

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet BÜYÜKLEYLA

**THYMOL'ÜN İNSAN LENFOSİTLERİNDE KARDEŞ KROMATİD
DEĞİŞİMİ, KROMOZOM ANORMALLİĞİ VE MİKRONÜKLEUS
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**THYMOL'ÜN İNSAN LENFOSİTLERİNDE KARDEŞ KROMATİD
DEĞİŞİMİ, KROMOZOM ANORMALLİĞİ VE MİKRONÜKLEUS
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ**

Mehmet BÜYÜKLEYLA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez 08/08/2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

İmza.....

İmza.....

İmza.....

Doç.Dr.Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Prof.Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Doç. Dr. Hasan Basri İLA

DANIŞMAN

ÜYE

ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

İmza ve Mühür

**Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
Desteklenmiştir. Proje No: FEF2006YL58**

☐ **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

**THYMOL'ÜN İNSAN LENFOSİTLERİNDE KARDEŞ KROMATİD
DEĞİŞİMİ, KROMOZOM ANORMALLIĞI VE MİKRONÜKLEUS
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ**

Mehmet BÜYÜKLEYLA
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Yıl : 2007, Sayfa: 77
Jüri : Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Doç. Dr. Hasan Basri İLA

Thymol'ün insan periferel lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada thymol'ün 25, 50, 75 ve 100 µg/ml'lik dozları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir. Thymol'ün genotoksik etkisi, kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormallliği (KA) ve mikronükleus (MN) testleriyle, sitotoksik etkisi de nükleer bölünme indeksi (NBI), replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeksin (MI) saptanmasıyla belirlenmiştir.

Bu çalışmada, thymol özellikle düşük dozlarda KKD sayısını istatistiksel bakımından önemli derecede artırırken yüksek dozlarda KKD sayısını artırmış fakat istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır. Diğer taraftan thymol tüm dozlarda hem yapısal KA sayısını hem de MN oluşumunu indüklemiş, sayısal KA oluşumunu ise artırmamıştır. Ortalama KKD, yapısal KA yüzdesi ve MN oluşumunda doz-etki ilişkisine rastlanmamıştır. Thymol özellikle yüksek dozlarda ve her iki muamele süresinde NBI'ni doza bağlı bir şekilde düşürmüştür. Thymol, RI'ni 24 saatlik muamele süresinde düşürmesine rağmen istatistiksel bakımından önemli bulunamamış, fakat 48 saatlik muamele süresinde RI'ni en yüksek dozda önemli derecede düşürmüş bu düşüş doza bağlı olarak gerçekleşmiştir. Thymol MI'i özellikle yüksek dozlarda düşürmüş fakat doz-etki ilişkisine rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Thymol, insan periferel lenfositleri, kardeş kromatid değişimi, kromozom anormallliği, mikronükleus

ABSTRACT

MSc THESIS

THE EFFECTS OF THYMOL ON SISTER CHROMATID EXCHANGE, CHROMOSOME ABERRATION AND MICRONUCLEUS FORMATION IN HUMAN LYMPHOCYTES

Mehmet BÜYÜKLEYLA

DEPARTMENT OF BIOLOGY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Year : 2007, Pages: 77

Jury : Assoc. Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Assoc. Prof. Dr. Hasan Basri İLA

In the present study, the genotoxic and cytotoxic effects of thymol were investigated in human peripheral lymphocytes treated with 25, 50, 75 and 100 µg/ml concentrations of thymol for 24 and 48 hours treatment periods. The genotoxicity of thymol was investigated by studying sister chromatