yokluğunda Sp Yaprak Ekstraktının DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkisi.....	44
4.1.2. S9mix Varlığında Yapılan Çalışmaların Sonuçları.....	48
4.1.2.1. Metabolik Aktivatör (S9mix) Varlığında Stachys petrokosmos Sp) Yaprak Ekstraktının (KKD Üzerindeki Etkisi.....	48
4.1.2.2. S9mix Varlığında Sp Yaprak Ekstraktının Kromozom Anormalliği (KA) ve Anormal Hücre (AH) Oluşumu Üzerindeki Etkisi.....	50
4.1.2.3. S9mix Varlığında Sp Yaprak Ekstraktının Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkisi.....	52
4.1.2.4. S9mix Varlığında Sp Yaprak Ekstraktının DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkisi.....	54
4.2. TARTIŞMA.....	55
4.2.1. Stachys petrokosmos Yaprak Ekstraktının İnsan Periferik Lenfositlerinde KKD, KA ve MN Oluşumu Üzerine Etkisi.....	55
4.2.2. Stachys petrokosmos Yaprak Ekstraktının Hücre Bölünmesi Üzerine Etkisi.....	59

5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	70

Çizelge 4.1. S9mix yokluğunda değişik dozlarda Stachys petrokosmos (Sp) Yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı.....	33
Çizelge 4.2. S9mix yokluğunda değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde yapısal kromozom anormalliği ve anormal hücre yüzdesi	37
Çizelge 4.3. S9mix yokluğunda değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan lenfositlerinde mikronükleuslu binukleus hücre yüzdesi.....	42
Çizelge 4.4. S9mix yokluğunda değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde replikasyon indeksi (RI), mitotik indeks (MI) ve nükleus bölünme indeksi (NBI).....	45
Çizelge 4.5. S9mix varlığında değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı.....	49
Çizelge.4.6. S9mix varlığında değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde yapısal kromozom anormalliği (KA) ve anormal hücre yüzdesi (AH).....	51
Çizelge 4.7. S9mix varlığında değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde mikronükleuslu binukleus hücre yüzdesi.....	53
Çizelge 4.8. S9mix varlığında değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde proliferasyon indeksi (PI), mitotik indeks (MI) ve nükleus bölünme indeksi (NBI).....	54

Şekil 3.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi.....	20
Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.....	21
Şekil 3.3. BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması.....	22
Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.....	23
Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.....	23
Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.....	24
Şekil 3.7. Bir (a) ve dört (b) nükleus içeren hücreler.....	28
Şekil 3.8. İki (a) ve üç (b) nükleus içeren hücreler.....	28
Şekil 4.1. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD/Hücre.....	34
Şekil 4.2. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD/hücre sayısının doza bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P<0.02$).....	34
Şekil 4.3. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD/Hücre sayısının doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P<0.05$).....	35
Şekil 4.4. 0.2 µg/ml dozunda MMC ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde indüklenmiş KKD sayısı.....	35
Şekil 4.5. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde hücre başına düşen yapısal kromozom anormallliği.....	38
Şekil 4.6. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya	

Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi.....	38
Şekil 4.7. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde anormal hücre yüzdesinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P<0.02$).....	39
Şekil 4.8. Kromatid kırığı (3.0 µl/ml Sp yaprak ekstraktı+0.2 µg/ml MMC, 48 saat).....	39
Şekil 4.9. Kromozom kırığı (1.5 µl/ml Sp yaprak ekstraktı+0.2 µg/ml MMC, 24 saat).....	40
Şekil 4.10. Fragment (3.0 µl/ml Sp yaprak ekstraktı+0.2 µg/ml MMC, 48 saat).....	40
Şekil 4.11. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren poliploid hücre (6.0 µl/ml Sp yaprak ekstraktı 48 saat).....	41
Şekil 4.12. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MN.....	43
Şekil 4.13. MMC ile 48 saat muamele edilen kültürlerde farklı boyutlarda 5 MN içeren binukleus hücre.....	43
Şekil 4.14. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde RI.....	46
Şekil 4.15. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MI.....	46
Şekil 4.16. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde NBI.....	47
Şekil 4.17. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde nükleus bölünme indeksinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve	

korelasyon katsayısı ($P<0.03$).....	47
Şekil 4.18. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde nukleus bölünme indeksinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P<0.04$).....	48
Şekil 4.19. S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KKD/hücre.....	49
Şekil 4.20. S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı +Cyp karışım ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KKD/hücre sayısının doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P<0.03$).....	50
Şekil 4.21. S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı +Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliği.....	51
Şekil 4.22. S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi.....	52
Şekil 4.23. S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MN'lu binukleus hücre yüzdesi.....	53
Şekil 4.24. S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde PI, MI ve NBI.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

AH	:Anormal Hücre Yüzdesi
BrdUrd	:5'-Bromo-2'-Deoxyuridine
CA	:Chromosome Aberration
CMA	:Klormadin Asetat
Cyp	:Cyclophosphamide
DPPH	: 1,1-diphenyl 2-picryl hydrazyl
DNA	:Deoksiribonukleik Asit
ISCN	: International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemi)
KA	:Kromozomal Anormallikleri
KCl	:Potasyum klorür
KKD	:Kardeş Kromatid Değişimi
LP	:Lipid Peroxidation
MGA	:Minimal Glikoz Agar
MMC	:Mitomycin C
MI	:Mitotik indeks
MN	:Mikronükleus
NaCl	:Sodyum klorür
NBI	:Nükleus Bölünme İndeksi
PI	:Proliferasyon indeksi
rpm	:Round (Rotor) Per Minute (devir/dakika)
SCD	:Sister Chromatid Differentiation
SCE	:Sister Chromatid Exchange
SSC	:Standart Saline Citrate
Sp	:Stachys petrokosmos
S9mix	:Metabolik Aktivatör
TTA	:Total Antioksidant Aktivite
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

1.GİRİŞ

Tarih öncesinde yani yazılı tarih başlamadan çok önceleri, insanlar bitkileri yiyecek ve korunak olarak kullanırken, onları fiziki şikayetlerini tedavi etmek içinde kullanmışlardır. Şüphesiz insanlar, nesiller boyu deneme-yanılma yolu ile bazı bitkilerin hastalıkları iyileştirmede faydalı olduğunu öğrenmiş, aynı zamanda bazılarının yenilebileceğini ve bazılarının da zehirlenmeye ve ölüme neden olabileceklerini de öğrenebilmişlerdir. 5000 yıl önceki yazılı kayıtlarda Sümerler, bitkilerle ilgili çalışmalar yapmışlar ve kekik, defne, kimyon gibi bitkileri iyi tanımlayarak, tıbbi kullanımlarını tarif etmişlerdir. Şifalı bitkilerin özellikleri ve kullanımları hakkındaki Avrupada yazılmış ilk bilimsel eser, Yunanlı hekim Dioscorides tarafından M.S. birinci yüzyılda derlenmiş olan De Materia Medika (Şifalı Bitkiler) kitabıdır. Bu kitap onyedinci yüzyıla kadar yetkin bir başvuru kaynağı olarak kalmıştır. Orta çağı takip eden yüzyıllarda şifalı bitkilerin önemi, onbeşinci yüzyılda matbaanın icadı ile yüzlerce şifalı bitkiler kitabının basılması ile gösterilmiştir. Theophrastus'un Bitkiler Tarihi kitabı da bu kitaplardan biridir. 20. yüzyılda tıp biliminin muazzam bir şekilde gelişmesine rağmen bitkilerin geleneksel tıpta kullanımı halen devam etmektedir (Jain ve ark.2007)

Bitkisel flavonoidlerin anti-inflamatuar, anti-mutajenik ve anti-allerjik özellikleri ortaya konmuştur (Hollman ve ark., 1996). Geleneksel halk hekimliğinde kullanılan bitkiler bilimsel bir süzgeçten geçirilerek yeniden değerlendirilmiş ve fitoterapi bir bilim dalı haline gelmiştir. Bu bilim dalı giderek gelişmekte ve daha fazla önem kazanmaktadır. Dünya sağlık örgütü (WHO) verileri, gelişmekte olan ülkelerde insanların % 80'nin bu terapi yöntemlerini kullandığını ve 3.3 milyar insanın da tıbbi bitkilerden terapi aracı olarak yararlandığını ortaya koymuştur (Çelik ve Çelik, 2007).

Konunun bir başka ve belki de en önemli yönü ise, bazı şifalı bitkilerin yan etkilere ve hatta ölümlere yol açabilecek zehirli maddeler içerdiklerinin bilincine gereğince varılamamış olmasıdır (Qu ve ark., 1992; Chiang ve ark., 1997). Örneğin, uçucu yağların bazı yan etkileri de bulunmaktadır (Şarer, 1991; Leal-Cardoso ve Fonteles, 1999). Bu maddelerin en büyük tehlikeleri de mutasyon ve/veya kansere

sebepe olabilme riskleridir. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanılmalarının yanı sıra, bunların insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması da son derece önemlidir. Bir kimyasal maddenin böyle bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi, kısa süreli genotoksisite testleri ile mümkün olabilmektedir. Bugün kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin genotoksik veya anti-genotoksik olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan metodlar; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) (Tucker ve ark., 1993), kromozom aberasyonu (KA) (Chromosome Aberration=CA) (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark., 1994) ve mikronükleus (MN) (Heddle ve ark., 1991, Fenech, 2002) testleridir.

Kardeş kromatid değişimi, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimidir (Sonoda ve ark., 1999, Helleday, 2003). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücrelerinde KKD frekansının arttığı ve tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu saptanmıştır (Perry ve Evans, 1975; Carrano ve ark., 1978; Albertini ve ark., 2000). Benzer bir ilişkinin KKD'nin artışıyla *in vivo* tümörlerin oluşumu arasında da olduğu Cheng ve ark. (1981) tarafından bildirilmiştir. KA'nin aksine KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir. Fakat, KKD deneysel çalışmalarda, indikatör test olarak insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (Norppa ve ark., 2006).

KA oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı, lenfositlerdeki anormallik seviyesinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskinin de göstergesi olduğu düşünülmektedir (Bonassi ve ark., 2000; Albertini ve ark., 2000; Bonassi ve ark., 2004, 2005). Yüksek KA frekansı, KA artışını başlatan sebebe bakılmaksızın yüksek kanser riskinin bir göstergesi olabilir, çünkü KA oluşumu DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından da kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Savage, 1993).

MN, asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından ve bir yada birkaç kromozom ya da kromatidin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan esas nükleusun dışında rastlanan küçük nükleuslardır (Surrallés ve ark., 1995). Ayrıca multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ iplikçiklerinde ve sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır (Dellarco ve ark., 1985). Böylece, MN testi ile hem klastojenik hem de aneujenik etkiler belirlenebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark., 1997; Norppa ve Falck, 2003). Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur (Cheng ve ark., 1996, Duffaud ve ark., 1997; Bonassi ve ark., 2007). Ayrıca, Fenech ve ark. (1999)'nın uluslararası işbirliği ile yaptıkları bir araştırmada insanlarda MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça göstermişlerdir.

Çok eski devirlerden beri bilinen ve önemini bugüne kadar hiç kaybetmemiş olan faydalı bitkilerin önemli bir bölümünü *Lamiaceae* familyasında bulunan bitkiler oluşturmaktadır. Bu familyada bulunan bitkiler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığına ilişkin ilk kayıtlara eski çağlardan kalma mezar ve anıtların süslü yazı ve resimlerinde rastlanmaktadır (Baytop 1999).

Stachys annula geleneksel kanser tedavisinde Türk insanları tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (Aksoy ve ark.1988). Glikozid, saponin ve uçucu yağ ihtiva eden *Stachys annula* yapraklarının kaynatılmasından sonra elde edilen yaprak suyu meyve suyu gibi içilmektedir. *Stachys annula*, yaprak ekstraktı *S typhimurium*'un TA100 suşunda sodium azide'in mutajenitesini % 25 azaltmıştır (Karakaya ve Kavas 1999). Yapılan araştırmalarda *Stachy spruneri*'nin α - tokoferol'a karşı antioksidant aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Couladis ve ark. 2003). Bunun yanında bazı *Stachys* türlerinin yaprak ekstraktlarının genotoksik özellik gösterdiği bulunmuştur. *S. recta* ve *S. palustris* kök ekstraktlarının HeLa hücrelerinin proliferasyon indeksini %25 arttırdığı anlaşılmıştır. Ayrıca *S. palustris* kök, gövde ve çiçek ekstraktlarıyla, *S. germanica* çiçek ekstraktları ve *S. byzantia* kök ekstraktlarının

MCF7 hücre dizilerinde %25 üzerinde inhibisyon sağladığı anlaşılmıştır (Háznagy-Radnai ve ark. 2008).

Görüldüğü gibi *Stachys* cinsinden pek çok tür tüm dünyada halk arasında tedavi amaçlı olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Ayrıca bazı türlerin zararlı etkisi olduğu da anlaşılmıştır. Ancak bu genus'ta yer alan ve ülkemize has bir tür olan *Stachys petrokosmos*'la ilgi hiç bir araştırma yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı *Stachys petrokosmos* yaprak ekstraktının insan periferik lenfositlerinde genotoksik veya anti-genotoksik etkiye sahip olup olmadığını metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda in vitro kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile araştırmaktır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Tıbbi ve Aromatik Bitki Ekstraktları ile Yapılan Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları

Küçük şalgam bitkisinden elde edilen yağın, bütül, hidrojen veya hidroksanolle muamele edildiği zaman mutajenik olmadığı fakat elde edilen yağın in vivo olarak oksitlenmesi sonrasında mutajeniteye sebep olabileceği saptanmıştır (Qu ve ark., 1992). Aynı araştırmacılar, Çin’de kadınlarda görülen akciğer kanseri ile yaptıkları çalışmalarda sigaradan başka faktörlerin ve özellikle pişirme sırasında açığa çıkan yağların da etkili olabileceğini ortaya koymuşlardır. Özellikle pişme sırasında açığa çıkan yağların hava kirliliğine neden olabileceği üzerinde durulmuştur. Küçük şalgam ve soya fasulyesinden pişme sırasında açığa çıkan yağlar yoğunlaştırılarak, Salmonella mutasyon denemelerinde, SV50 ileri mutasyon denemelerinde ve fare kemik iliğinde kardeş kromatit değişimleri ve mikronükleus denemelerinde kullanılmış ve genotoksik oldukları bildirilmiştir.

Slamenova ve ark. (2004) *Salvia officinalis* L.’in köklerinden elde ettikleri üç adet diterpen quinon’ların (royleanone–SAR 3, horminone–SAR 26 ve acetyl horminone–SAR 43) sitotoksik ve DNA üzerindeki zarar verici etkilerini tespit edebilmek amacıyla insan kolon kanseri (Caco-2) ve insan karaciğer hücrelerini (HepG2) in vitro koşullarda bu diterpen quinonlar ile muamele etmişlerdir. Çalışılan tüm quinonlar hücrelerde sitotoksik etki göstermelerine rağmen, 1.10a 4 mol/l SAR 26 veya SAR 43 ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde topoizomeraaz 1’in inhibisyonuna bağlı olarak apoptotik nükleus seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Araştırmacılar SAR 3 ile muamele edilen HepG2 hücreleri ve SAR 3, SAR 26 ve SAR 43 ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde ya hiç ya da çok az seviyelerde apoptotik nükleus artışı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Çelik ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada *Thymus kotschyanus* var. *glabrescens*’in klastojenik ve Mitomycin C (MMC)’ye karşı anti-klastojenik etkilerini incelemişlerdir. Bu bitkiden elde edilen ekstraktlar kardeş kromatit değişimini (10^{-2} µl/ml konsantrasyonu hariç) ve kromozom aberasyonlarını kontrol

ve çözücü kontrolle karşılaştırıldığında artırmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte bu bitkiden elde edilen ekstrakt kromozom aberasyonlarına neden olan MMC'nin etkisini azaltmış olduğunu belirtmişlerdir. Diğer yandan bitki ekstraktı MMC ile birlikte kardeş kromatid değişimini pozitif kontrolle karşılaştırıldığında önemli derece artırdığını ileri sürmüşlerdir.

Karioti ve ark. (2007) *Marrubium cylleneum*' un toprak üstü kısımlarından elde edilen ve bugüne kadar doğal ürünler olarak kabul edilmeyen, diterpen olmayan bir labdan ile diterpen olan iki labdan'ı NMR ve MS spektral analiz metotları ile izole etmişlerdir. *M. cylleneum* ve *M. velutinum*'dan elde edilen çeşitli diterpenler çeşitli kanser hücre hatlarına sitotoksik etkileri ve insan periferel kanındaki tek nükleuslu hücrelere immunomodulasyon potansiyel etkileri in vitro olarak test edilmiştir. Sonuç olarak; bazı bileşiklerin lenfositlerde farklı sitotoksik etki gösterdikleri ortaya konulmuştur.

Klormadinon asetat (CMA) sentetik bir progesteron analogudur. Genellikle oral olarak gebeliği önleyici olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmada *Ocimum sanctum*'dan elde edilen çayın CMA'nın insan lenfositlerinde neden olduğu genotoksik zararlarına karşı anti-genotoksik aktivitesi araştırılmıştır (Siddique ve ark., 2008). En yüksek dozda (40 µM) sadece CMA ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromozom aberasyonlarını arttığı, fakat 40 µM CMA ile birlikte ayrı ayrı 1.075×10^{-4} , 2.125×10^{-4} ve 3.15×10^{-4} g/l bitki infüzyonuyla muamele edilen hücrelerde anormal metafaz sayısının sırasıyla % 2.67, % 2.00 ve % 1.67 oranlarına kadar azaldığı saptanmıştır. Kardeş kromatid değişimi de aynı şekilde 40 µM CMA ile muamele edilmiş hücrelerde 6.43 iken bitki infüzyonuyla ayrı ayrı 1.075×10^{-4} , 2.125×10^{-4} ve 3.15×10^{-4} gm l⁻¹ muamele edilen hücrelerde kardeş kromatid değişimi sayısı sırasıyla 3.76, 3.01 ve 2.94 oranlarında azalmıştır. Bitki infüzyonunun kullanılan dozları kromozom aberasyonlarını ve kardeş kromatid değişimlerini muamelesiz grupla karşılaştırıldığında artırmadığı belirtilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda bitki infüzyonunun genotoksik potansiyeli artırmadığı, fakat insan lenfosit hücrelerinde klormadinon asetatın genotoksisitesini düzenleyebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Loizzo ve ark. (2009)'nın yapmış oldukları çalışmada *Salvia leriifolia* (Benth)'nin uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu, kolinesterazı inhibe edici özellikleri ve anti-influmatuvar etkilerini incelemişlerdir. Uçucu yağlar GC ve GC-MS ile analiz edildiğinde ana komponent olarak camphor, 1,8 cineol, camphene ve α -pinene elde edilmiştir. *S.leriifolia* yağları DPPH denemeleriyle LC₅₀ seviyesi olan 2.26 μ l/ml'de anti-oksidan özelliğe sahip olduğu tespit edilirken, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesterazı sırasıyla 0.32 ve 0.29 μ l/ml'de inhibe edici etkisinin olduğu ileri sürülmüştür. Dahası bu bitkiden elde edilen yağ 165 μ g/ml'de LPS'nin üretimini inhibe ettiği görülmüştür. Bu komponentlerin 1000 μ g/ml'de 142BR hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olmadıkları saptanmıştır.

Alkhatib ve ark. (2010) *Marrubium peregrinum*'dan ladanein, scutellarein-5,7,4'-trimethyl eter ve scutellarein-5,6,7,4'-tetramethyl eter olmak üzere üç metilenmiş flavon elde ederek, kemiricilerin lösemili hücrelerinde sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. 20 yaygın Lamiaceae türleri arasında HPLC ile en aktif bileşenin ladanein olduğu görülmüştür. Ladanein 20–40 μ M oranlarında K562, K562R ve 697 insan lösemi hücre hatlarına orta derecede bir aktivite gösterirken, ne MOLM13 ne de insan periferel kanında tek nükleuslu hücrelere karşı toksik etki göstermemiştir. Bu çalışma sonucunda ladanein'lerin türevi olan flavonların anti-lösemik aktiviteye sahip olabileceği anlaşılmıştır.

2.2.Stachys Cinsine Ait Bitkilerin Ekstraktları İle Yapılmış Olan Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları

Başaran ve ark. (1996) yaptıkları çalışmada Türkiye'ye özgü tıbbi bitkilerin genotoksik potansiyelleri *Salmonella typhimurium* mikrozom aktivasyon denemeleri ve alkalın tek hücre jel elektroforezi (COMET) testleri ile araştırılmıştır. Araştırmacılar Stachys ve başka tıbbi bitki cinslerine ait bitkilerden (*Arctium minus*, *Ecballium elatterium*, *Momordica charantia*, *Plantago major*, *Urtica dioica*, *Viscum album*, *Salvia triloba*, *Euphorbia rigida*, *Stachys lavandulifolia*, *Acteoside*, *Abies nordmannia*) elde ettikleri ekstraktların ve bu ekstraktların bazı bileşenlerinin TA98 ve TA100 suşlarında metabolik aktivasyonlu veya aktivasyonsuz olarak mutajenik

olmadıklarını, COMET denemelerin de ise hepsinin negatif kontrol değerlerinin üstünde bir artışa neden olduklarını saptamışlardır. Sadece *Urtica* ve *Euphorbia* türlerinin varlığında DNA zincirlerinde daha az kırıklar olduğu bildirilmiştir.

Karakaya ve Kavas (1999) beslenme alışkanlıklarında değişimler yaparak kanserden bireysel olarak korunma yollarının mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları araştırmada *Urtica sp*, *Stachys annula*, adaçayı, kuşburnunun işlenmemiş veya kaynatılmış özsuları, yaprak ve kurutulmuş tohumları, üzüm pekmezi ve tarhananın, *S. typhimurium* TA 100 suşunda mutajenik olmadığını hatta tüm bu yiyeceklerin *S. typhimurium*'daki sodyum azid'in mutajenitesini azalttığını bildirmişlerdir. Test edilen yiyecekler arasında, işlenmemiş *Urtica sp* (46.32%) ve kuşburnu (44.03%) en yüksek anti-mutajenik etkiyi gösterirken, bu anti-mutajenik etki daha az olarak *Urtica sp* yaprakları (41.25%), ve *Urtica sp* 'nin kaynatılmış özsuyu (37.22%), *Stachys annula* (36.42%), üzüm pekmezi (33.03%) ve tarhana (28.60%) da gözlenmiştir.

Couladis ve ark. (2003) oksijen radikallerinin ve hidrojen peroksidin neden olduğu sitotoksikite ve çeşitli insan hastalıklarındaki doku zararlarının önlenmesinde anti-oksidanların rolünün gittikçe artmakta olduğundan yola çıkarak, bu çalışmada Lamiaceae (Labiata) familyasına ait 21 aromatik bitkinin etanolü ekstraktlarının antioksidan etkilerini in vitro olarak araştırmışlardır. Bu bitkiler arasında yer alan *Salvia ringens*, *Salvia pomifera*, *Stachys spruneri*, *Origanum dictamnus*, *Phlomis lanata*, *Ballota pseudodictamnus*, *Ballota acetabulosa*, *Teucrium polium*, *Calamintha glandulosa* ve *Micromeria graeca* bitkilerinden elde ettikleri ekstraktların α - tokoferolle aynı etkiye sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Amirghofran ve ark. (2006) İran'a özgü 6 tıbbi bitkinin (*Galium mite*, *Ferulago angulata*, *Stachys obtusicaena*, *Cirsium bracteosum* ve *Echinophora cinerea*) metanolü ekstraktlarının anti-neoplastik aktivitesini inceledikleri çalışmada, ekstraktlara maruz bıraktıkları farklı tümör hücrelerinin sitotoksik analizlerini MTT kolorimetrik yöntemle incelemişlerdir. Flow sitometri tarafından apoptotik değişimlere uğrayan hücrelerin yüzde miktarları ve DNA kırıklarının analizleri bu duruma hassas olan hücrelerde uygulanmıştır. Sonuçta ekstraktların tamamının tümör hücrelerinin artışı azalttığı gözlenmiştir. *E. cinerea* ve *C. bracteosum* bitkilerinin

20 µg/ml dozundaki ekstraktları K562 lösemi hücrelerinin bölünmesini en iyi şekilde inhibe ederken, Jurkat hücrelerinin proliferasyon inhibisyonunu ise 39.8 µg/ml dozlarında sırasıyla *G. mite*, *F. angulata* ve *E. cinerea* bitkilerin ekstraktları gerçekleştirmektedir.

Matkowski ve Piotrowska (2006) Avrupa’da doğal olarak yetişen *Lamiaceae* türlerinden elde ettiği metanollü ekstraktların antioksidatif etkilerini in vitro olarak üç yöntemle incelemişlerdir. Araştırmacılar. test edilen bitkiler en güçlü antioksidan etkiye sahip olandan zayıf olana doğru *Leonurus cardiaca*, *Lamium album*, *Marrubium vulgare*, *Stachys officinalis*, *Lamium purpureum*, *Galeopsis speciosa* olarak sıralanmıştır. Lipid peroksidasyonu denemelerinde maksimum inhibisyon *S. officinalis* ve *M. vulgare* ile % 78’e ulaşırken, *Lamium sp.* ve *L. cardiacas* ile % 70’in çok az üstünde olduğu *G. speciosa*’nın ise % 65’e ulaştığını bildirmişlerdir.

Kukic ve ark. (2006) *Stachys* ailesine ait dört endemik tür olan *S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* ve *S. alpina* L. ssp. *dinarica* türlerinin antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Bitkilerden elde edilen ekstraktları toplam antioksidan (TAA) aktivitesi için, 1,1-diphenyl 2-picryl hydrazyl (DPPH) ve OH radikal aktivitesi ve lipid peroxidation (LP) aktivitesini birlikte kullanarak çalışmışlardır. Total fenolik bileşikler arasındaki karşılıklı ilişki TAA ve DPPH radikalleri polifenollerin ana anti-oksidanlar olduğu işaret edilmiştir. Bütün *Stachys* ekstraktları, (*S. plumosa* dışında) yüksek bir anti-DPPH aktivitesi (IC₅₀ 50m g/ml) sergilemişlerdir. Bütün ekstraktlarda 6.25 ile 50 mg/ml arasında değişen oranlarda OH radikalini % 40’tan daha fazla oranlarda inhibisyona uğratmışlardır. Yalnızca *S. plumosa* ekstraktı % 60.67’lik bir oranla 100m g/ml’de maksimum aktivite göstermiştir.

Amirghofran ve ark. (2007) çeşitli tıbbi bitkilerin insan lenfositleri üzerinde apoptotik ve anti-proliferatif etki gösterdiklerini ileri sürerek, İran’a özgü bir bitki olan *Stachys obtusirena*’nın apoptozise neden olan etkisi üzerinde çalışmışlardır. Aynı araştırmacıların in vivo olarak yaptıkları bu çalışmalarda antijenle bağışıklık kazandırılmış farelerde antikor üretimi ve hipersensitivite üzerine *S. obtusirena*’nın metanollü ekstraktlarının etkisini araştırmışlardır. Hipersensitivite ve antikordan elde edilen cevaplara göre hem muameleli farelerde hem de muamelesiz farelerde her iki

parametrenin de doza bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Lenfositlerdeki in vitro çalışmalarda da ekstraktların (³H)-timidin cevabında da doza bağlı olarak bir azalma olduğu kaydedilmiştir. Sonuçta araştırmacılar *S. obtusicrena*'nın hem hücresel hem de humoral bağışıklık sistemini inhibe ettiği ve bu etkininde lenfositlerde apoptosise neden olduğunu bildirmişlerdir.

3.MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada test maddesi olarak Lamiaceae familyasına ait olan *Stachys petrokosmos* (Sp) yaprak ekstraktı, materyal olarak da sigara içmeyen yaşları bir birine yakın sağlıklı bir erkek (23 yaşında) ve bir bayandan (22 yaşında) alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1.*Stachys petrokosmos* (Sp)

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan *Stachys petrokosmos*, 5-10 cm boyunda, çalı altı form olan, sarımsı yeşil renğinde ilkbahar yaz döneminde, 900-1100 m yüksekliklerde, kayalık yerlerde yetişen Türkiye'ye has endemik bir türdür.

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Classis : Magnoliopsida
Subclassis : Asteridae
Ordo : Lamiales
Familya : Lamiaceae (Labiatae)
Genus : Stachys
Spesies : Stachys petrokosmos

Genusu olan *Stachys* cinsi (*Lamiaceae*) kozmopolit olup, 200 kadar takson içerir ve ülkemizde 121 taksonla temsil edilir. Tür seviyesinde endemizm oranı %43,4 (33/76), alttür seviyesinde endemizm oranı %36,7 (11/30) ve varyete seviyesinde %40 (6/15) olduğu görülmektedir. *Stachys* genusunda endemizm oranı %40'tir. Avrupa, Asya, Afrika, Avustralya ve Kuzey Amerika'ya yayılmıştır. Yüzyıllar boyunca hemen hemen her kıtada olmak üzere tüm dünyada halk arasında

akla gelen her hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. En önemli bileşenleri, Betulinic-acid, D-Comphor, Delphinidin, Hyperoside, Manganese, Oleanolic acid, Rosmaniric-acid, Rutin, Urcolic acid ve tanendir. *Stachys* cinsi halk arasında anti-bakteriyal, anti-piretik, anti-septik, anti-spazmodik (kas gevşetici) olarak bilinir ve karın gazı giderici, idrar söktürücü, ateş düşürücü, tansiyon düşürücü, mideyi kuvvetlendirici, kanamayı durdurucu, kurt dökücü ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır.

3.1.1.2.Metanol

Bu çalışmada kullanılan Sp yapraklarının ekstrakte edilmesinde (Merck) kullanılmıştır.

3.1.1.3.Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (cat. no. F5023), hücre kültürü için kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki bileşikler verilen miktarlarda bulunmaktadır:

MEM JOKLIK with	
Non essential Amino Acids.....	850 ml
Fetal Calf Serum	150 ml
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin M.....	2.5 mg

Bu medyum steril kültür tüplerine 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır.

3.1.1.4.Kolşisin (Kolkisin)

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (kolşisin) (Sigma Cat. No. C9754) kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği saf su içerisinde

hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir.

3.1.1.5.Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidestile su içinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı bir cam kapta buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar alınıp 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.1.6.Fiksatif

KKD ve KA için kullanılan fiksatif, 1 kısım glacial asetik asit'in 3 kısım metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır. MN için ise iki farklı fiksatif kullanılmıştır. İlk fiksatif 1 kısım glacial asetik asit 5 kısım metanol ile karıştırıldıktan sonra 1/1 oranında %0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Diğer fiksatifler ise NaCl ilave edilmeden kullanılmıştır. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.1.7.5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd)

BrdUrd Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) temin edilmiştir. BrdUrd eriyiği bidistile su içerisinde hazırlanmış, daha sonra por çapı 0.2 µm olan membran filtre (Sartorius marka) ile steril edilmiştir. Bu eriyikten kültür tüpleri içerisindeki kromozom medyumuna 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.1.1.8.Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

KKD'ni incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır. Bu tampon eriyik, tampon A ve

tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır. Hazırlanışı:

Tampon A:11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B:14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

3.1.1.9.Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

Bu eriyik ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC eriyiğini hazırlamak için 11.05 gr trisodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 21.9 gr NaCl kullanılmıştır. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözülmüş, daha sonra aynı kaba aktararak birbirleriyle karıştırılmış ve üzerlerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırladığımız bu stok eriyik 5xSSC'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. Deneyimizde, bu stoktan 20 ml alıp üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak elde edilen 1x SSC kullanılmıştır.

3.1.1.10.Giemsas

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

3.1.1.11.Entellan

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

3.1.1.12.Nitrik Asit (HNO_3)

Lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.1.1.13.Mitomycin C (MMC)

S9mix yokluğunda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MMC (Sigma, M0503) suda eritilerek hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. MMC stok çözeltisi çalışma başlangıcında taze olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. MMC kültür tüplerine 0.2 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.1.1.14.Cyclophosphamide (Cyp) (Sigma)

S9mix varlığında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Cyp suda çözülerek hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Cyp kültür tüplerine 28 µg/ml olacak şekilde S9mix ile beraber ilave edilmiştir.

3.1.1.15.RPMI1640 Besi Yeri

Metabolik aktivatör (S9mix) varlığında muameleden sonra test maddelerinin uzaklaştırılması sırasında kullanılmıştır. Hücreler RPMI1640 besiyeri ile yıkanarak S9mix ve test maddesi uzaklaştırılmıştır.

3.1.2.Kullanılan Deney Ekipmanları**3.1.2.1.Hassas Terazi**

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.2.Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2.3.Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine Olympus marka mikroskopta dijital olarak çekilmiştir.

3.1.2.4.İnkübatör

Hücrelerin 37°C’de inkübe edilmesi için Dedeoğlu marka inkübatör kullanılmıştır.

3.2.Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamlar 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

3.3.Ekstraksiyon

Stachy petrokosmos bitkisi nem olmayan bir ortamda kurutulmuştur. Kuruyan bitki yapraklarından 5 gr tartılarak 100 mL MeOH ile ekstrakte edilmiş ve 15 dk. ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Daha sonra tekrar 100 mL MeOH ilave edilerek 15 dakika daha ultrasonik banyoda bekletilmiş, ekstrakt filitre edilerek vakumla uçurma işlemi uygulanmıştır. Geriye kalan ekstrakt MeOH (10 ml) ile seyreltilerek test maddesi olarak kullanılmıştır.

3.4.Genotoksisite Çalışmaları

3.4.1.Metabolik Aktivatör Yokluğunda Test Metodu

3.4.1.1.Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

3.4.1.1.(1) Hücre Kültürünün Yapılması ve Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi

Aynı yaş grubunda, sağlıklı ve sigara içmeyen insanlardan alınan (1 bayan, 1 erkek) 1/10 heparinize edilmiş periferik kanın 0.2 ml'si kromozom medyumuna (Biochrom Cat. No F5023) ilave edilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Kanın ilavesinden hemen sonra son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde steril 5-bromo-2-deoksiuridin ilave edilerek kültür 37°C'deki inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir. Test maddesinin ön çalışma sonucu belirlenen non toksik 3 konsantrasyonu (1.5, 3.0 ve 6.0 µl/ml) kültür ortamına kültürün başlangıcından 24 ve 48 saat sonra ilave edilmiş ve hücrelerin test maddesiyle 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 µg/ml) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 devir/dk (rpm)'da 15 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun olmayan preparatlar hazırlanmaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 10 dk. hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir.

Sürenin sonunda tüpler 15 dk. 1200 devir/dk'da santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekir. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine 75 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

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

3.4.1.1.(2) Preparatların Boyanması

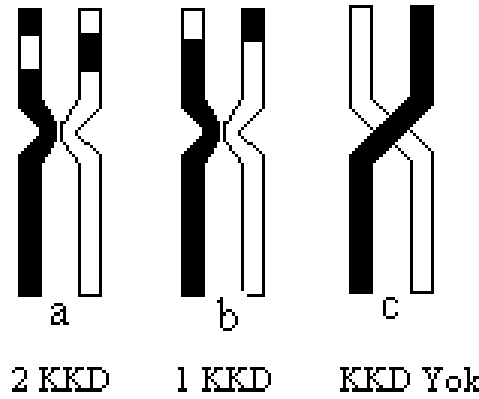
Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (sister chromatid differentiation=SCD) sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtünecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatılmıştır. Işınlama eriyiği, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Bu şekilde ince bir tabaka halinde

ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk. ışınlanmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58-60°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce %5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır. %5'lik Giemsa boyası, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa'nın karıştırılarak üzerleri 85 ml saf su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzölmüştür. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC eriyiğinden alınarak direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 20 dk. boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürede sağlanmıştır). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.4.1.1.(3) Mikroskobik İnceleme

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

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (2 kişiden toplam 50 hücrede) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990). Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiş (Şekil 3.1.a), uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.1.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.1.c).



Şekil 3.1.Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).

Sp yaprak ekstraktının DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile PI bulunmuştur. Bunun için tesadüfi seçilmiş 100 hücre incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkarak PI şu şekilde hesaplanmıştır:

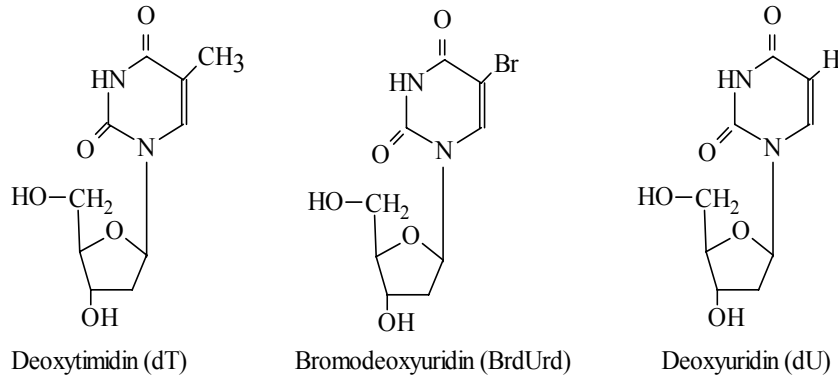
$$PI = (1 \times M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3) / 100$$

M_1 : 1. Mitozdaki hücre sayısı

M_2 : 2. Mitozdaki hücre sayısı

M_3 : 3. Mitozdaki hücre sayısı

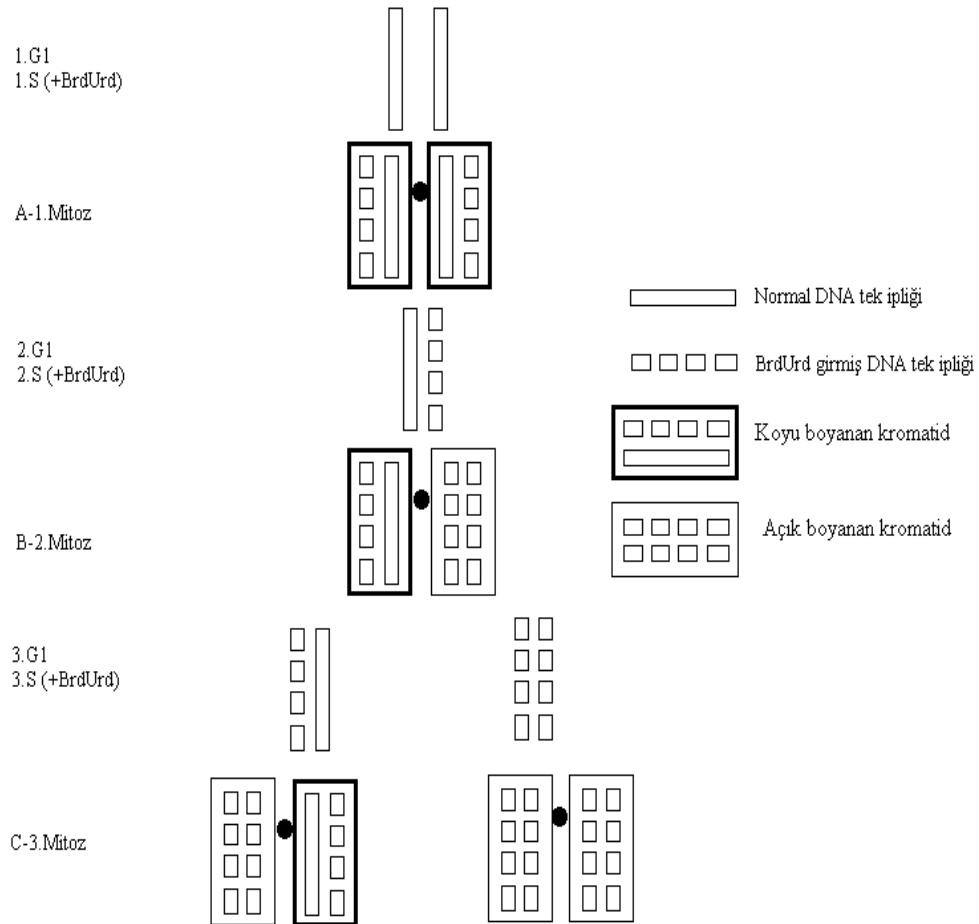
Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990): BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analoğu olan bileşiklerdir (Şekil 3.2). BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları benzen halkasındaki 5.C atomuna dT'de CH_3 , BrdUrd'de Br ve dU'da H atomunun bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.



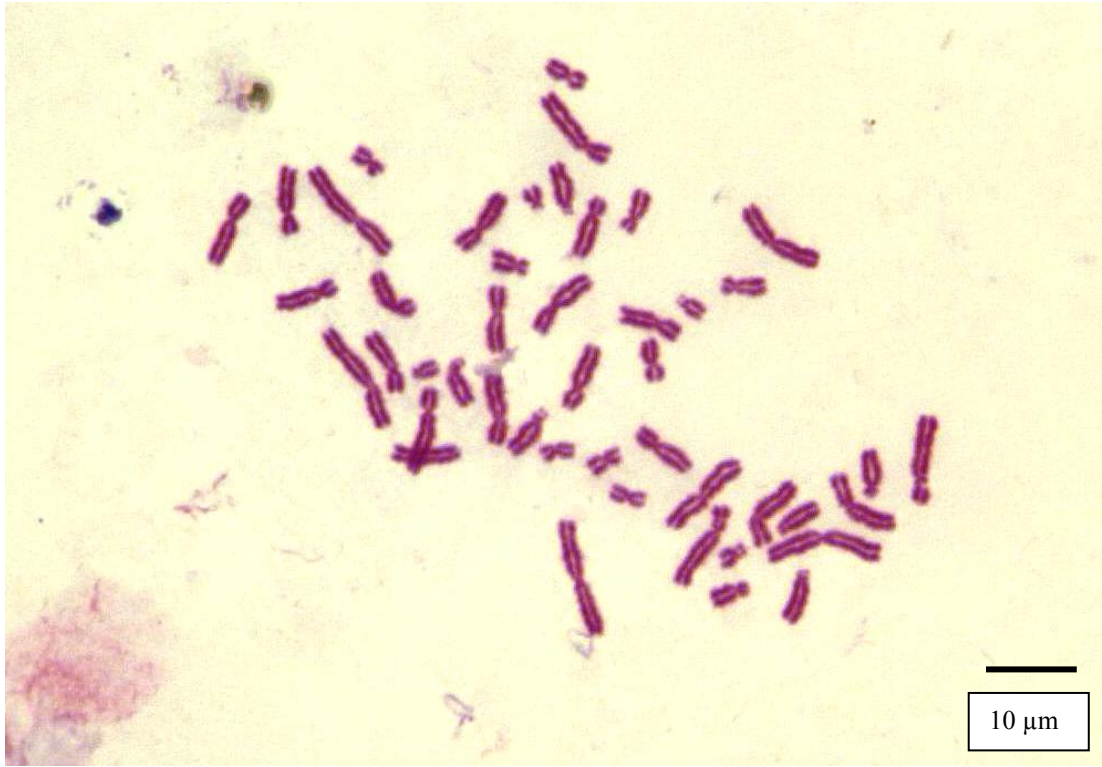
Şekil 3.2.Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan dolayı kültür ortamına BrdUrd koyduğumuzda hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd'ni alacaktır. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (BrdUrd/dT:dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler 1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3.A ve Şekil 3.4). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'lu ortamda 2.S fazı) timin ihtiva eden polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (BrdUrd/dT) oluşturacaktır. BrdUrd'lu ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdUrd ihtiva ettiklerinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında hücrenin tüm kromozomlarının (BrdUrd/dT:BrdUrd/BrdUrd) kromatidlerinden biri koyu diğeri ise açık renkte boyanacaktır. Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. (Şekil 3.3.B ve Şekil 3.5). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'lu ortamda 3.S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir

kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğer kromatidin bir ipliği BrdUrd'li diğer ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, bir kromatidi de açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd:dT/BrdUrd). İşte böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğer kromatidi de koyu renkte boyanacaktır. Bu hücrelerde 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3.C ve Şekil 3.6). İşte bu şekilde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, bu hücrelerin 100 hücre içindeki sayısı saptanmış, bundan da yukarıda belirtilen formüle göre proliferasyon indeksi (PI) hesaplanmıştır.



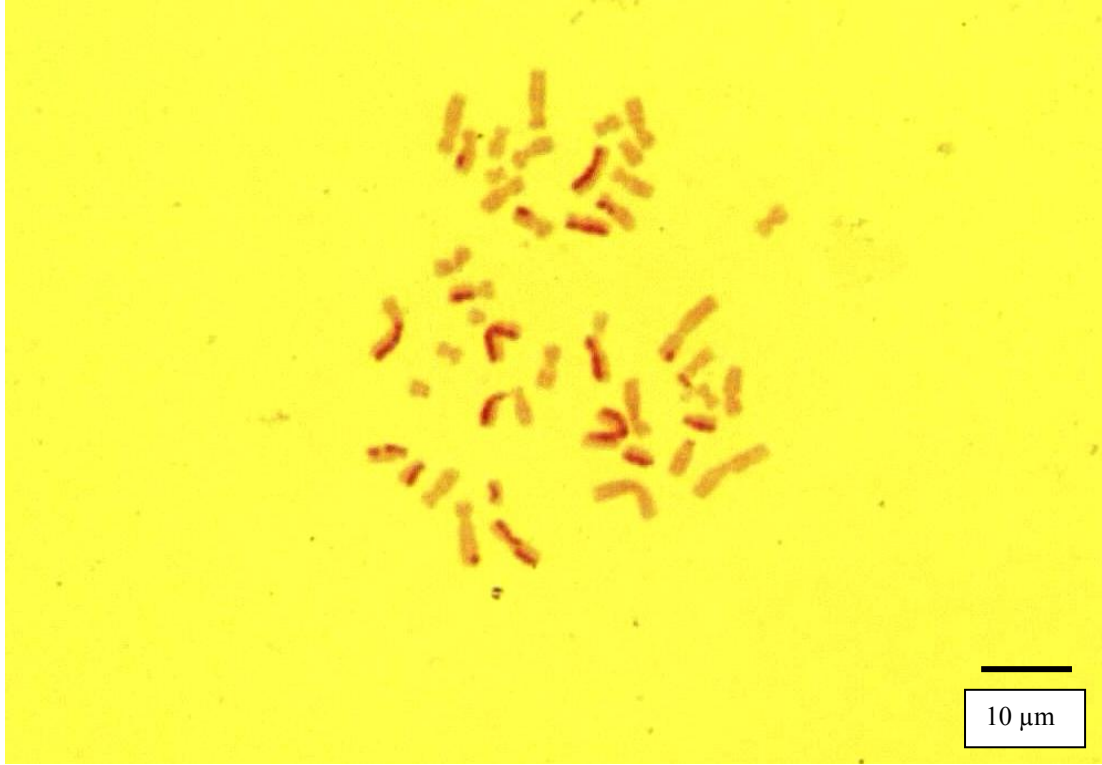
Şekil 3.3.BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During 1985'e göre Topaktaş ve Speit 1990'den).



Şekil 3.4.Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.



Şekil 3.5.İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.



Şekil 3.6.Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (2 kişiden toplam 200 hücre) KA'ni saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır (Paz-y-Mino ve ark., 2002). İncelenen bu 100 hücre içinde hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliklerinin (yapısal KA/hücre) sayısı ile anormallik içeren hücrelerin yüzdesi bulunmuştur. Bu çalışmada sayısal kromozom anormallikleri oluşmadığı için değerlendirilmemiştir.

Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gaplar ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar arasındaki farklar, Kauderer ve ark. (1991)'nın bildirdiğine şu şekilde ayırt edilmiştir: Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir

kromatidin genişliğinden daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları ayrı ayrı saptanmıştır. Mace ve ark. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarında göstermişlerdir. Bu çalışmada kromatid kırığı ve tek kol birleşmesi gibi anormallikler kromatid tipi anormallik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kromozom kırığı, sister union, kromatid değişimi, halka kromozom ve disentrik kromozom oluşumu gibi anormallikler de kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir.

Sp yaprak ekstraktının mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile mitotik indeks bulunmuştur. Bunun için her kişiye ait preparatlardan toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasındaki metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. 3 bin hücre içerisinde metafazların oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks saptanmıştır.

3.4.1.2.Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

3.4.1.2.(1) Hücre Kültürünün Yapılması ve Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi

Mikronukleus sayısını saptamak için Fenech (2000) ve Kirsch-Volders ve ark. (2003) tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki bayandan alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Hücre kültürü inkübatörde $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat için inkübe edilmiştir.

SP yaprak ekstraktının etkisini incelemek için, daha önce belirlenmiş olan konsantrasyonlardaki (1.5, 3.0 ve 6.0 $\mu\text{l/ml}$) Sp yaprak ekstraktı, kültür tüplerine ilave edilerek hücrelerin 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. İki nukleuslu hücre oluşumunu sağlamak için de kültür bitimine 24 saat kala bütün tüplere 6 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde sitokalsin B (Cytochalasin B, Sigma Cat. No. C6762)

ilave edilmiştir. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak MMC kullanılmıştır. MMC tüplere 0.2 µg/ml olacak şekilde verilmiştir. Kültür süresi olan 68. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm’de 15 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml’lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C’de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konmuştur. Hücreler 5 dk. hipotonik eriyikte 37°C’de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk. 1200 rpm’de santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. İlk fiksatif 1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol karışımının 1/1 oranında %0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm’de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmış ve ilk fiksatiftan farklı karışımlar kullanılmıştır (1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol). 3. fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekir. Her fiksatif ilavesinden sonra santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine farklı alanlara 1’er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 4-5 damla) hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.4.1.2.(2) Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanmış %5'lik giemsa boyası ile boyanmıştır. 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılmış üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak %5'lik Giemsa boyası hazırlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzölmüştür. Kuruduğundan emin olunan preparatlar direkt olarak boya içerisinde konmuş ve yaklaşık olarak 15 dk. boya içerisinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

3.4.1.2.(3) Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda 40'lık objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). Bu incelemeler sırasında her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 2000 iki nukleuslu (binökleer) hücre incelenmiş, bu iki nukleuslu hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca aynı kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 tane hücre sayılmış, bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nukleuslu olanların sayıları saptanmıştır (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). Bu orandan yola çıkarak Nukleus Bölünme İndeksi (NBI) (Nuclear Division Index = NDI) hesaplanmıştır (Fenech, 2000). Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

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

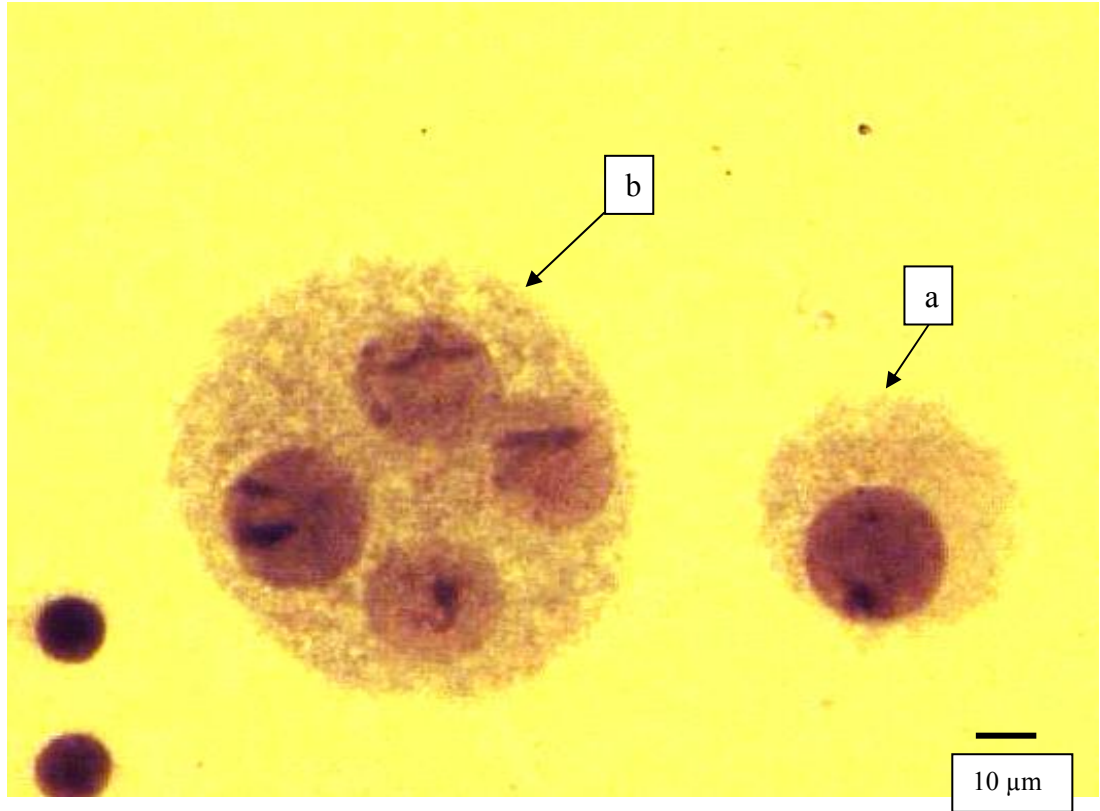
N_1 : 1 nukleuslu hücre sayısı

N_2 : 2 nukleuslu hücre sayısı

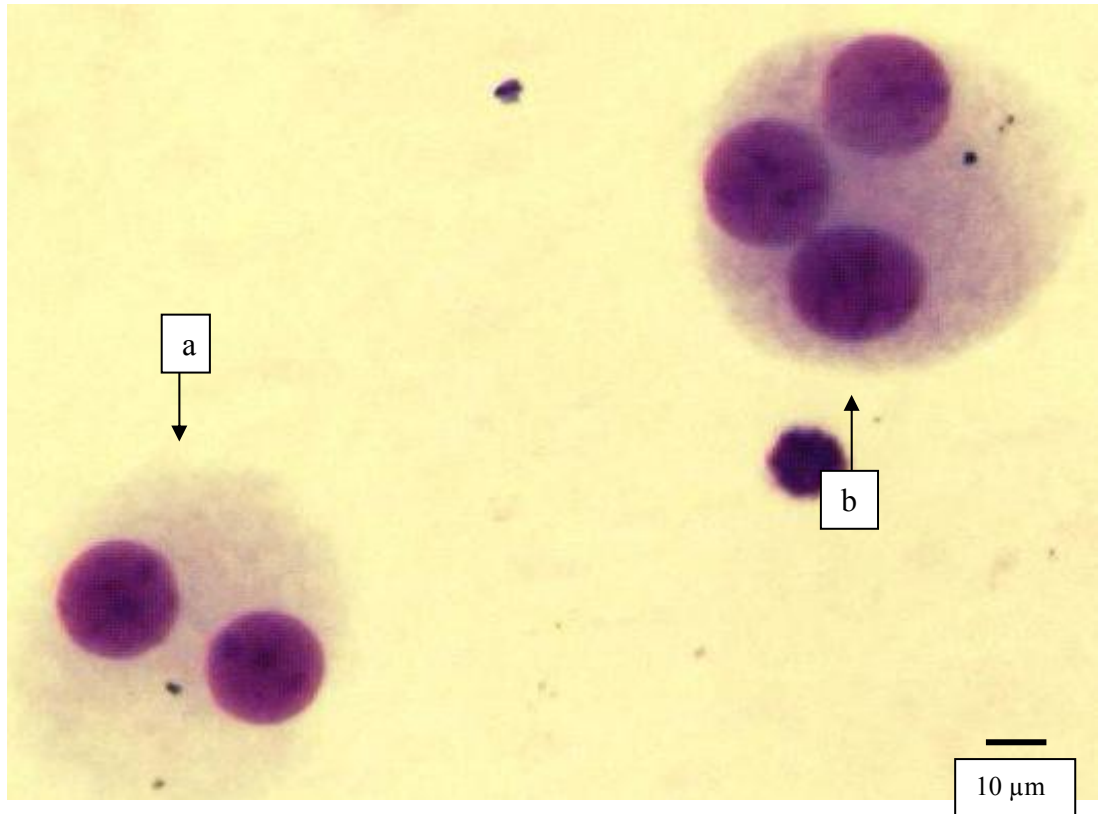
N_3 : 3 nukleuslu hücre sayısı

N_4 : 4 nukleuslu hücre sayısı

n : Toplam hücre sayısı



Şekil 3.7.Bir (a) ve dört (b) nükleus içeren hücreler.



Şekil 3.8.İki (a) ve üç (b) nükleus içeren hücreler.

3.4.2.Metabolik Aktivatör Varlığında Test Metodu

Metabolik aktivatör (S9mix) olarak 3-methylcolanthrene ile indüklenmiş sıçan karaciğer enzimleri (S9) kullanılmıştır (Maron ve Ames, 1983).

3.4.2.1.S9 ve S9mix'in Hazırlanması

Mısır yağında eritilen 3-Methylcolanthrene 80 mg/kg konsantrasyonunda olacak şekilde mısır yağında eritilerek sıçanlara karın zarı yoluyla (ip) verilmiştir. Sıçanlar 5 gün sonra boyunları kırılarak öldürülmüş ve karaciğerleri alınmıştır. Çalışmanın bütün aşamaları 0-4°C'de steril ortamda ve steril ekipmanlarla yapılmıştır. Çıkarılan taze karaciğer darası alınmış steril petri kabına konulmuş, tartılmış ve her bir gramına 1 ml olacak şekilde soğuk 0.15 M KCl ilave edilmiştir. Sıçan karaciğeri yaklaşık 10-15 gr civarındadır. Karaciğer soğuk KCl ile birkaç defa yıkanmıştır. KCl ile yapılan yıkama, steril doku eldesi ve hemoglobinin uzaklaştırılması için gereklidir. Hemoglobin, sitokrom P450 enzimlerinin aktivitelerini yok edebilir. Yıkanan karaciğer, 3 ml/gr olacak şekilde 0.15 M KCl içeren bir kaba aktarılmış, steril makas ile dilimlenmiş ve homojenize edilmiştir. Homojenat 9000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant (S9 fraksiyonu) başka bir tüpe alınmıştır. Steriliteden şüphelenilmesi durumunda sterilite kontrolü yapılabilir. Sterilite kontrolü için histidin-biyotin içeren MGA (minimal glikoz agar) besi yerine ekim yapılır. Taze S9 fraksiyonları 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine paylaştırılmıştır. -20°C'de dondurulmuş ve -80°C'de saklanmıştır. Genotoksisite çalışmaları için S9 fraksiyonu gerekli olduğunda, donmuş S9 fraksiyonu oda ısısında çözölmüş ve kuru buz üzerinde korunmuştur. S9mix ise, S9 çözöldüğü anda aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

Sıçan karaciğer S9 fraksiyonu	2.0 ml
MgCl ₂ (8 mM)-KCl (33 mM) tuzları	0.25 ml
G-6-P	0.045 gr
NADP	0.102 gr
0.2 M Fosfat buffer	6.25 ml

Steril saf su 11.5 ml (toplam 20 ml'ye tamamlanır). Her kültür tüpüne bu karışımdan 0.5 ml konmuştur.

3.4.2.2.KKD ve KA Yöntemi

Aynı yaş grubunda, sağlıklı ve sigara içmeyen insanlardan alınan (1 bayan, 1 erkek) periferik kanın 0.2 ml'si kromozom medyumuna (Biochrom Cat. No F5023) ekilmiştir. Kanın ilavesinden hemen sonra son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde steril 5-bromo-2-deoksiuridin ilave edilerek kültür 37°C'deki inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir. Kültürün 48.saatinde kültür ortamına Sp yaprak ekstraktının belirlenen toksik olmayan üç dozu ile birlikte S9mix ilave edilmiş ve hücrelerin bu karışımla 3 saat muamele olması sağlanmıştır. Üçüncü saat sonunda kültürdeki hücreler RPMI1640 besiyeri ile 2 defa yıkanmış, S9mix ve Sp yaprak ekstraktının uzaklaşması sağlanmıştır. Son yıkamadan sonra tüpteki hücrelere BrdUrd ile tamamlanmış taze besi yeri ilave edilmiş ve hücrelerin 72.saate kadar inkübasyonları sağlanmıştır. Süre bitiminde işlemler daha önce anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.4.2.3.MN Yöntemi

Sağlıklı bir bayan ve bir erkekte alınan periferik kan kromozom medyumuna ekilerek 37°C'de 68 saat inkübe edilmiştir. Kültürün 44.saatinde non-toksik konsantrasyonlardaki test maddesi ve S9mix kültür ortamına ilave edilmiş ve hücrelerin 3 saat boyunca bu kimyasallarla muamele olması sağlanmıştır. Üçüncü saat sonunda kültürdeki hücreler RPMI1640 besiyeri ile 2 defa yıkanarak S9mix ve Sp'nin uzaklaşması sağlanmıştır. Son yıkamadan sonra tüpteki hücrelere cytochalasin B ile tamamlanmış taze besi yeri ilave edilerek hücrelerin 68.saate kadar inkübasyonları sağlanmıştır. Süre bitiminde işlemler daha önce anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.5.Anti-genotoksisite Çalışmaları

Anti-genotoksik çalışmaları Sp yaprak ekstraktının belirlenen üç dozunun metabolik aktivatör yokluğunda MMC'nin etkisini inhibe edip etmediğinin,

metabolik aktivatör varlığında da cylophosphamide'nin (CP) etkisini inhibe edip etmediğinin araştırılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Alınan kanlar kültür tüplerine ekildikten sonra S9mix yokluğunda MMC, S9mix varlığında CP kültür tüplerine ilave edilmiş ve bunlarla birlikte Sp yaprak ekstraktı verilerek hücrelerin bu kimyasallarla muamele olmaları sağlanmıştır. Bitki ekstraktının anti-mutajenik etkisi söz konusu ise MMC veya CP'nin mutajenik etkileri azalacak ve bu hazırlanacak preparatlarda saptanabilecektir.

3.6.Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraflar Olympus marka trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesinde 1000 büyütmede çekilmiştir. Daha önce 1., 2., ve 3. mitozu geçiren hücrelerin kromozomlarının, bazı ilginç KA'larına ait örneklerin, iki nukleuslu hücrelerden mikronukleusa sahip olanların ve bir, iki, üç ve dört nukleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir. (Olympus CX31RTSF; 7,1 Megapixel).

3.7.İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda muameleli gruplardan elde edilen KKD, KA, MN, NBI, PI ve MI değerleri ile kontrol, çözücü ve pozitif kontrollerin değerleri arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-testi ile araştırılmıştır.

Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılmış, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.

Ayrıca mikroskobik incelemelerden elde edilen sonuçlar çizelge ve grafikler halinde verilmiştir.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Bulgular

4.1.1.Metabolik Aktivatör Yokluğunda (S9mix) Yapılan Çalışmaların Sonuçları

4.1.1.1.Metabolik Aktivatör Yokluğunda (S9mix) Stachys petrokosmos (Sp) Yaprak Ekstraktının KKD Üzerindeki Etkisi

Stachys petrokosmos yaprak ekstraktının 3 farklı konsantrasyonu (1.5, 3.0 ve 6.0 µl/ml) ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde saptanan ortalama kardeş kromatid sayısı (KKD/Hücre) çizelge 4.1’de görülmektedir. Sp yaprak ekstraktı, 24 saatlik muamele süresinde sadece en yüksek konsantrasyonda, 48 saatlik muamele süresinde ise en yüksek iki konsantrasyonda KKD sayısını hem kontrole hem de çözücü kontrole nazaran artırmıştır (Şekil 4.1). Bu artışın 24 saatlik muamele süresinde doza bağlı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2). Fakat Sp yaprak ekstraktı MMC’nin mutajenik etkisini azaltmamıştır. Özellikle 48 saatlik muamele sürelerinde Sp yaprak ekstraktı MMC’nin KKD sayısı üzerindeki etkisini doza bağlı bir şekilde düşürmesine rağmen MMC ile mukayesede istatistiki bakımından önemli olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.3). Bu çalışmada bilinen mutajen olarak kullanılan MMC KKD sayısını oldukça fazla artırmıştır (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.1.S9mix yokluğunda değişik dozlarda *Stachys petrokosmos* (Sp) yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı

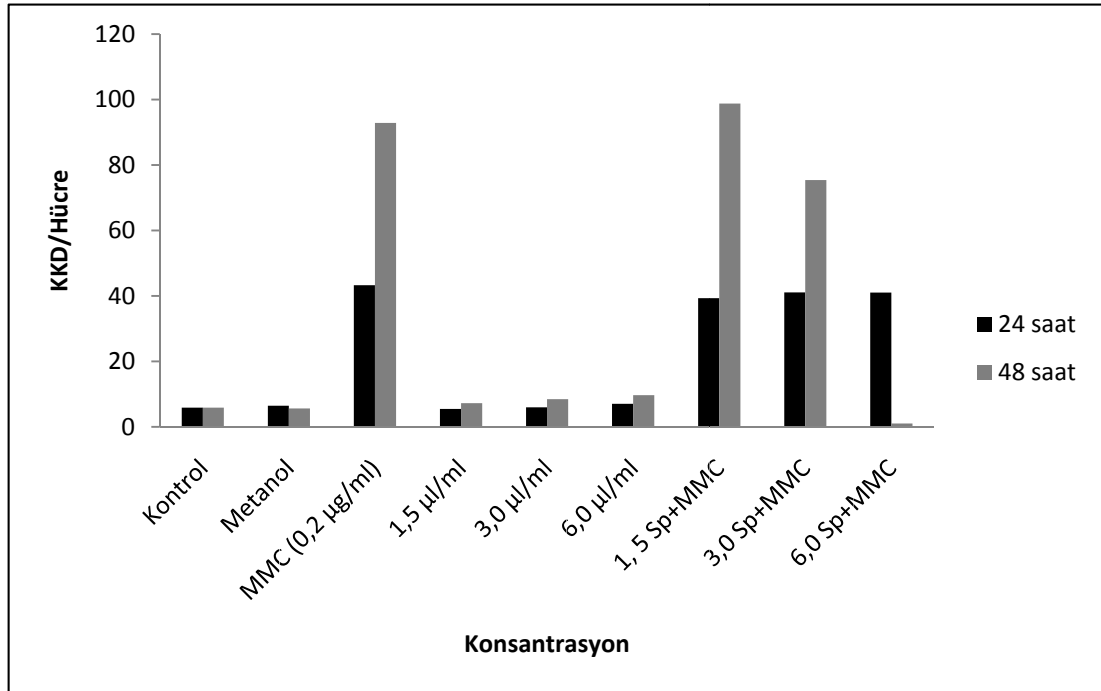
Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon $\mu\text{l/ml}$	Min-Max KKD	KKD/Hücre $\pm$ SE
Kontrol	-	-	1-16	5.84 $\pm$ 0.72
Metanol	24	6.0	2-16	6.46 $\pm$ 0.70
MMC	24	0.2 $\mu\text{g/ml}$	13-64	43,29 $\pm$ 1,79
Sp Eks.	24	1.5	1-12	5,48 $\pm$ 0,48
“	24	3.0	1-13	5,96 $\pm$ 0,12
“	24	6.0	2-14	7,06 $\pm$ 0,02 a2b1
Sp Eks.+MMC	24	1.5 Sp+MMC*	21-65	39,29 $\pm$ 1,66 a1b1
	24	3.0 Sp+MMC*	16-64	41,09 $\pm$ 1,69 a1b1
	24	6.0 Sp+MMC*	1-63	41,00 $\pm$ 2,52 a1b1
Metanol	48	6.0	1-15	5,62 $\pm$ 0,14
MMC	48	0.2 $\mu\text{g/ml}$	53-121	92,88 $\pm$ 2,32
Sp Eks.	48	1.5	2-17	7,24 $\pm$ 0,24
“	48	3.0	1-20	8,46 $\pm$ 0,22 a1b1
“	48	6.0	2-22	9,68 $\pm$ 0,32 a1b1
Sp Eks.+MMC	48	1.5 Sp+MMC*	60-127	98,80 $\pm$ 2,36 a1b1
	48	3.0 Sp+MMC*	52-133	75,42 $\pm$ 3,34 a1b1
“	48	6.0 Sp+MMC*	--	0,0 $\pm$ 0,0 ⁺

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli;

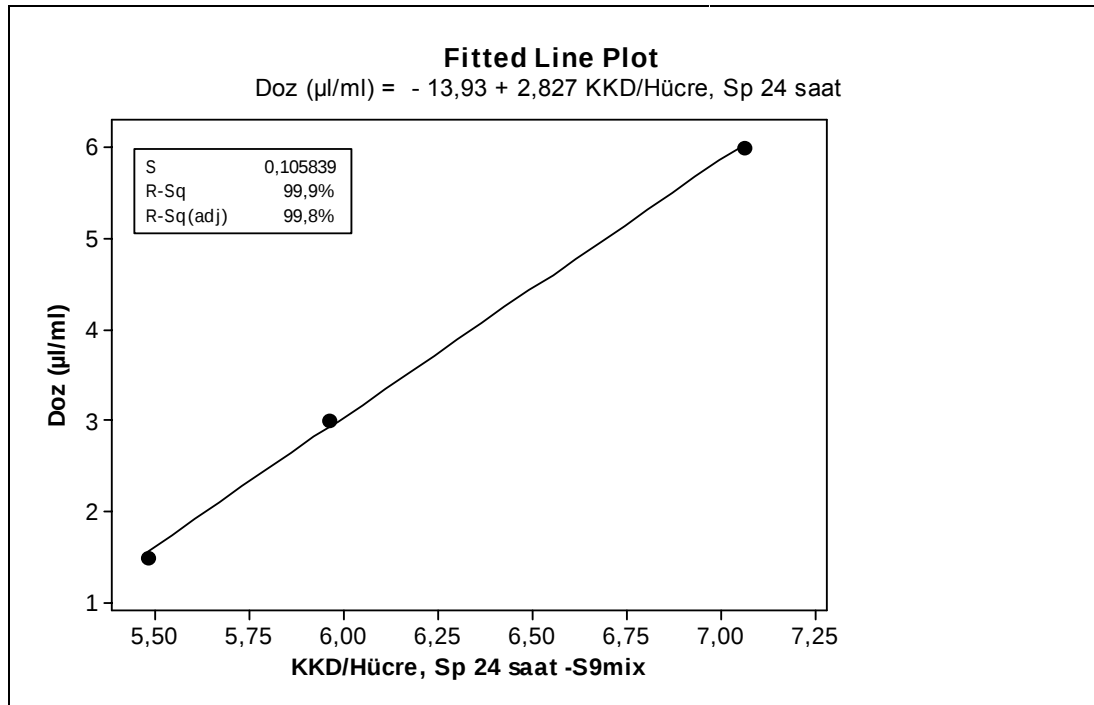
c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli, 1: $P \leq 0.05$; 2: $P \leq 0.01$; 3: $P \leq 0.001$

*MMC (Mitomycin C): 0.2 $\mu\text{g/ml}$

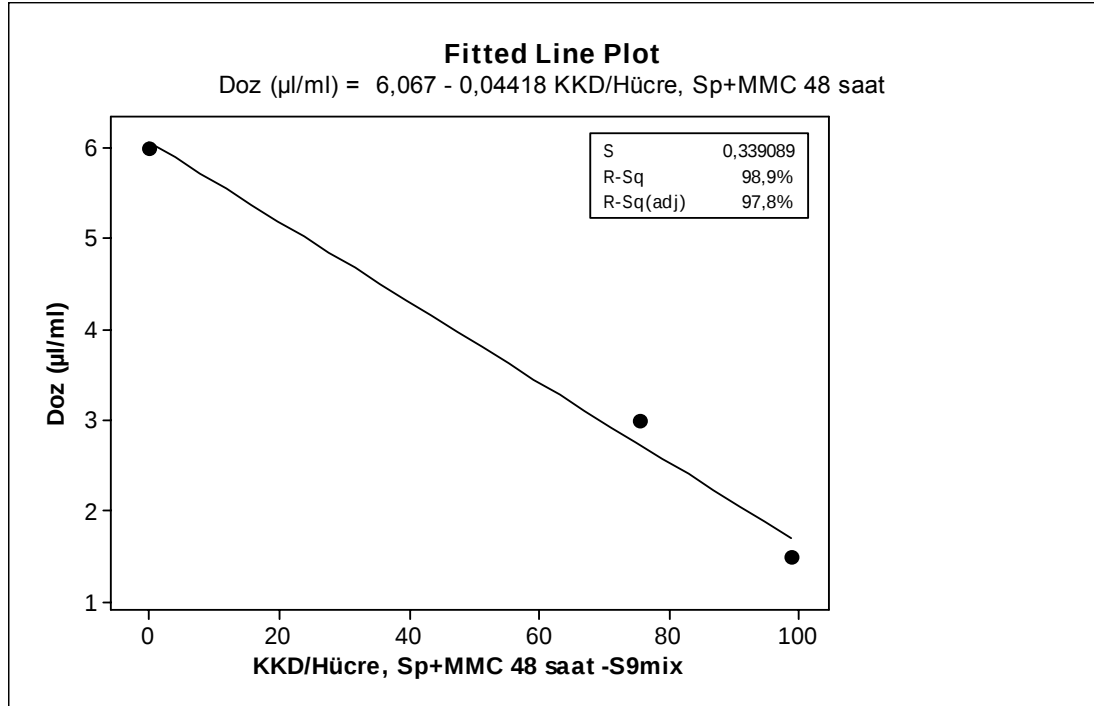
⁺Yüksek sitotoksiteden dolayı değerlendirilememiştir



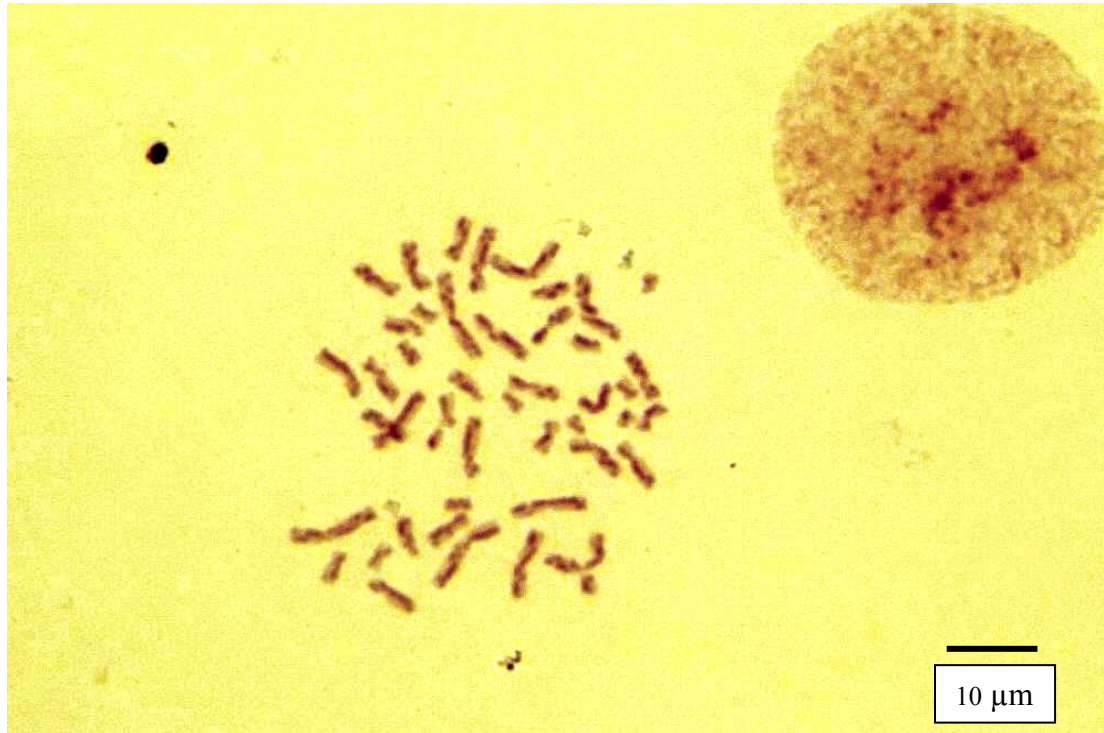
Şekil 4.1.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD/Hücre



Şekil 4.2.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD/hücre sayısının doza bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.02).



Şekil 4.3.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KKD/Hücre sayısının doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P < 0.05$).



Şekil 4.4.0.2 µg/ml dozunda MMC ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde indüklenmiş KKD sayısı

4.1.1.2.S9mix Yokluğunda Sp Yaprak Ekstraktının Kromozom Anormalliği (KA) Oluşumu ve Anormal Hücre (AH) Sayısı Üzerindeki Etkisi

Sp yaprak ekstraktı kromozom yapı anormalliklerini her iki muamele sürelerinde hem kontrola hem de çözücü kontrola nazaran artırmamıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5). Sp yaprak ekstraktı 24 saatlik muamele süresinde en yüksek dozda ve 48 saatlik muamele süresinde de en yüksek iki dozda MMC'nin etkisini azalttığı saptanmıştır. Aynı şekilde Sp tüm dozlarda ve muamele sürelerinde anormal hücre yüzdesini artırmazken (48 saatlik muamele sürelerinde 3.0 µl/ml'lik doz hariç) MMC'nin etkisini azalttığı saptanmıştır (Şekil 4.6). 24 saatlik muamele süresinde bu düşüş doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.7).

Sp ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kromatid tipi anormalliklerden özellikle kromatid kırığı (Şekil 4.8) en fazla gözlenen anormallikler arasında sayılabilir. Kromozom tipi anormalliklerden özellikle kromozom kırığı (Şekil 4.9) ve fragment (Şekil 4.10) gibi yapısal kromozom anormalliklerine rastlanmıştır. Bu çalışmada *Stachys petrokosmos* yaprak ekstraktı ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde sadece birkaç hücrede poliploidi (Şekil 4.11) gözlenmiş ve dolayısıyla Sp'nin kromozom sayı anormalliğini artırmadığı saptanmıştır.

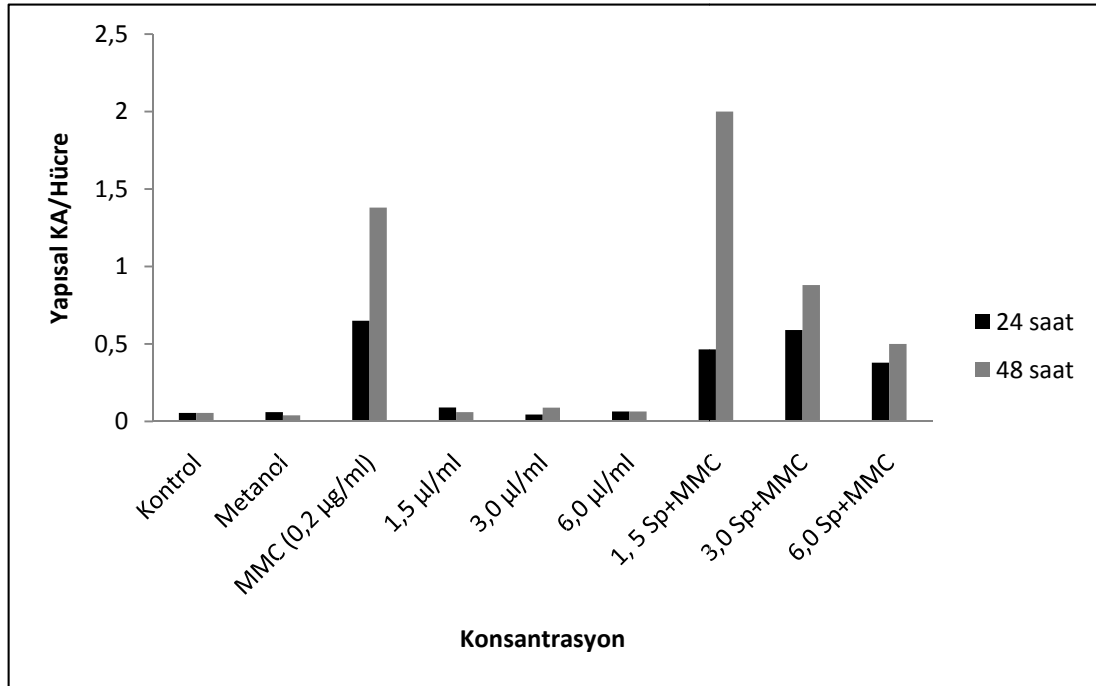
Çizelge.4.2.S9mix yokluğunda değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde yapısal kromozom anormalliği (KA) ve anormal hücre yüzdesi (AH)

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantras. (µl/ml)	Anormallik çeşitleri		Yapısal KA/Hücre±SE ⁺	Anormal Hücre±SE (%) ⁺
			Kromatid Tipi	Kromozom Tipi		
Kontrol	-	-	4	7	0,055±0,015	4,50±1,50
Metanol	24	6.0	7	5	0,060±0,010	5,50±0,50
MMC	24	0.2 µg/ml	87	43	0,650±0,020	49,0±3,00
Sp Eks.	24	1.5	8	5	0,065±0,020	6,00±1,00
"	24	3.0	4	5	0,045±0,005	4,00±1,00
"	24	6.0	10	2	0,060±0,005	5,95±0,05 a1
Sp Eks+MMC	24	1.5 Sp+MMC*	50	43	0,465±0,035 a1b1	35,0±1,00 a1b1c1
	24	3.0 Sp+MMC*	77	41	0,590±0,010 a1b1	31,5±0,50 a1b1c1
	24	6.0 Sp+MMC*	52	24	0,380±0,020 a1b1c1 ^d	23,5±1,50 a1b1c1 ^d
Metanol	48	6.0	6	2	0,040±0,010	3,50±0,50
MMC	48	0.2 µg/ml	127	149	1,380±0,020	74,0±7,00
Sp Eks.	48	1.5	7	4	0,060±0,010	5,00±1,00
"	48	3.0	13	4	0,085±0,000 a2	7,95±0,05 a2b2
"	48	6.0	9	4	0,065±0,005 ^e	5,50±1,50 ^e
Sp Eks+MMC	48	1.5 Sp+MMC*	219	181	2,000±0,120 a1b1	72,5±0,58 a2b2
	48	3.0 Sp+MMC*	116	60	0,880±0,010 a2b2c1	52,5±1,50 a1b1c1
"	48	6.0 Sp+MMC*	51	49	0,500±0,040 a1b1c1 ^f	36,0±1,00 a1b1c1 ^f

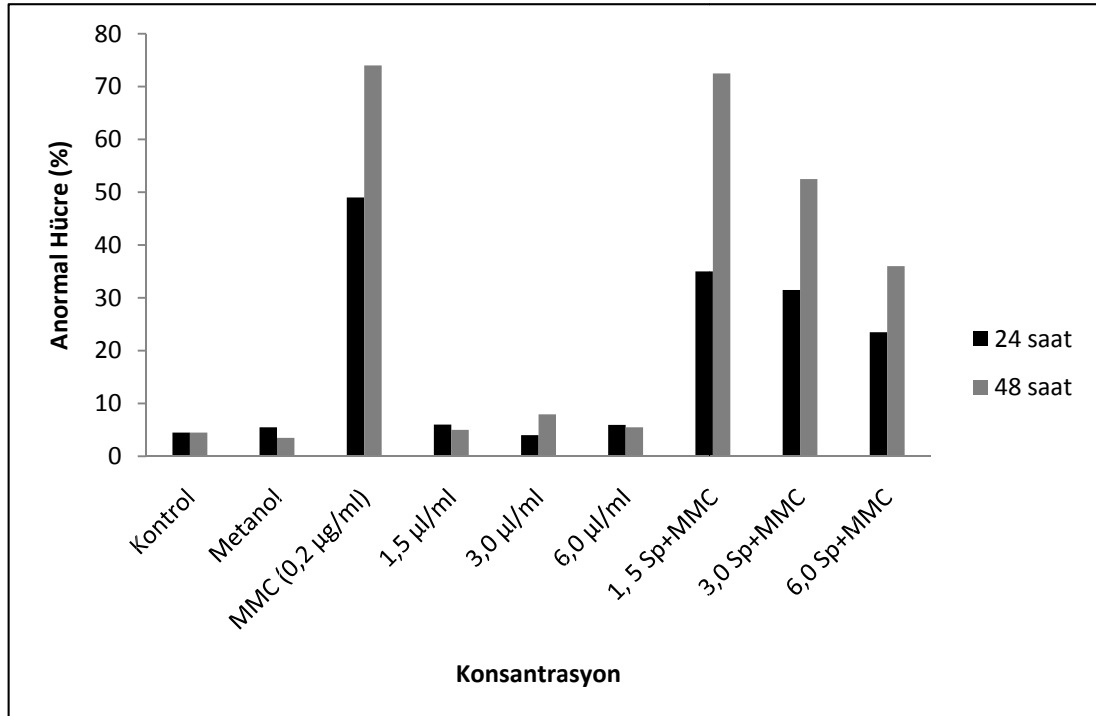
a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli, 1: P≤0.05; 2: P≤0.01; 3: P≤0.001

*MMC (Mitomycin C): 0.20 µg/ml

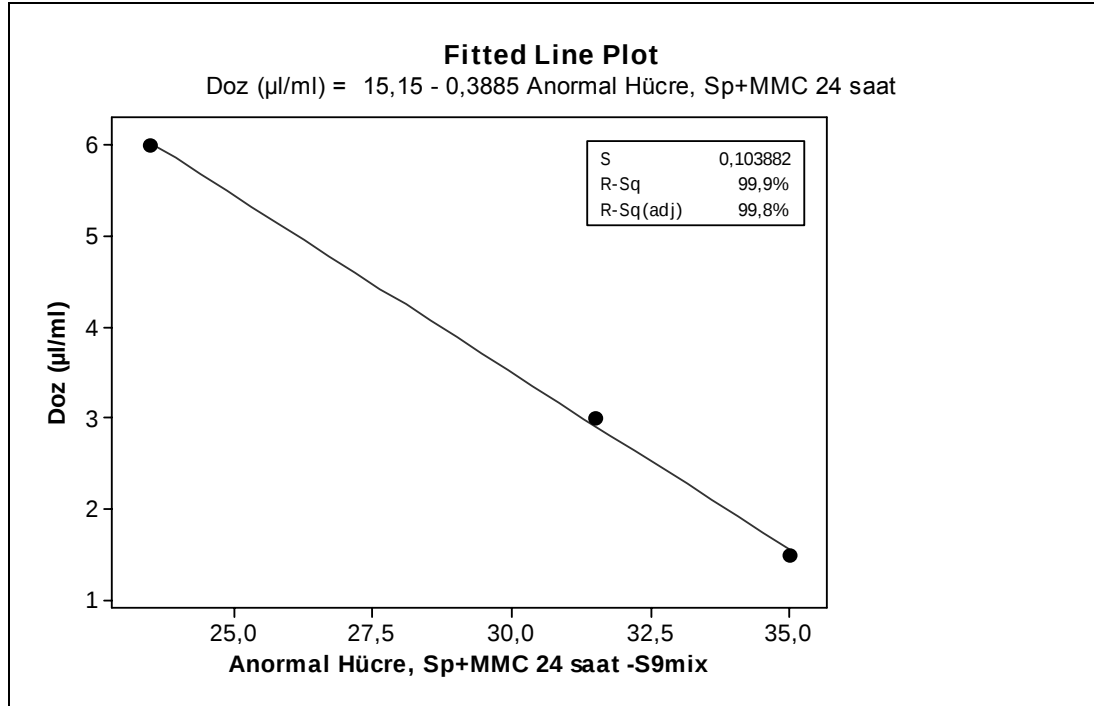
⁺Yüksek sitotoksiteden dolayı sadec d:164; e: 184 ve f: 135 hücre sayılabilmıştır.



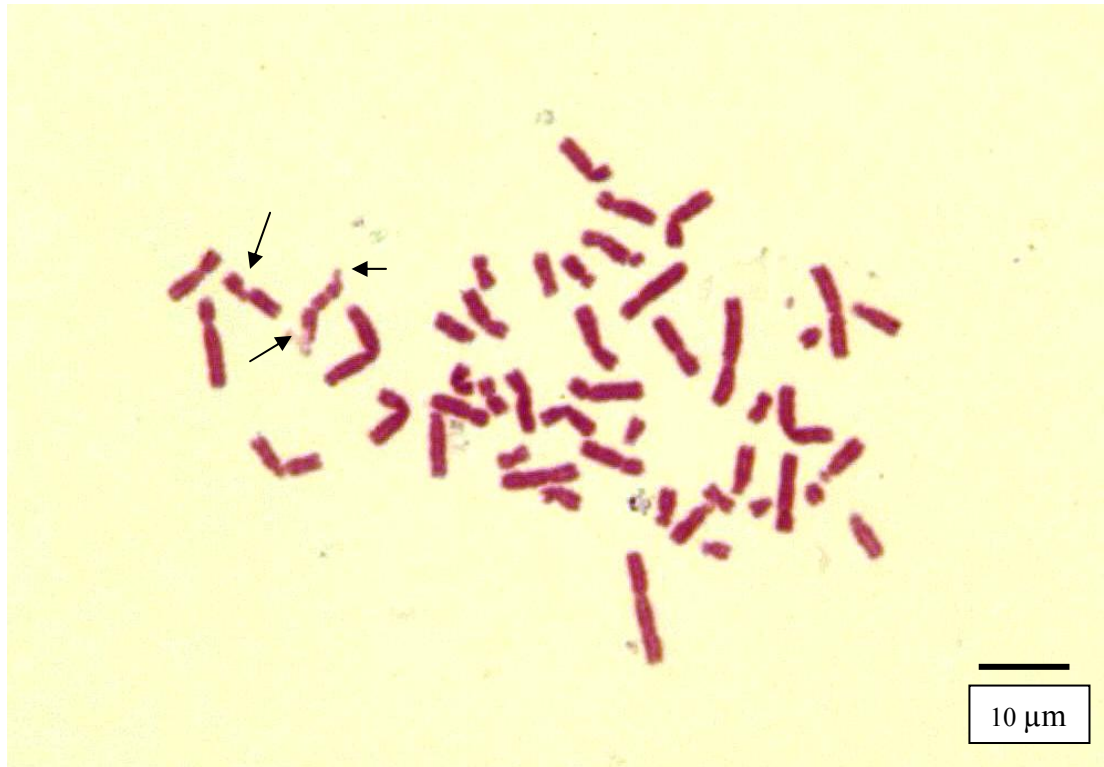
Şekil 4.5.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliği



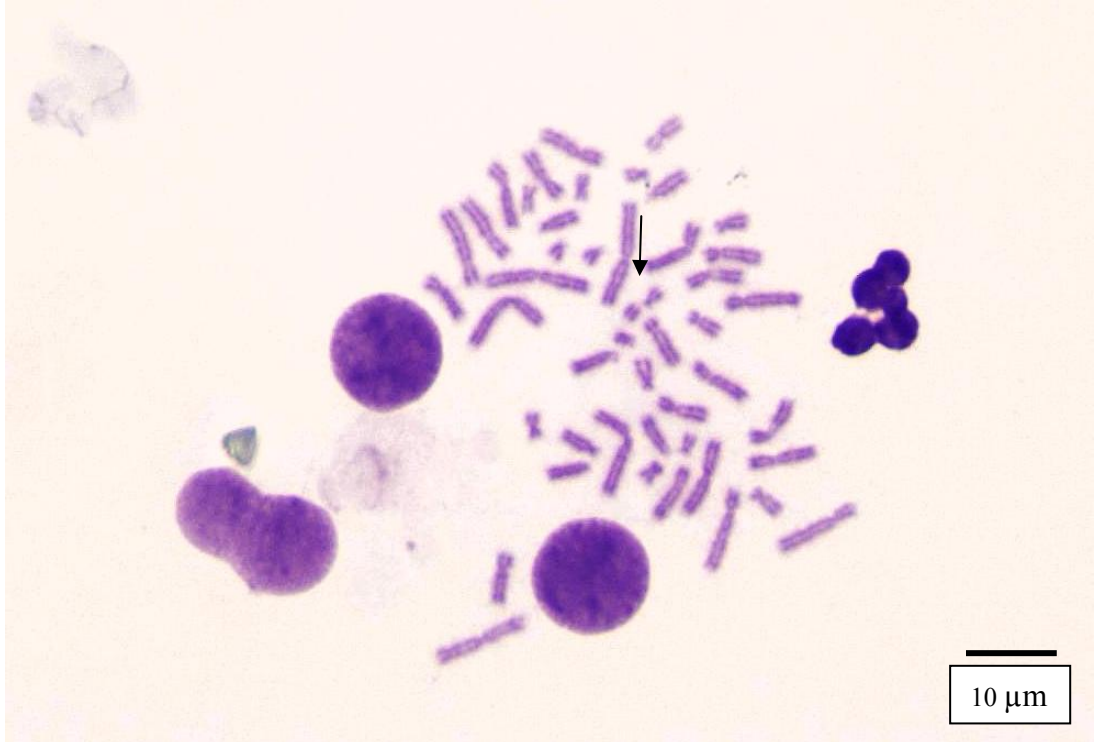
Şekil 4.6.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi



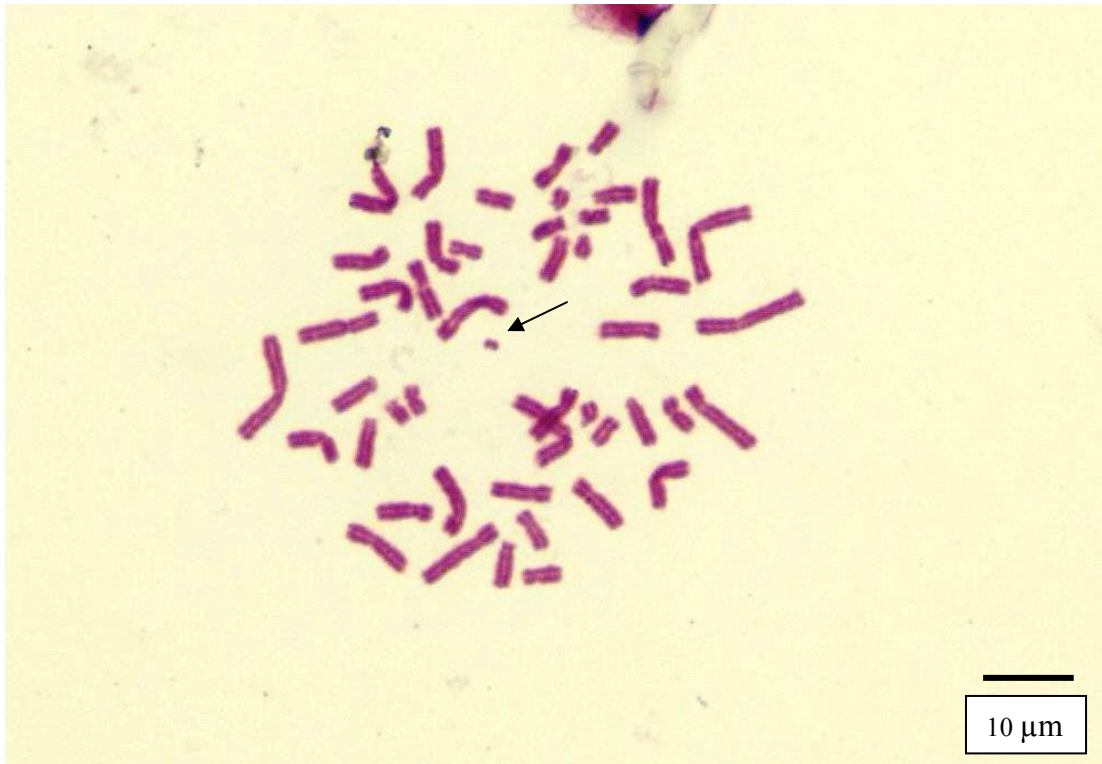
Şekil 4.7.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde anormal hücre yüzdesinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P < 0.02$).



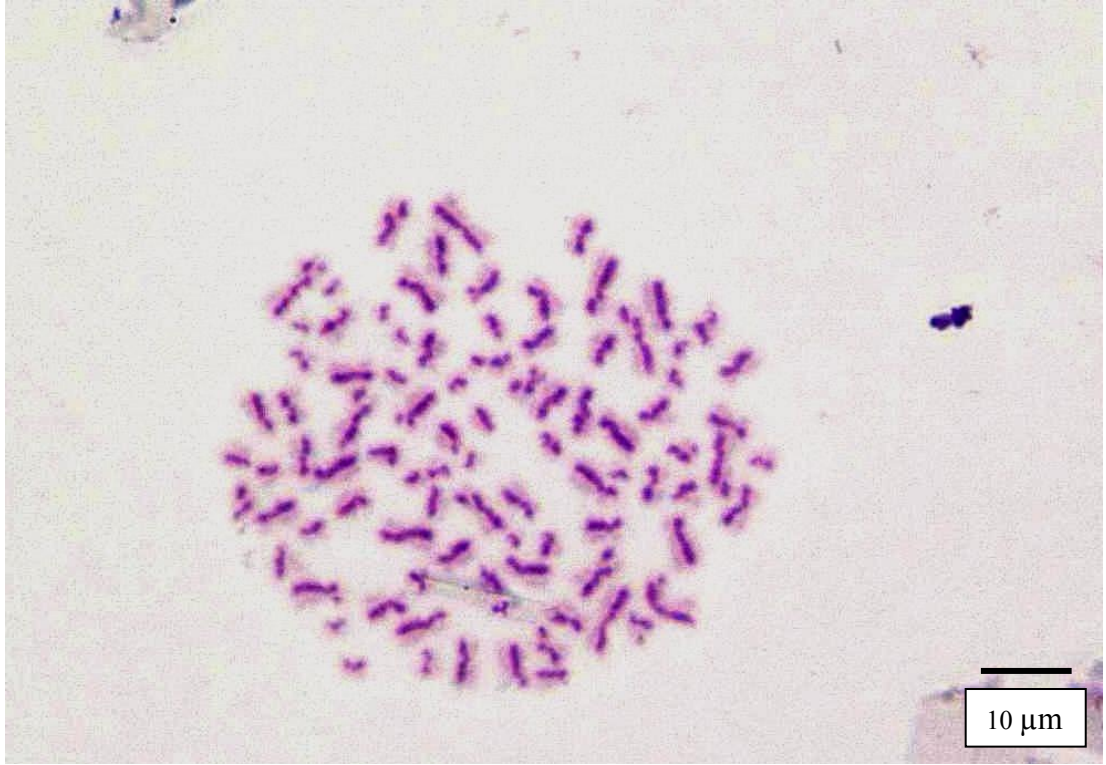
Şekil 4.8.Kromatid kırığı (3.0 µl/ml Sp yaprak ekstraktı+0.2 µg/ml MMC, 48 saat)



Şekil 4.9.Kromozom kırığı (1.5 µl/ml Sp yaprak ekstraktı+0.2 µg/ml MMC, 24 saat)



Şekil 4.10.Fragment (3.0 µl/ml Sp yaprak ekstraktı+0.2 µg/ml MMC, 48 saat)



Şekil 4.11.İkinci mitoz bölünmeyi geçiren poliploid hücre (6.0 µl/ml Sp yaprak ekstraktı 48 saat)

4.1.1.3.S9mix Yokluğunda Sp Yaprak Ekstraktının Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkisi

SP yaprak ekstraktı tek başına tüm muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda MN oluşumunu indüklememiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.12). Sp yaprak ekstraktı, MMC'nin MN oluşumu üzerindeki etkisini azaltmış, fakat sadece 3.0 µl/ml konsantrasyonunda 24 saat muamele edilen kültürde bu düşüş istatistiki bakımından önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.3.S9mix yokluğunda değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde mikronükleuslu binükleus hücre yüzdesi (MN)

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon $\mu\text{l/ml}$	Mikronükleus'lu binükleus hücre (%) $\pm\text{SE}$
Kontrol	-	-	0,150 $\pm$ 0,030
Metanol	24	6.0	0,225 $\pm$ 0,025
MMC	24	0.2 $\mu\text{g/ml}$	2,150 $\pm$ 0,250
Sp Eks.	24	1.5	0,400 $\pm$ 0,100
"	24	3.0	0,275 $\pm$ 0,025
"	24	6.0	0,625 $\pm$ 0,125
Sp Eks.+MMC	24	1.5 Sp+MMC*	1,625 $\pm$ 0,075 a1b1
	24	3.0 Sp+MMC*	1,535 $\pm$ 0,015 a2b2c1 ^d
	24	6.0 Sp+MMC*	1,800 $\pm$ 0,070 a1b1 ^e
Metanol	48	6.0	0,375 $\pm$ 0,225
MMC	48	0.2 $\mu\text{g/ml}$	1,785 $\pm$ 0,065
Sp Eks.	48	1.5	0,410 $\pm$ 0,050
"	48	3.0	0,277 $\pm$ 0,026
"	48	6.0	0,0 $\pm$ 0,0 ^f
Sp Eks.+MMC	48	1.5 Sp+MMC*	1,892 $\pm$ 0,117 a1b1
	48	3.0 Sp+MMC*	1,500 $\pm$ 0,120 a1b1
"	48	6.0 Sp+MMC*	0,0 $\pm$ 0,0 ^f

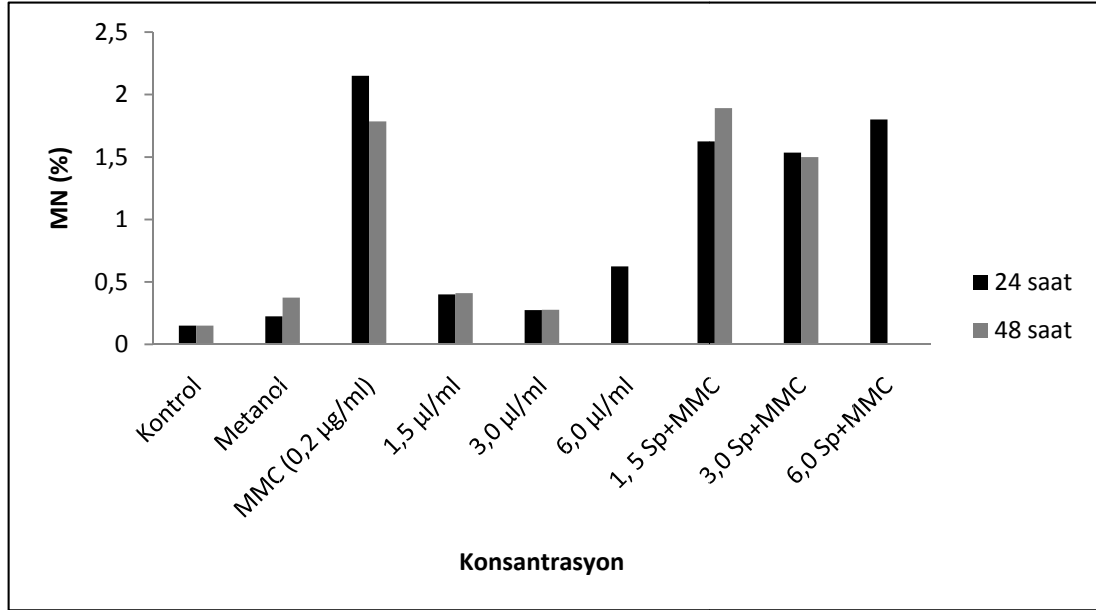
a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli;

c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli, 1: $P \leq 0.05$; 2: $P \leq 0.01$; 3: $P \leq 0.001$

*MMC (Mitomycin C): 0.2 $\mu\text{g/ml}$

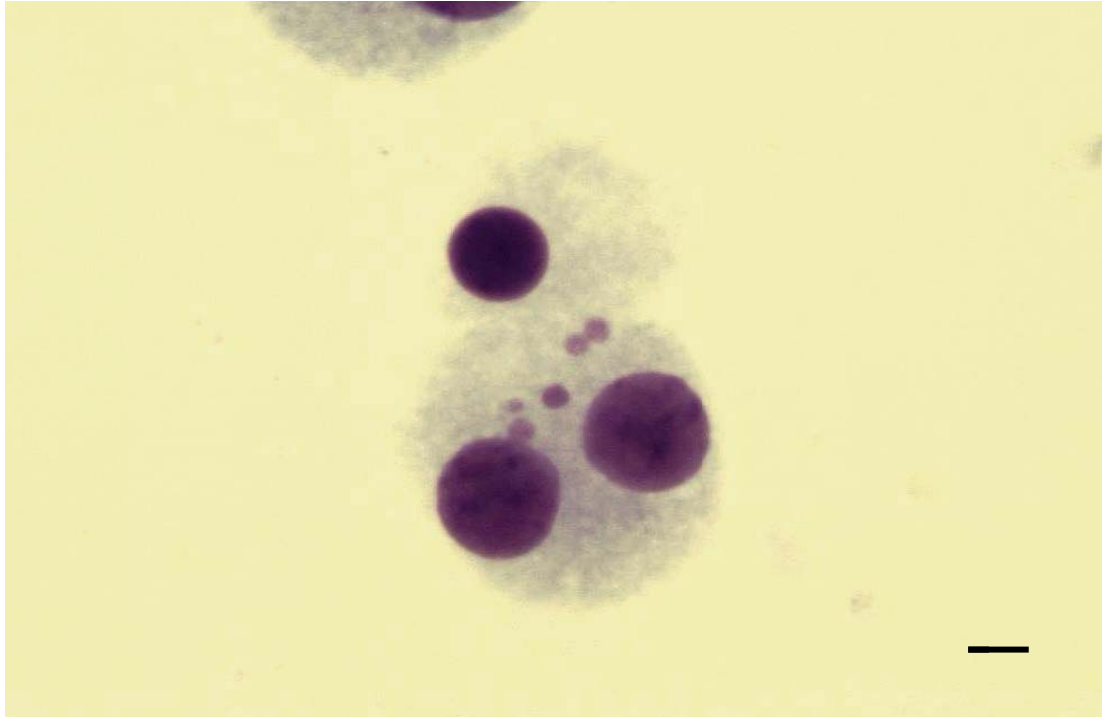
Yüksek sitotoksiteden dolayı sadece toplam 3592 (d) ve 2978 (e) hücre sayılabilmektedir.

Yüksek sitotoksiteden dolayı değerlendirilememiştir (f)



Şekil 4.12.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MN

MMC, MN oluşumunu oldukça fazla artırmış ve çoğunlukla hücrede birden fazla farklı boyutlarda mikronükleus oluşumuna neden olmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. MMC ile 48 saat muamele edilen kültürlerde farklı boyutlarda 5 MN içeren binükleus hücre

4.1.1.4.S9mix Yokluğunda Sp Yaprak Ekstraktının DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkisi

Stachys petrokosmos'ün yaprak ekstraktının DNA replikasyonu üzerindeki etkisi proliferasyon indeksi'nin (PI), mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise mitotik indeks'in (MI) ve nükleus bölünme indeksi'nin (NBI) bulunması yoluyla saptanmıştır.

SP yaprak ekstraktı tek başına 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde sadece en yüksek konsantrasyonda PI'ni her iki kontrole nazaran azaltmıştır. MMC ile beraber Sp RI'nin azaltmış fakat MMC'nin PI üzerindeki etkisi ile kıyaslandığında istatistiki bakımından önemli bulunamamıştır. Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı sadece 3.0 µl/ml konsantrasyonunda 24 saat muamele edilen kültürde PI'ni MMC'ye nazaran istatistiki bakımından önemli derecede düşürmüştür (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.14).

Tek başına Sp yaprak ekstraktı ile 24 saat muamele edilen kültürlerde MI sadece en yüksek konsantrasyonda ve her iki kontrol grubuna nazaran önemli derecede düşürülürken, 48 saat muamele edilen kültürlerde MI tüm konsantrasyonlarda önemli derecede düşürülmüştür (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.15). 48 saat Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile muamele edilen kültürlerde MI, MMC ile karşılaştırıldığında sadece en yüksek dozda düşürülmüştür.

Çizelge 4.4.S9mix yokluğunda değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde proliferasyon indeksi (PI), mitotik indeks (MI) ve nükleus bölünme indeksi (NBI).

Test maddesi	Süre (saat)	Konsant. µl/ml	PI±SE	MI±SE	NBI±SE
Kontrol	-	-	2,17±0,41	3,38±0,55	1,60±0,04
Metanol	24	6.0	2,12±0,31	2,57±0,14	1,32±0,04
MMC	24	0.2 µg/ml	1,53±0,03	0,79±0,13	1,20±0,01
Sp Eks.	24	1.5	1,79±0,50	2,01±0,11	1,44±0,16
"	24	3.0	1,79±0,18	2,24±0,31	1,19±0,00 a1b1
"	24	6.0	1,60±0,00 a2b2	0,81±0,08 a1b1	1,17±0,01 a1b1
Sp Eks+MMC	24	1.5 Sp+MMC*	1,50±0,14	0,60±0,10 a1b1	1,14±0,00 a2b1
	24	3.0 Sp+MMC*	1,37±0,01 a2b2c1	0,78±0,05 a1b1	1,12±0,01 a1b1
	24	6.0 Sp+MMC*	1,49±0,01 a1b1	0,66±0,03 a2b1	1,09±0,01 a1b1
Metanol	48	6.0	2,32±0,01	3,33±0,27	1,51±0,00
MMC	48	0.2 µg/ml	1,49±0,16	1,08±0,15	1,30±0,05
Sp Eks.	48	1.5	2,35±0,12	2,53±0,03 a1b1	1,53±0,01
"	48	3.0	2,21±0,09	2,71±0,01 a1b1	1,40±0,01 a1
"	48	6.0	1,34±0,01 a2b2	1,01±0,01 a2b2	1,07±0,03 a1b1
Sp Eks.+MMC	48	1.5 Sp+MMC*	1,35±0,07 a1b1	0,86±0,06 a1b1	1,25±0,00 a2b1c1
	48	3.0 Sp+MMC*	1,46±0,06 a1b1	1,11±0,05 a1b1	1,28±0,01 a1b1
"	48	6.0 Sp+MMC*	0,0±0,0 ⁺	0,68±0,02 a2b2c1	1,04±0,02 a1b1c1

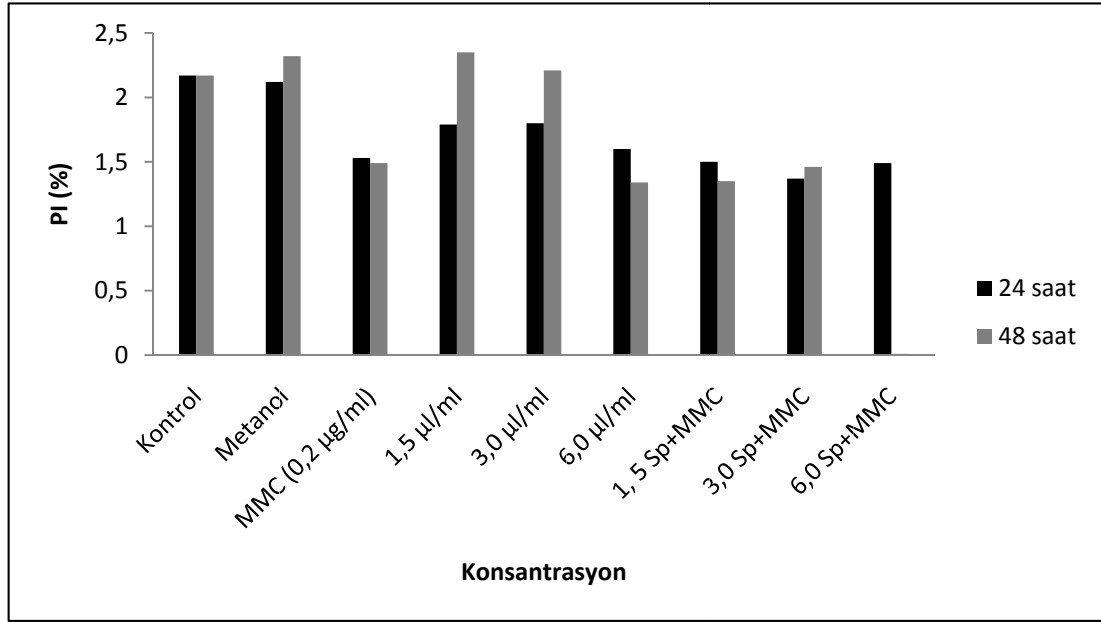
a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli, 1: P≤0.05; 2: P≤0.01; 3: P≤0.001

*MMC (Mitomycin C): 0.20 µg/ml

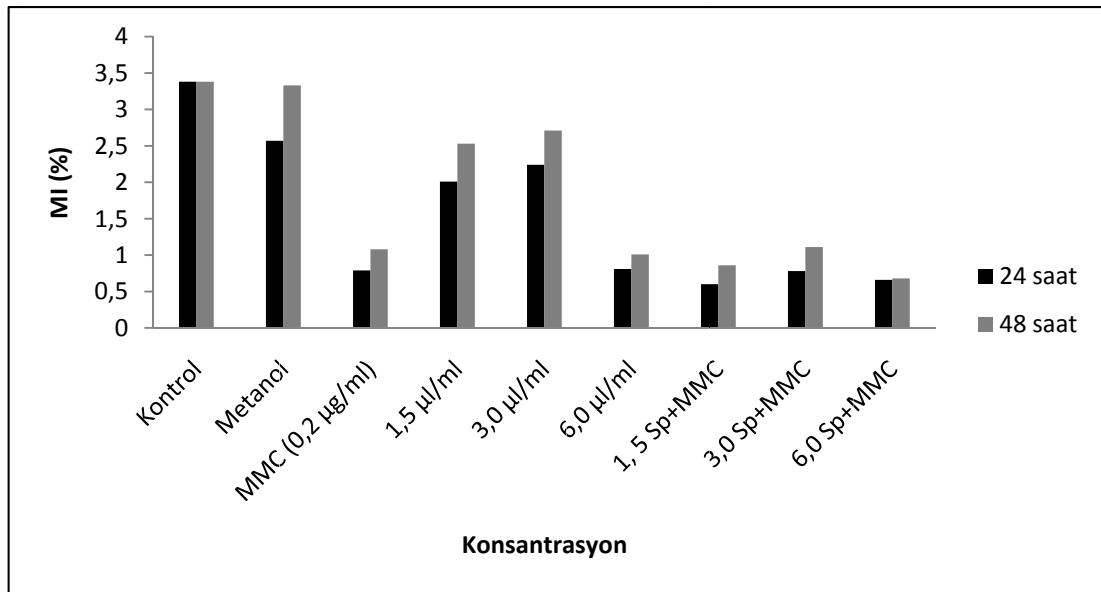
⁺Yüksek sitotoksiteden dolayı değerlendirilememiştir

24 saat tek başına Sp yaprak ekstraktı ile muamele edilen kültürlerde NBI en yüksek iki konsantrasyonda kontrol ve çözücü kontrole nazaran düşürülmüştür. 48 saatlik muamele sürelerinde ise NBI en yüksek iki konsantrasyonda muamelesiz kontrole nazaran, en yüksek konsantrasyonda da çözücü kontrole nazaran önemli derecede düşürülmüştür (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.16). Bu düşüş 48 saatlik muamele süresinde doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.17). Sp+MMC 24 saatlik

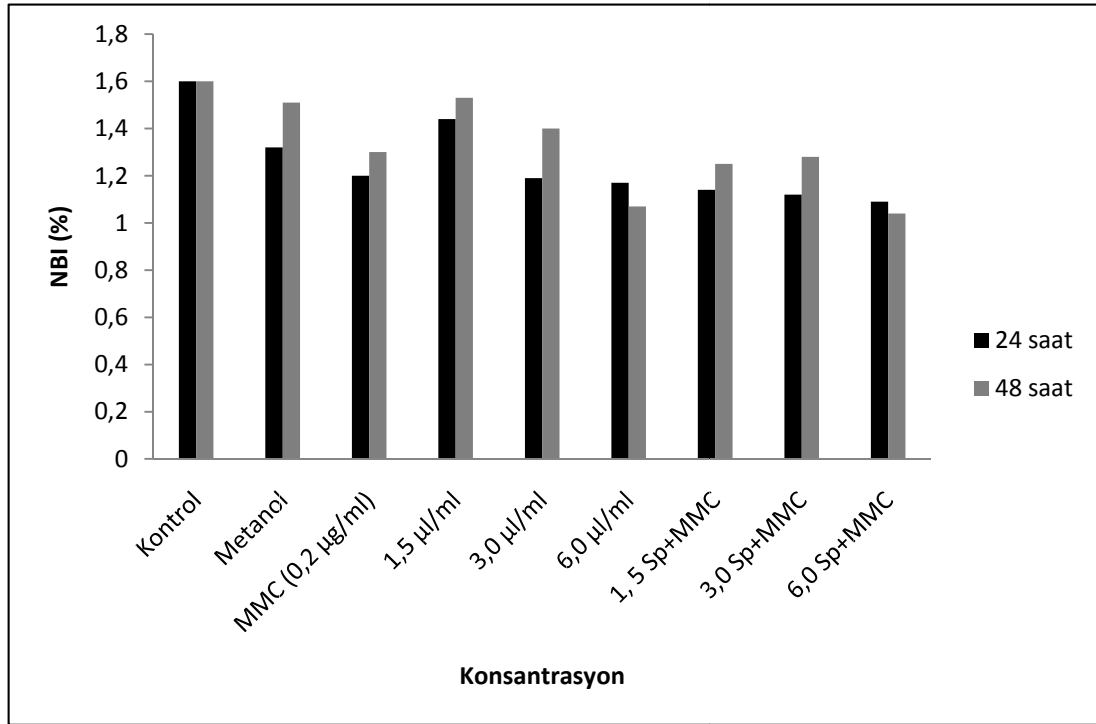
muamelede NBI'ni doza bağılı olarak düşürmesine rağmen MMC ile mukayesede istatistiki bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.18). MMC ile mukayesede Sp, MMC'nin etkisini 48 saatlik muamele süresinde 1.5 ve 6.0 µl/ml konsantrasyonlarda anlamlı bir şekilde düşürmüştür.



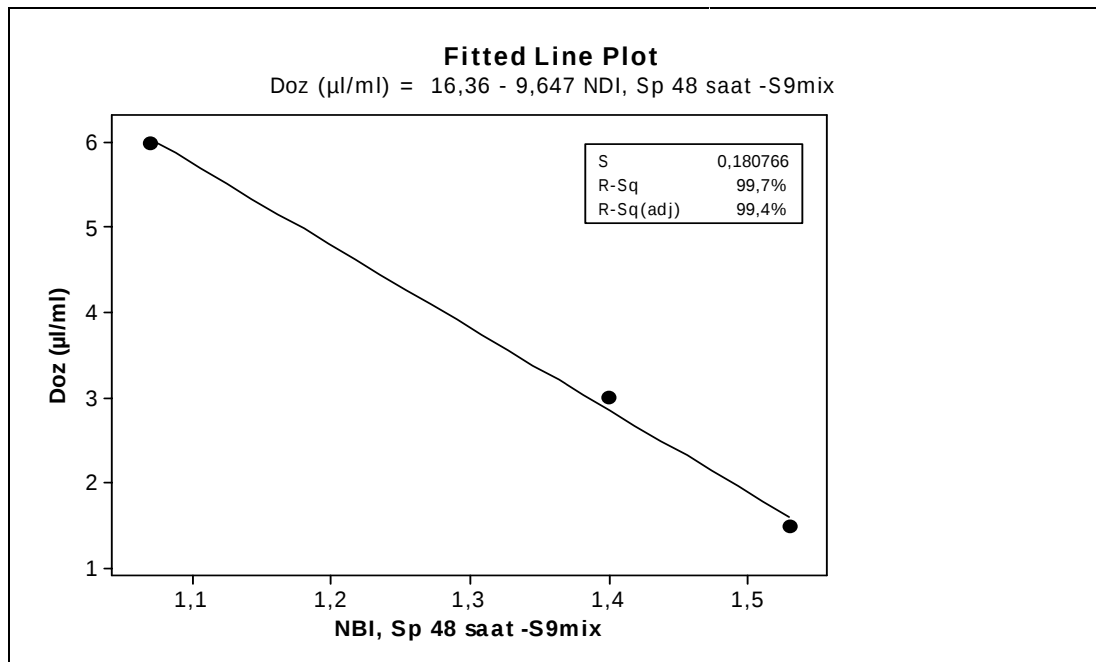
Şekil 4.14.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde PI



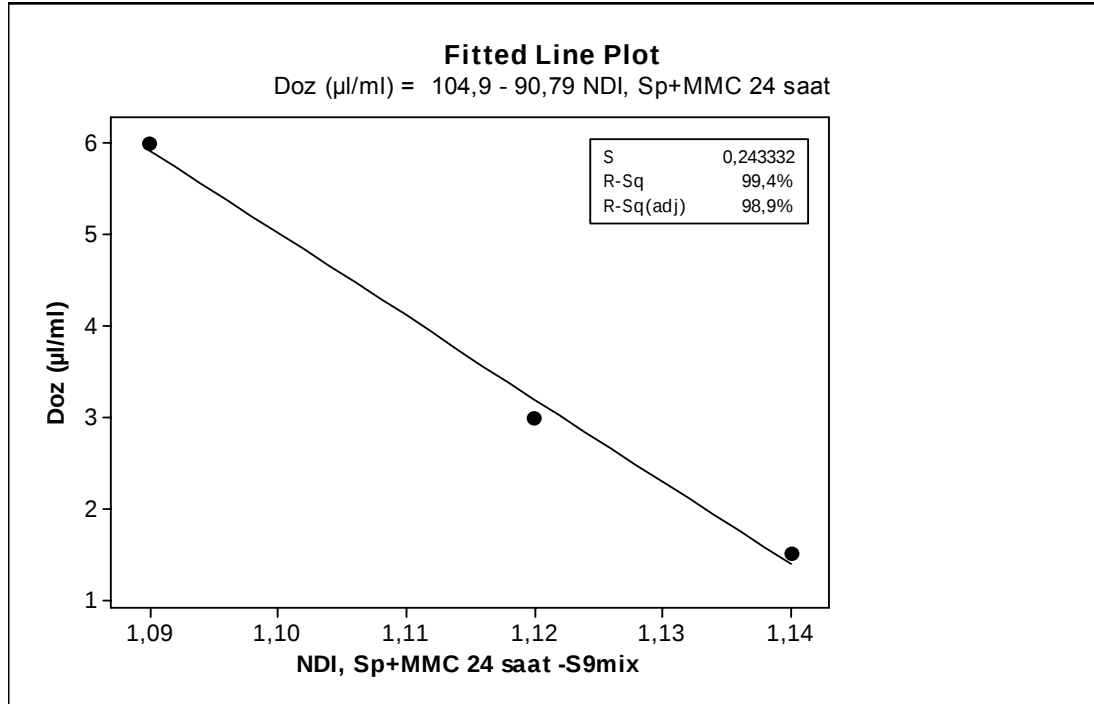
Şekil 4.15.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MI



Şekil 4.16.S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde NBI



Şekil 4.17. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde nükleus bölünme indeksinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P < 0.03$).



Şekil 4.18. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı+MMC karışımı ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde nükleus bölünme indeksinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P < 0.04$).

4.1.2.S9mix Varlığında Yapılan Çalışmaların Sonuçları

4.1.2.1.Metabolik Aktivatör (S9mix) Varlığında *Stachys petrokosmos* (Sp) Yaprak Ekstraktının KKD Üzerindeki Etkisi

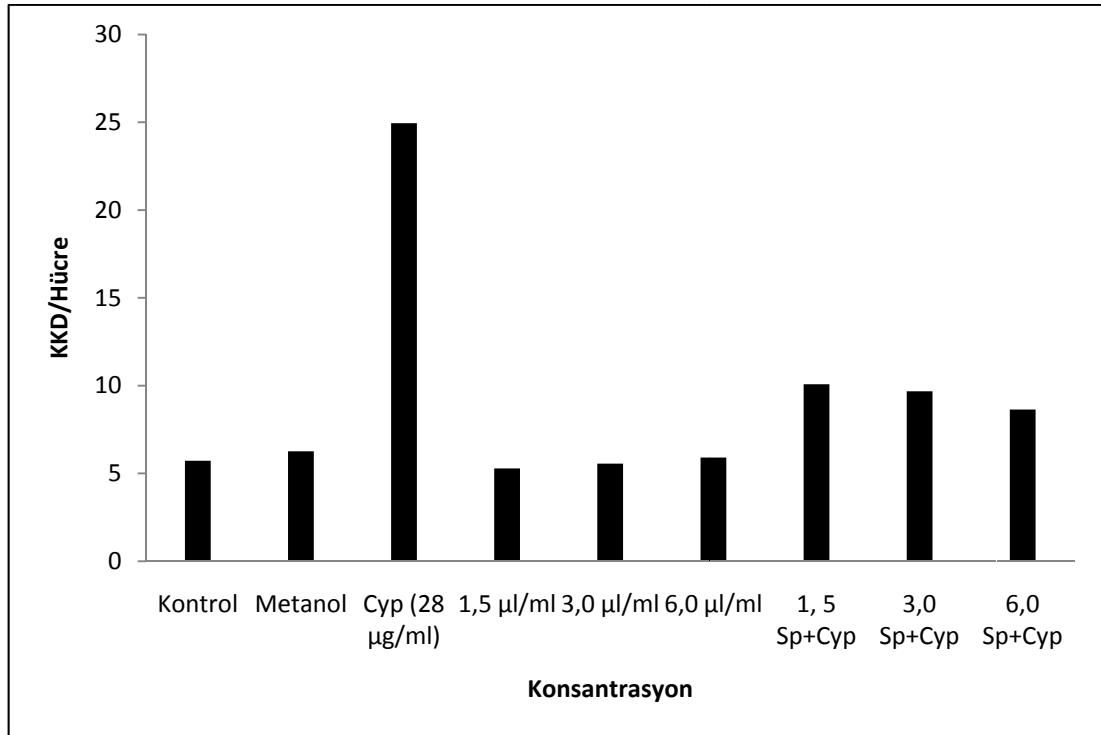
Sp yaprak ekstraktı S9mix varlığında KKD sayısını artırmamış, bunun aksine cyclophosphamide (Cyp)'in KKD üzerindeki etkisini tüm konsantrasyonlarda doza bağlı bir şekilde düşürmüştür (Çizelge 4.5, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).

Çizelge 4.5.S9mix varlığında değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı.

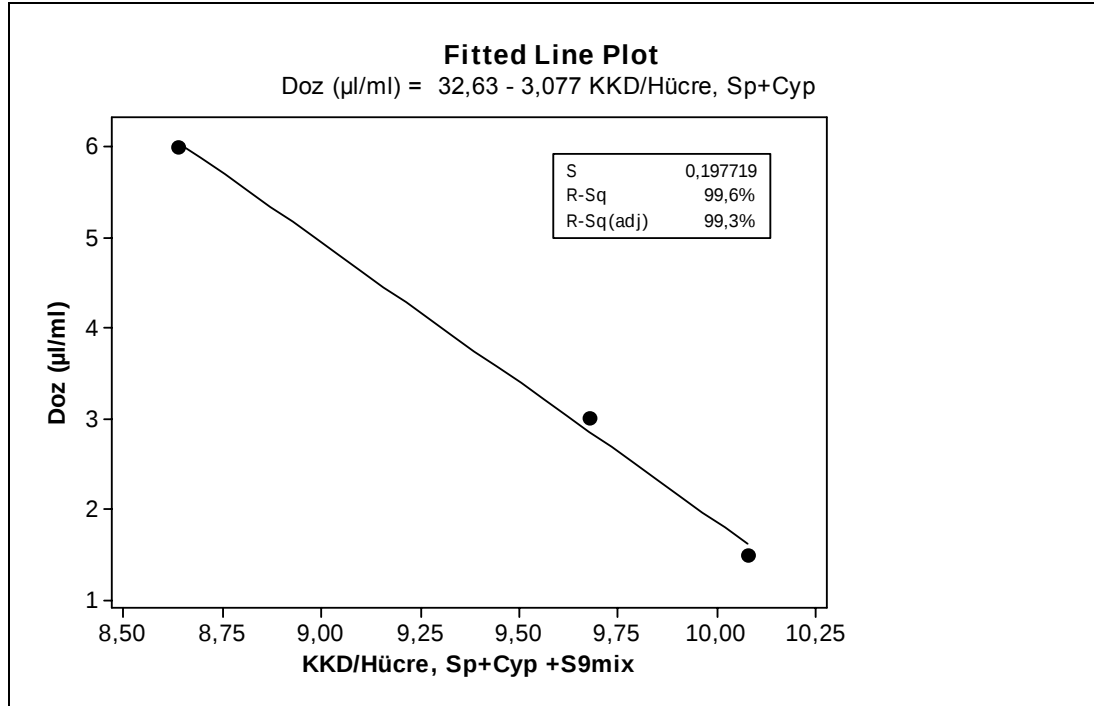
Test maddesi	Konsantrasyon $\mu\text{l/ml}$	Min-Max KKD	KKD/Hücre $\pm$ SE
Kontrol	-	1-15	5,72 $\pm$ 0,44
Metanol	6.0	1-25	6,26 $\pm$ 0,34
Cyp	28 $\mu\text{g/ml}$	7-53	24,95 $\pm$ 2,83
Sp Eks.	1.5	1-12	5,28 $\pm$ 0,71
"	3.0	2-12	5,56 $\pm$ 0,60
"	6.0	1-16	5,90 $\pm$ 0,78
Sp Eks.+Cyp	1.5 Sp+Cyp*	2-24	10,08 $\pm$ 1,00 c1
	3.0 Sp+Cyp*	3-25	9,68 $\pm$ 0,80 c1
	6.0 Sp+Cyp*	1-19	8,64 $\pm$ 1,32 c1

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli, 1: $P \leq 0.05$; 2: $P \leq 0.01$; 3: $P \leq 0.001$

*Cyp (Cyclophosphamide): 28 $\mu\text{g/ml}$



Şekil 4.19.S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD/hücre



Şekil 4.20.S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KKD/hücre sayısının doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P<0.03$).

4.1.2.2.S9mix Varlığında Sp Yaprak Ekstraktının Kromozom Anormalliği (KA) ve Anormal Hücre (AH) Oluşumu Üzerindeki Etkisi

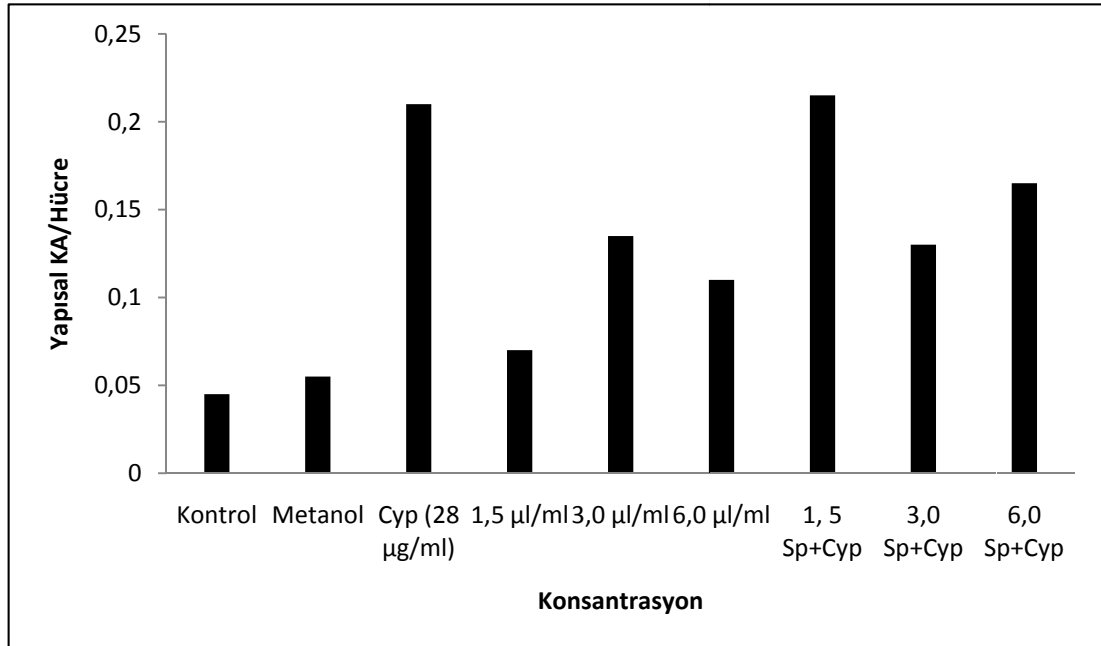
Sp yaprak ekstraktı tek başına KA sayısını ve AH yüzdesini artırmamış, Cyp'nin KA oluşumu ve AH yüzdesi üzerindeki etkisini özellikle en yüksek iki konsantrasyonda azaltmasına rağmen istatistiki bakımından önemli bulunamamıştır (Çizelge 4.6, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).

Çizelge 4.6.S9mix varlığında değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde yapısal kromozom anormalliği (KA) ve anormal hücre yüzdesi (AH)

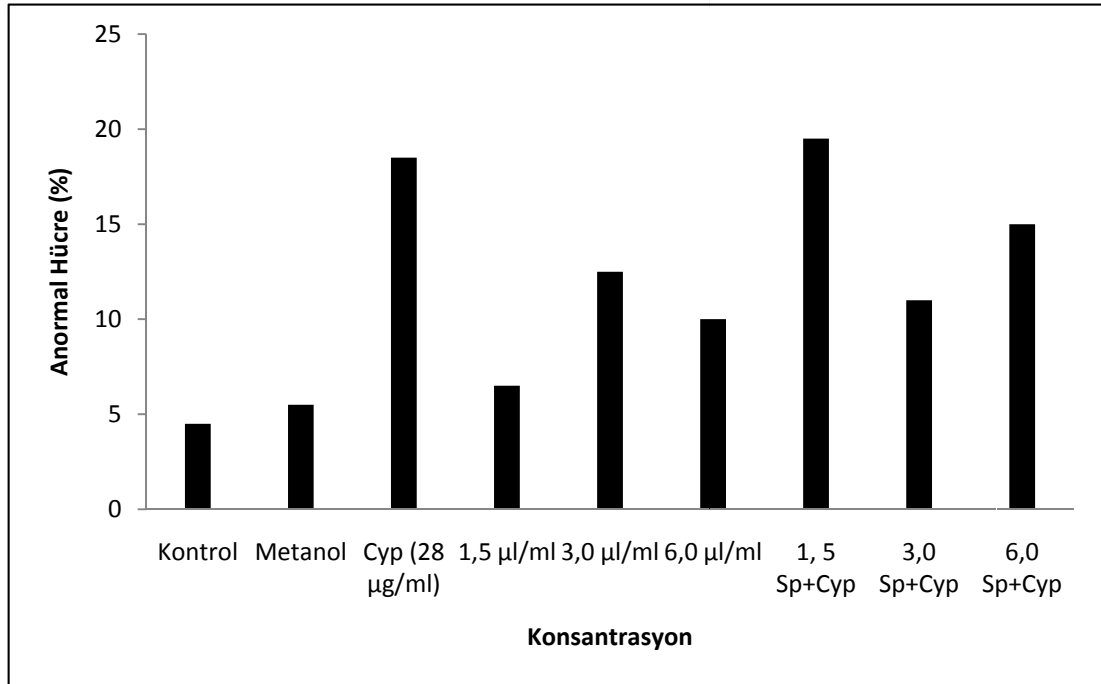
Test maddesi	Konsantras. (µl/ml)	Anormallik çeşitleri		Yapısal KA/Hücre±SE	Anormal Hücre±SE (%)
		Kromatid Tipi	Kromozom Tipi		
Kontrol	-	8	1	0,045±0,005	4,50±0,50
Metanol	6.0	6	3	0,055±0,000	5,50±0,05
Cyp	28 µg/ml	28	14	0,210±0,040	18,50±1,50
Sp Eks.	1.5	11	3	0,070±0,010	6,50±1,50
“	3.0	17	10	0,135±0,015	12,50±0,50 a1
“	6.0	12	10	0,110±0,010	10,00±1,00
Sp Eks+Cyp	1.5 Sp+Cyp*	28	14	0,210±0,015 a1b1	19,50±1,50 a1
	3.0 Sp+Cyp*	18	8	0,130±0,010 a1	11,00±1,00 a1
	6.0 Sp+Cyp*	24	9	0,165±0,015 a1	15,00±1,50 a1

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli, 1: $P \leq 0.05$; 2: $P \leq 0.01$; 3: $P \leq 0.001$

*Cyp (Cyclophosphamide): 28 µg/ml



Şekil 4.21.S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliği



Şekil 4.22.S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi

4.1.2.3.S9mix Varlığında Sp Yaprak Ekstraktının Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkisi

S9mix varlığında Sp yaprak ekstraktı tek başına MN oluşumunu en yüksek iki dozda ve sadece kontrole nazaran artırmıştır. Cyp'nin MN oluşumu üzerindeki etkisini ise tüm dozlarda düşürmüştür, bu düşüş en yüksek dozda istatistiki bakımından anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.23).

Çizelge 4.7.S9mix varlığında değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde mikronükleuslu binükleus hücre yüzdesi (MN)

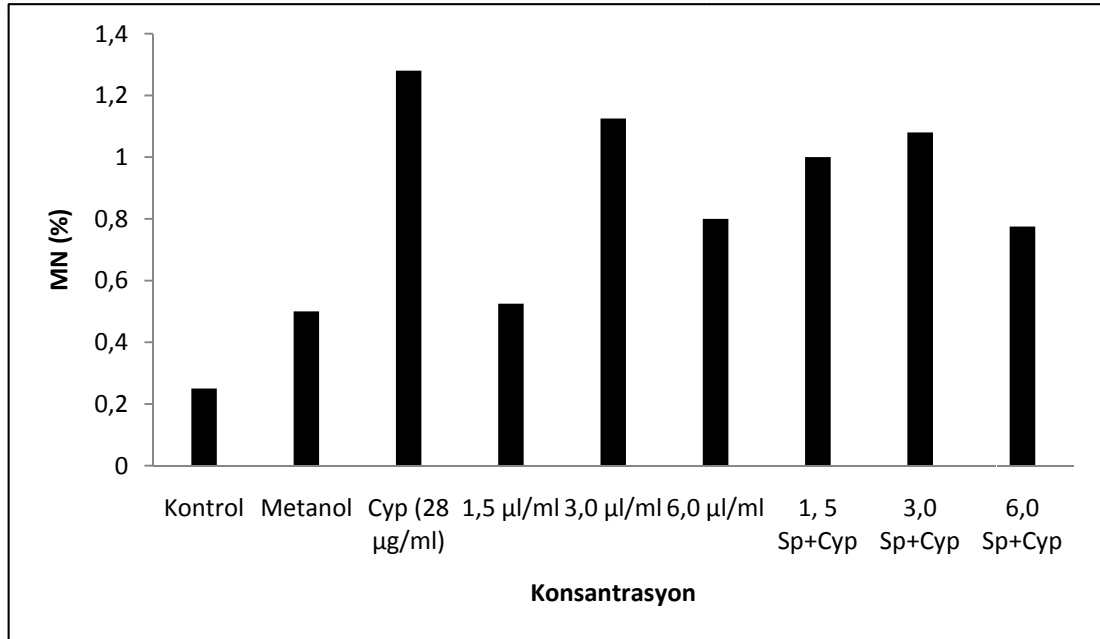
Test maddesi	Konsantrasyon µl/ml	Mikronükleus'lu binükleus hücre (%) ±SE
Kontrol	-	0,250±0,050
Metanol	6.0	0,500±0,100
Cyp	28 µg/ml	1,280±0,120 ^d
Sp Eks.	1.5	0,525±0,075
"	3.0	1,125±0,075 a1
"	6.0	0,800±0,050 a1
Sp Eks.+Cyp	1.5 Sp+Cyp*	1,000±0,090 a1
	3.0 Sp+Cyp*	1,080±0,080 a1 ^e
	6.0 Sp+Cyp*	0,775±0,045 c1

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli;

c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli, 1: P≤0.05; 2: P≤0.01; 3: P≤0.001

*Cyp (Cyclophosphamide): 28 µg/ml

Yüksek sitotoksiteden dolayı sadece toplam 3713 (d) ve 3138 (e) hücre sayılabılmıştır.



Şekil 4.23.S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MN'lu binükleer hücre yüzdesi

4.1.2.4.S9mix Varlığında Sp Yaprak Ekstraktının DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkisi

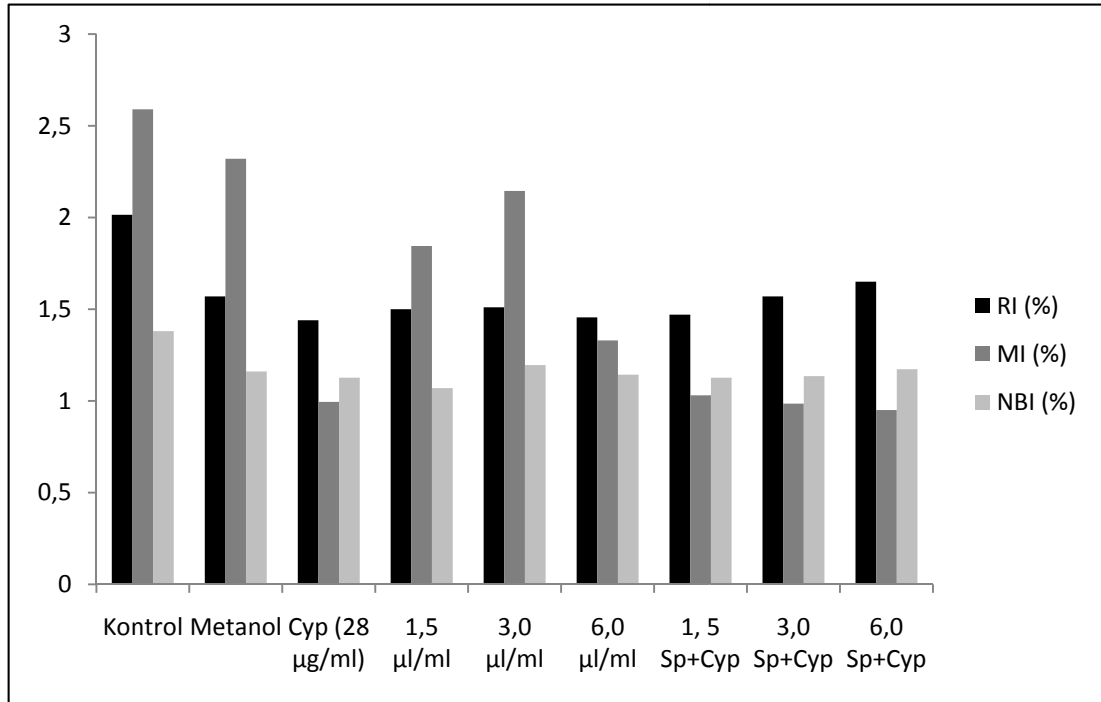
Sp yaprak ekstraktı tek başına ve Cyp ile birlikte PI'ni etkilememiştir. Sp yaprak ekstraktı tek başına MI'ı 1.5 ve 6.0 µl/ml konsantrasyonlarında hem kontrole hem de çözücü kontrole nazaran düşürmüştür, fakat Cyp'nin MI üzerindeki etkisini ise etkilememiştir. Aynı şekilde Sp yaprak ekstraktı tek başına ve sadece en yüksek konsantrasyonda NBI'ni sadece kontrole nazaran azaltmış fakat Cyp'nin etkisini ise etkilememiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.24).

Çizelge 4.8.S9mix varlığında değişik dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde proliferasyon indeksi (PI), mitotik indeks (MI) ve nükleus bölünme indeksi (NBI).

Test maddesi	Konsantrasyon µg/ml	RI±SE	MI±SE	NBI±SE
Kontrol	-	2,015±0,14	2,590±0,17	1,381±0,18
Metanol	6.0	1,570±0,04	2,320±0,49	1,160±0,01
Cyp	28 µg/ml	1,440±0,20	0,995±0,03	1,126±0,01
Sp Eks.	1.5	1,500±0,03 a1	1,845±0,01 a1b1	1,070±0,04
“	3.0	1,510±0,13	2,145±0,21	1,195±0,05
“	6.0	1,455±0,06	1,330±0,10 a1b1	1,143±0,01 a1
Sp Eks.+Cyp	1.5 Sp+Cyp*	1,470±0,10	1,030±0,37	1,126±0,03
	3.0 Sp+Cyp*	1,570±0,21	0,985±0,05 a1b1	1,135±0,00 a2b1
	6.0 Sp+Cyp*	1,650±0,19	0,950±0,02 a2b2	1,173±0,02

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli, 1: P≤0.05; 2: P≤0.01; 3: P≤0.001

*Cyp (Cyclophosphamide): 28 µg/ml



Şekil 4.24.S9mix varlığında farklı dozlarda Sp yaprak ekstraktı veya Sp yaprak ekstraktı+Cyp karışımı ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde PI, MI ve NBI.

4.2.Tartışma

Bu çalışmada, S9mix varlığında ve yokluğunda *Stachys petrokosmos*'un yaprak ekstraktı insan periferel lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormalliği (KA), mikronükleus (MN) oluşumu ve hücre bölünmesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla *Stachys petrokosmos*'un 1.5, 3.0 ve 6.0 µl/ml'lik dozları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir.

4.2.1.*Stachys petrokosmos* Yaprak Ekstraktının İnsan Periferel Lenfositlerinde KKD, KA ve MN Oluşumu Üzerine Etkisi

S9mix yokluğunda Sp yaprak ekstraktı tek başına KKD sayısını sadece en yüksek dozlarda artırmış, KA sayısını tüm dozlarda indüklemiş fakat MN sayısını artırmamıştır. Bununla birlikte Sp yaprak ekstraktı Mitomycin C'nin KA oluşumu

üzerindeki etkisini azaltmıştır. Sp yaprak ekstraktı tek başına sadece yüksek dozlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu, yine sadece yüksek dozlarda Mitomycin C'nin sitotoksik etkisini artırdığı saptanmıştır. S9mix varlığında Sp yaprak ekstraktının genotoksik ve sitotoksik olmadığı fakat Cyclophosphamide'in KKD ve MN oluşumu üzerindeki etkisini azaltarak anti-genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Hollman ve ark. (1996) bitkilerden elde edilen flavonoidlerin anti-inflamatuar etkileri yanında anti-mutajenik ve hatta anti-allerjik özelliklerinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Fakat bazı bitkilerin uçucu yağlarının da insanlarda bazı istenmeyen etkilere ve hatta ölümlere yol açabilecek kadar zehirli maddeler içerdikleri de bildirilmiştir (Qu ve ark., 1992; Chiang ve ark., 1997; Şarer, 1991; Leal-Cardoso ve Fonteles, 1999).

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan *Stachys petrokosmos* bitkisi ile aynı genus içinde yer alan diğer *Stachys* türlerinin yaprak ekstraktlarının anti-genotoksik ve anti-kanserojenik etkiye sahip oldukları ve alternatif tıpta kanser tedavisinde kullanıldıkları belirlenmiştir. Örneğin, *Stachys annula* geleneksel kanser tedavisinde Türk insanları tarafından yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Aksoy ve ark.1988). Glikozid, saponin ve uçucu yağ ihtiva eden bu bitki genelde yaprakları kaynatıldıktan sonra meyve suyu gibi içilmektedir. *Stachys annula*, *S typhimurium*'un TA100 suşunda sodium azide'in mutajenitesini de % 25 oranında azaltmıştır (Karakaya ve Kavas 1999). Yapılan araştırmalarda *Stachy spruneri*'nin α - tokoferol'a karşı antioksidant aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Couladis ve ark. 2003). Başaran ve ark. (1996) tıbbi bitkilerden *Stachys lavandulifolia* yaprak ekstraktı *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarında metabolik aktivasyonlu veya aktivasyonsuz olarak mutajenik olmadıklarını hatta anti-genotoksik etkiye sahip olabileceklerini saptamışlardır. İran'a özgü tıbbi bitkilerden *Stachys obtusicrena* bitkisinin ekstraktının anti-neoplastik etkiye sahip olduğu ve tümör hücrelerinin artışı azalttığı ayrıca insan lenfositleri üzerinde apoptotik ve anti-proliferatif etki gösterdiği saptanmıştır (Amirghofran ve ark., 2006; Amirghofran ve ark., 2007). Kukic ve ark. (2006) *Stachys* ailesine ait dört endemik tür olan *S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* ve *S. alpina* L. ssp. *dinarica* türlerinin yüksek anti-oksidan etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi *Stachys* cinsine ait birçok türün anti-oksidan, anti-genotoksik ve anti-kanserojenik etkiye sahip oldukları söylenebilir. Bu çalışmada kullanılan *S.petrokosmos* bitkisinin yaprak metanol ekstraktının S9mix yokluğunda zayıf genotoksik etki göstermesi yanında, S9mix varlığında genotoksik etkisinin olmadığı ve hatta anti-genotoksik etkiye sahip olduğu söylenebilir.

GC-MS yöntemine göre analiz edilen *Stachys*'in farklı türlerinin yaprak ekstraktlarında birçok farklı fenol, flavonoid ve glikosid bulunmasına rağmen genel olarak germacrene, stachysosides E-H, alfa ve beta-pinene, iridoid glycoside ve stachyssaponin gibi bileşikler hemen hemen birçok türde bulunmuştur (Lenherr ve ark., 1984; Sajjadi ve Amiri, 2007; Ahmad ve ark., 2008; Murata ve ark. 2008; Giuliani ve ark., 2009; Ozturk ve ark., 2009). Bunun dışında *Stachys* türlerine özgü chlorogenic asit, phenidon, naphthelene, betulinic-acid, D-comphor, delphinidin, hyperoside, manganese, oleanolic acid, rosmarinic-acid, urcolic acid, apigenin ve tanen gibi birçok bileşiğe de rastlanmıştır (Delazar ve ark., 2005; Ivanova ve ark., 2009; Savic ve ark., 2010). Bu çalışmada yaprak ekstraktı materyal olarak kullanılan *Stachys petrokosmos* oldukça endemik olup ekstraktının içeriği ile ilgili hiçbir çalışma yapılmamıştır. Ancak yapılırsa yukarıda belirtilen maddelerin bunda da bulunabileceği söylenebilir.

Bu çalışmada *S.petrokosmos*'un S9mix yokluğunda MMC'nin etkisini azaltarak gösterdiği anti-genotoksik etki özellikle S9mix varlığında daha net bir şekilde ortaya çıkmıştır. Metabolik aktivatör varlığında bu bitki ekstraktının genotoksik etkisini kaybetmiş ve Cyp'nin etkisini azaltarak anti-genotoksik etki göstermiştir. *S.petrokosmos*'un S9mix varlığındaki bu anti-genotoksik etkisinin metabolize olan ekstraktlardan açığa çıkan maddeler ile gerçekleştiği söylenebilir. Zira in vivo ve in vitro ortamda *Stachys*'in farklı türleri ile yapılan çalışmalarda bu türlerin anti-genotoksik, anti-kanserojenik, anti-oksidan ve hatta anti-allerjik olduğu bildirilmiştir. (Başaran ve ark., 1996; Shin, 2004; Delazar ve ark., 2005; Kukic ve ark., 2006; Amirghofran ve ark., 2006; Amirghofran ve ark., 2007; Haznagay-Radnai ve ark.2008).

Stachys türlerinde bulunan asetil flavonoid glikosidlerin ve polifenollerin serbest radikal yakalayıcı bileşikler olduğu ve bu bileşikler sayesinde *Stachys*

türlerinin ekstraktlarının anti-oksidant özellikte oldukları bildirilmiştir (Hollmann ve ark., 1996; Delazar ve ark., 2005; Kukic ve ark., 2006). Diğer başka araştırmacılar da birçok farklı türün anti-oksidant etkiye sahip olduklarını bildirerek daha önce yapılan çalışmaları desteklemişlerdir (Haznagay-Radnai ve ark., 2006; Matkowski ve Piotrowska 2006).

Hem MMC'nin hem de Cyp'nin yüksek dozlarda anti-kanser ilaçları olarak kullanıldıkları tümör hücrelerinde DNA'ya bağlanarak DNA çift sarmalının iki kolu arasında çapraz bağlar oluşturmak suretiyle DNA replikasyonunu önledikleri ve dolayısıyla antitümör etki gösterdikleri bilinmektedir (Perumal ve ark., 2009; Helm ve ark., 2010; Robidoux ve ark., 2010; <http://www.ilacabak.com>).

In vivo ortamda Cyp karaciğerde mikrozom oksidaz sisteminin etkisi ile transforme olup alkilleyici aktif metabolitler olan acrolein ve phosphoramid bileşiklerine dönüşür (Sowjanya ve ark., 2009). Yüksek dozlarda kullanıldığı zaman Cyp bu alkilleyici ajanlar sayesinde DNA'da yüksek oranda mutasyonlar oluşturarak sitotoksik etki gösterir ve bu özelliğinden dolayı da kanser tedavisinde kemoterapik ajan olarak kullanılabilir (Sowjanya ve ark., 2009).

Doğada doğal olarak bulunan birçok bileşiğin kimyasalların toksik etkisini düzenlediği ve tümör oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir (Milner, 2001; Shukla ve Taneja, 2002; Madhavi ve ark., 2007). Bu çalışmada *S.petrokosmos* Cyp'nin toksik etkisi ile birlikte genotoksik etkisini de azaltmıştır. Daha önce yapılan çalışmaları dikkate aldığımızda *S.petrokosmos* yaprak ekstraktının Cyp'nin kromozomlarda oluşturduğu hasarı serbest radikalleri engelleyici etkisi ile azalttığını söyleyebiliriz. Serbest radikal yakalayıcı maddelerin ayrıca anti-oksidant enzimlerin sentezini artırdıkları ve DNA iplikleri arasında çapraz bağ oluşumunu engelleyerek mutasyon oluşumunu engelledikleri, DNA tamir mekanizmasını uyardığı ve sitokrom p450 gibi birçok enzimin sentezini düzenledikleri bildirilmiştir (Bianchini ve Vainio, 2001; Khanum ve ark., 2004; Sowjanya ve ark., 2009). Amirghofran ve ark. (2007) *Stachys* türlerinin ekstraktlarının apoptozu artırmaları yoluyla da tümörü inhibe edebildiklerini bildirmişlerdir. Bu durum *S.petrokosmos* ile diğer *Stachys* türlerinin anti-genotoksik etkisini açıklamaktadır.

4.2.2.Stachys petrokosmos Yaprak Ekstraktının Hücre Bölünmesi Üzerine Etkisi

Stachys petrokosmos'un insan periferik lenfositlerinde sitotoksik etkisi nükleus bölünme indeksi (NBI), proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeksi'nin (MI) saptanması ile belirlenmiştir. Sp yaprak ekstraktı tek başına sadece yüksek dozlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu, yine sadece yüksek dozlarda Mitomycin C'nin sitotoksik etkisini artırdığı fakat S9mix varlığında Sp yaprak ekstraktının sitotoksik olmadığı saptanmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda *Stachys* türlerinin ekstraktlarının genellikle anti-proliferatif etki gösterdikleri bildirilmiştir (Amirghofran ve ark., 2007; Haznagy-Radnai ve ark., 2008). Anti-oksidant maddeler birçok mekanizma ile hücreyi kanser oluşumuna karşı korurken, DNA tamir mekanizmalarında görev alan birçok enzim dahil diğer enzimlerin sentezlenmesini düzenlediği bildirilmiştir (Bianchini ve Vainio, 2001; Khanum ve ark., 2004; Sowjanya ve ark., 2009). Muhtemelen *S.petrokosmos* yaprak ekstraktı sahip olduğu anti-oksidant maddeler ile hücreyi koruduğu ve özellikle S9mix varlığında sitotoksik etki göstermeyip Cyp'nin sitotoksik etkisini azalttığı söylenebilir.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bilindiği gibi *Stachys* cinsine ait türler anti-bakteriyal, anti-piretik, anti-septik, anti-spazmodik (kas gevşetici) ve anti-oksidant olarak tıpta ve eczacılıkta karın gazı giderici, idrar söktürücü, ateş düşürücü, tansiyon düşürücü, mideyi kuvvetlendirici, kanamayı durdurucu, kurt dökücü ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır.

S9mix yokluğunda Sp yaprak ekstraktı tek başına KKD sayısını sadece en yüksek dozlarda artırmış, KA sayısını tüm dozlarda indüklemiş fakat MN sayısını artırmamıştır. Bununla birlikte Sp Mitomycin C'nin KA oluşumu üzerindeki etkisini azaltmıştır. Test maddesi tek başına sadece yüksek dozlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu, yine sadece yüksek dozlarda Mitomycin C'nin sitotoksik etkisini artırdığı saptanmıştır. S9mix varlığında Sp yaprak ekstraktının genotoksik ve sitotoksik olmadığı fakat Cyclophosphamide'in KKD ve MN oluşumu üzerindeki etkisini azaltarak anti-genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Stachys türlerinin içermiş olduğu bileşenlerin insan sağlığını iyileştirici özellikler içerdiği önceki çalışmalardan anlaşılmaktadır. Özellikle bu türlerin özütlerinde anti-oksidant maddelerin önemli oranda bulunması dolayısıyla anti-genotoksik etki gösterdikleri ve hücreyi korudukları görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan *S.petrokosmos* türü de insan lenfositlerinde özellikle metabolik aktivatör varlığında anti-genotoksik etki gösterdiği ve hücreyi Cyp'in genotoksik etkisinden koruduğu saptanmıştır. Fakat bu türün özütünde hangi maddelerin ve ne oranda bulundukları bilinmemektedir. Bu maddelerin saptanması ve özellikle anti-oksidant özelliğe sahip maddenin belirlenmesi bu türün etki mekanizmasını daha iyi anlamamızı sağlayacak ve belki de alternatif tıpta yeni bir tedavi seçeneği olabilecektir.

KAYNAKLAR

- AHMAD, V.U., ARSHAD, S., BADER, S., IQBAL, S. KHAN, A., KHAN, S.S., HUSSAIN, J., TAREEN, R.B. and AHMED, A., 2008. New Terpenoids from *Stachys parviflora* Benth. *Fitoterapia*, 79(7-8): 595-597.
- AKSOY, C., YÜCECAN, S., ÇİFTÇİ, N., TAYFUR, M., AKGÜN, B., ve TAŞCI, N., 1988. Kanser Hastalığında Tedavi Amacıyla Kullanılan Yöresel Bitkiler. *Beslenme ve Diyet Dergisi* , 17: 111-120.
- ALBERTINI, R.J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T., NORPPA, H., SHUKER, D.E., TICE, R., WATERS, M.D. and AITIO, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety*. 463(2): 111-72.
- ALKHATIB, R., JOHA, S., CHEOK, M., ROUMY, V., IDZIOREK, T., PREUDHOMME, C., QUESNEL, B., SAHPAZ, S., BAILLEUL, F., and HENNEBELLE, T., 2010. Activity of Ladanein on Leukemia Cell Lines and Its Occurrence in *Marrubium vulgare*. *Planta. Med.*, 76: 86–87.
- AMIRGHOFRAN, Z., BAHMANI, M., AZADMEHR, A., and JAVIDNIA, K., 2006. Anticancer Effects of Various Iranian Native Medicinal Plants on Human Tumor Cell Lines. *Neoplasma*, 53: 428-433.
- AMIRGHOFRAN, Z., BAHMANI, M., AZADMEHR, A., and JAVIDNIA, K., 2007. Immunomodulatory and Apoptotic Effects of *Stachys obtusirena* on Proliferative Lymphocytes. *Med. Sci. Monit.*, 13(6): 145-150.
- ANDERSON, D., 1988. Human Biomonitoring. *Mutation Res.*, 204: 353-541.
- BASARAN, A.A., YU, T.W., PLEWA, M.J., and ANDERSON, D., 1996. An Investigation of Some Turkish Herbal Medicines in *Salmonella typhimurium* and in the COMET Assay in Human Lymphocytes. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 16: 125-138.
- BAYTOP, T. 1999. Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi, Geçmişte ve Bugün. İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, 550s.

- BIANCHINI, F., and VAINIO, H., 2001. Allium Vegetables and Organosulfur Compounds: Do They Help Prevent Cancer?. *Environ. Health. Perspect.*, 109(9): 893-902.
- BONASSI, S., HAGMAR, L., STRÖMBERG, U., MONTAGUD, A.H., TINNERBERG, H., FORNI, A., HEIKKILÄ, P., WANDERS, S., WILHARDT, P., HANSTEEN, I.L., KNUDSEN, L.E. and NORPPA, H., 2000. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. *Cancer Res.*, 60: 1619-1625.
- BONASSI, S., UGOLINI, D., KIRSCH-VOLDERS, M., STRÖMBERG, U., VERMEULEN, R., and TUCKER, J.D., 2005. Human Population With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Prospectives. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 45: 258-270.
- BONASSI, S., ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W.P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M.P., BOLOGNESI, C., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., FUCIC, A., HAGMAR, L., JOKSIC, G., MARTELLI, A., MIGLIORE, L., MIRKOVA, E., SCARFI, M.R., ZIJNO, A., NORPPA, H., and FENECH, M., 2007. An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. *Carcinogenesis*, 28: 625-631.
- BONASSI, S., ZNAOR, A., NORPPA, H. and HAGMAR, L. 2004. Chromosomal Aberrations and Risk of Cancer in Humans: an Epidemiologic Perspective. *Cytogenet. Genome Res.*, 104: 376-382.
- BURKEY, J.L., SAUER, J.M., McQUEEN, C.A. and SIPESI, G., 2000. Cytotoxicity and Genotoxicity of Methyleugenol and Related Congeners-a Mechanism of Activation for Methyleugenol. *Mutation Res.*, 453: 25-33.
- CARRANO, A.V. and NATARAJAN A.T., 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutation Res.*, 204: 379-406.
- CARRANO, A.V., THOMPSON, L.H., LINDI, P.A. and MINKLER, J.L., 1978. Sister Chromatid Exchanges As An Indicator Of Mutagenesis. *Nature*, 271, 551-553.

- CHENG, M., CONNER, M.K. and ALARIA, Y., 1981. Potency of Some Carbamates as Multiple Tissue Sister Chromatid Exchanges in Bloom's Syndrome Lymphocytes. *Cancer Res.*, 71: 4508-4512.
- CHENG, T.J., CHRISTIANI, D.C., XU, X., WAIN, J.C., WIENCKE, J.K. and KELSEY, K.T., 1996. Increased Micronucleus Frequency in Lymphocytes from Smokers with Lung Cancer. *Mutation Res.*, 349: 43-50.
- CHIANG, T.A., WU, P.F., WANG, L.F., LEE, H., LEE, C.H., and KO, Y.C., 1997. Mutagenicity and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content of Fumes from Heated Cooking Oils Produced in Taiwan. *Mutation Res.*, 381(2): 157-161.
- COULADIS ,M., TZAKOU, O., VERYKOKIDOU, E., and HARVALA, C., 2003. Screening of Some Greek Aromatic Plants for Antioxidant Activity. *Phytother. Res.*, 17, 194–195.
- ÇELİK, E. ve ÇELİK, G.Y., 2007. Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2): 1-6.
- ÇELİK, M., ÜNAL, F., YÜZBAŞIOĞLU, D., YILMAZ, S., AKSOY, H. and KARAMAN, Ş., 2006. Effects of *Thymus kotschyanus* var. *Glabrescens* Boiss. Extract on Mitomycin-C Induced Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in Human Lymphocytes. *Cytotechnology*, 51: 99-104.
- DELAZAR, A., CELIK, S., GOKTURK, R.S., UNAL, O., NAHAR, L., and SARKER, S.D., 2005. Two Acylated Flavonoid Glycosides from *Stachys bombycina*, and Their Free Radical Scavenging Activity. *Pharmazie.*, 60(11): 878-880.
- DELLARCO, V.L., MAVOURNIN, K.H. and TICE, R.R., 1985. Aneuploidy and Health Risk Assessment: Current Status and Future Directions. *Environ. Mutagen.*, 7: 405-424.
- DUFFAUD, F., ORSIERE, T., VILLANI, P., PELISSIER, A. L., VOLOT, F., FAVRE, R. and BOTTA, A., 1997. Comparison Between Micronucleated Lymphocytes Rates Observed in Healthy Subject and Cancer Patients. *Mutagenesis*, 12: 227-231.
- FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E. and BONASSI, S., 1999. The Human Micronucleus Project-An International Collaborative Study

- on the Use of the Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans. *Mutation Res.*, 428: 271-283.
- FENECH, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Res.* 455, 81–95.
- FENECH, M., 2002. Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. *Toxicology*, 181: 411-416.
- GIULIANI, C., PELLEGRINO, R.M., TIRILLINI, B., and BINI, L.M., 2009. Composition of Essential Oils from Leaves and Flowers of *Stachys germanica* subsp. *salviifolia* (Ten.) gams (Labiatae) and Related Secretory Structures. *Nat. Prod. Commun.* 4(6): 831-834.
- HAGMAR, L., BROGGER, A., HANSTEEN, I.L., HEIM, S., HÖGSTEDT, B., KNUDAEN, L., LAMBERT, B., LINNAINMAA, K., MITELMAN, F., NORDENSON, I., REUTERWALL, C., SALOMAA, S., SKERFVING, S. and SORSA, M., 1994. Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Res.*, 54: 2919-2922.
- HÁZNAGY-RADNAI, E., CZIGLE, S., ZUPKÓ, I., FALKAY, G., and MÁTHE, I., 2006. Comparison of Antioxidant Activity in Enzyme-Independent System of Six *Stachys* species. *Fitoterapia*, 77(7-8): 521-524.
- HÁZNAGY-RADNAI, E., RÉTHY, B., CZIGLE, SZ., ZUPKÓ, I., WÉBER, E., MARTINEK, T., FALKAY, G.Y., and MÁTHÉ, I. 2008. Cytotoxic activities of *Stachys* species. *Fitoterapia*, 79(7-8): 595-597.
- HEDDLE, J.A., CIMINO, M.C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M.D., TUCKER, J.D., VANPARYS, P. and Mac GREGOR, J.T., 1991. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 18: 277-291.
- HELLEDAY, T., 2003. Pathways for Mitotic Homologous Recombination in Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 532: 103-115.
- HELM, C.W., RICHARD, S.D., PAN, J., BARTLETT, D., GOODMAN, M.D., HOEFER, R., LENTZ, S.S., LEVINE, E.A., LOGGIE, B.W., METZINGER, D.S., MILLER, B., PARKER, L., SPELLMAN, J.E., SUGARBAKER, P.H., EDWARDS, R.P., and RAI, S.N., 2010. Hyperthermic Intraperitoneal

- Chemotherapy in Ovarian Cancer: First Report of the HYPER-O Registry. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 20(1): 61-69.
- HOLLMAN, P.C.H., HERTOOG, M.G.L., and KATAN, M.B., 1996. Analysis and Health Effects of Flavonoids. *Food. Chem.*, 57: 43-46.
- <http://www.ilacabak.com>, erişim:11.02.2010, saat: 16.35
- IVANOVA, A., NECHEV, J., TSVETKOVA, I., STEFANOV, K., and POPOV, S., 2009. Chemical Composition of The Halophyte Plant *Stachys maritima* Gouan from the Bulgarian Black Sea coast. *Nat. Prod. Res.*, 23(5): 448-454.
- JAIN, S., SHRIVASTAVA, S., NAYAK, S. and SUMBHATE, S., 2007. PHCOG MAG: Plant Review, Recent Trends in *Curcuma longa* Linn. *Pharmacognosy Reviews*, 1: 119-128.
- KARAKAYA, S., and KAVAS, A., 1999. Antimutagenic Activities of Some Foods. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 237-242
- KARIOTI, A., SKOPELITI, M., TSITSILONIS, O., HEILLMAN, J., and SKALTSA, H., 2007. Cytotoxicity and Immunomodulating Characteristics of Labdane Diterpenes from *Marrubium Cylleneum* and *Marrubium velutinum*. *Phytochemistry*, 68; 1587–1594.
- KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTTEN, F.J. and SPEIT, G., 1991. Evaluation of The Mutagenicity of beta-myrcene in Mammalian Cells in Vitro. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18(1), 28-34.
- KHANUM, F., ANILAKUMAR, KR., and VISWANATHAN, KR., 2004. Anticarcinogenic Properties of Garlic: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44(6): 479-488.
- KIRSCH-VOLDERS, M., ELHAJOUJI, A., CUNDARI, E. and VAN HUMMELEN, P., 1997. The In Vitro Micronucleus Test: A Multi-endpoint Assay to Detect Simultaneously Mitotic Delay, Apoptosis, Chromosome Breakage, Chromosome Loss and Non-disjunction. *Mutation Res.*, 392 (1-2): 19-30.
- KIRSCH-VOLDERS, M., SOFUNI, T., AARDEMAC, M., ALBERTINI, S., EASTMOND, D., FENECH, M., ISHIDATE, JR.M., KIRCHNER, S., LORGE, E., MORITA, T., NORPPA, H., SURRALLES, J., VANHAUWAERT, A. and

- WAKATA, A., 2003. Report from the in vitro Micronucleus Assay Working group. *Mutation Res.* 540: 153–163.
- KUKIĆ, J., PETROVIĆ, S., and NIKETIC, M., 2006. Antioxidant Activity of Four Endemic *Stachys* Taxa. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(4): 725-729.
- LEAL-CARDOSO, J.H. and FONTELES, M.C.1999. Pharmacological Effects of Essential Oils of Plants of the Northeast of Brazil. *An Acad. Bras. Cienc.*, 71(2): 207-213.
- LENHERR, A. , MEIER, B. and STICHER, O., 1984. Modern HPLC as a Tool for Chemotaxonomical Investigations: Iridoid Glucosides and Acetylated Flavonoids in the Group of *Stachys recta*1. *Planta Med.*, 50(5): 403-409.
- LOIZZO, M.R., MENICHINI, F., TUNDIS, R., BONESI, M., CONFORTI, F., NADJAFI, F., STATTI, G.A., FREGA, N.G., and MENICHINI, F., 2009. In vitro Biological Activity of *Salvia leriifolia* Benth Essential Oil Relevant to the Treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Oleo Science.* 58(8): 443-446.
- MACE, M.L.J., DASKAL, Y. and WRAY, W., 1978. Scanning Electron Microscopy of Chromosome Aberrations. *Mutation Res.*, 52: 199–206.
- MADHAVI, D., DEVIL, K.R., RAO, K.K., and REDDY, P.P., 2007. Modulating Effect of *Phyllanthus* Fruit Extract Against Lead Genotoxicity in Germ Cells of Mice. *Environ. Biol.*, 28(1): 115-117.
- MARON, D.M., and AMES, B.N. 1983. Revised Method for the Salmonella Mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113: 173-215.
- MATKOWSKI, A., and PIOTROWSKA, M., 2006. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Some Medicinal Plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77: 346-353.
- MILNER, J.A., 2001. A Historical Perspective on Garlic and Cancer. *Nutr.* 131(3): 1027-1031.
- MURATA, T., ENDO, Y., MIYASE, T., and YOSHIZAKI, F., 2008. Iridoid Glycoside Constituents of *Stachys lanata*. *Nat. Prod.*, 71(10): 1768-1770.
- NORPPA, H. and FALCK, G.C.M., 2003. What Do Human Micronuclei Contain? *Mutagenesis*, 18 (3): 221-233.

- NORPPA, H., BONASSI, S., HANSTEEN, I.L., HAGMAR, L., STRÖMBERG, U., RÖSSNER, P., BOFFETTA, P., LINDHOLM, C., GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIÁNOVÁ, E., ŠRÁM, R.J., KUNUDSEN, L.E., BARALE, R. and FUCIC, A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. *Mutation Res.*, 600: 37-45.
- OZTURK, M., DURU, M.E., AYDOĞMUŞ-OZTÜRK, F., HARMANDAR, M., MAHLİÇLİ, M., KOLAK, U., and ULUBELEN, A., 2009. GC-MS Analysis and Antimicrobial Activity of Essential oil of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea*. *Nat Prod Commun.* 4(1):109-114.
- PAZ-Y-MINO, C., BUSTAMANTE, G., SANCHEZ, M.E. and LEONE, P.E., 2002. Cytogenetic Monitoring in a Population Occupationally Exposed to Pesticides in Ecuador. *Environ. Health Perspective.* 110: 1077-1080.
- PERRY, P. and EVANS, H.J., 1975. Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure By Sister Chromatid Exchange. *Nature.* 258: 121-125.
- PERUMAL, V., SOLOMON, P.F., JAYANTH, V.R., 2009. Modification of 2-deoxy-D-Glucose on Radiation-and Chemotherapeutic Drug-induced Chromosomal Aberrations. *Cancer Res. Ther.*, 5:48-52.
- QU, Y.H., XU, G.X., ZHOU, J.Z., CHEN, T.D., ZHU, L.F., SHIELDS, P.G., WANG, H.W. and GAO, Y.T., 1992. Genotoxicity of Heated Cooking Oil Vapors. *Mutation Res.*, 298(2): 105-111.
- RENCÜZOGULLARI, E. and TOPAKTAS, M., 1991. The Relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(3): 19-24.
- ROBIDOUKS, A., BUZDAR, A.U., QUINAUX, E., JACOBS, S., RASTOGI, P., FOURCHOTTE, V., YOUNAN, R.J., PAJON, E.R., SHALABY, I.A., DESAI, A.M., FEHRENBACHER, L., GEYER, C.E. Jr., MAMOUNAS, E.P., and WOLMARK, N., 2010. A Phase II Neoadjuvant Trial of Sequential Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel Followed by 5-Fluorouracil/ Epirubicin/ Cyclophosphamide in Locally Advanced Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer*, 10(1): 81-86.

- SAJJADI, M.H., and AMIRI, H., 2007. Chemical Constituents of the Essential Oils of Different Stages of the Growth of *Stachys lavandulifolia* Vahl. from Iran. *Pak J Biol Sci.*, 10(16): 2784-2786.
- SAVAGE, J.R.K., 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. *Env. Mol. Mutagen.*, 22: 198-207.
- SAVIĆ, M.M., KUKIĆ, J.M., GRAYER, R.J., MILINKOVIĆ, M.M., MARIN, P.D., DIVLJAKOVIĆ, J., VAN LINN, M., COOK, J.M., and PETROVIĆ, S.D., 2010. Behavioural Characterization of Four Endemic *Stachys* taxa. *Phytother Res.* DOI: 10.1002/ptr.3106.
- SHIN, T.Y., 2004. *Stachys Riederi* Inhibits Mast Cell-Mediated Acute and Chronic Allergic Reactions. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 26(4): 621-630.
- SHUKLA, Y., and TANEJA, P., 2002. Mutagenic Potential of Cypermethrin in Mouse Dominant Lethal Assay. *Environ Pathol Toxicol Oncol.*, 21(3): 259-265.
- SIDDIQUE, Y.H., ARA G., BEG, T., and AFZAL, M., 2008. Possible Modulating Action of Plant Infusion of *Ocimum sanctum* L. on Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges Induced by Chlormadinone Acetate in Human Lymphocytes in Vitro. *J Environ Biol.*, 29(6): 845-848.
- SLAMENOVÀ, D., MASTEROVÀ, I., LABAJ, J., HORVATHOVA', E., KUBALA, P., JAKUBIKOVA', J., and WSOLOVA, L., 2004. Cytotoxic and DNA-Damaging Effects of Diterpenoid Quinones from the Roots of *Salvia officinalis* L. on Colonic and Hepatic Human Cells Cultured in vitro. *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology*, 94: 282-290.
- SONODA, E., SASAKI, M.S., MORRISON, C., YAMAGUCHI-IWAI, Y., TAKATA, M. and TAKEDA, S., 1999. Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (7): 5166-5169.
- SOWJANYA, B.L., DEVI, K.R., and MADHAVI, D., 2009. Modulatory Effects of Garlic Extract Against the Cyclophosphamide Induced Genotoxicity in Human Lymphocytes in vitro. *J. Environ. Biol.*, 30(5): 663-666.
- SPEIT, G. and HAUPTER, S., 1985. On the Mechanism of Differential Giemsa Staining of Bromodeoxyuridine Substituted Chromosomes. II. Differences

- Between the Demonstration of Sister Chromatid Differentiation and Replication Patterns. Human Gen., 70: 126-129.
- SURRALLÉS, J., XAMENA, N., CREUS, A. and MARCOS, R. 1995. The Suitability of the Micronucleus Assay in Human Lymphocytes as a New Biomarker of Excision Repair. Mutation Res., 342: 43-59.
- ŞARER, E. 1991. Uçucu Yağların Biyolojik Etkileri ve Tedavide Kullanımları, 9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler Kitapçığı, Eskişehir.
- TOPAKTAŞ, M. and SPEIT, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. Ç.Ü. Sağlık Bil. Der., 5(1,2,3), 73-84.
- TOPAKTAŞ, M. ve RENCÜZOĞULLARI, E., 2010. Sitogenetik. Genişletilmiş ve Düzeltilmiş 2.Bskı, Nobel Yayınları, 176s.
- TUCKER, J.D., AULETTA, A., CIMINO, M.C., DEARFIELD, K.L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R.R. and CARRANO, A.V., 1993. Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. Mutation Res., 297: 101-180.

ÖZGEÇMİŞ

Kahramanmaraş'ta 1983 yılında doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Kahramanmaraş'ta tamamladıktan sonra 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü okumaya hak kazandı. 2007 yılında lisans eğitimini tamamlayarak Biyolog ünvanını aldı. 2007 yılında aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimime başladı.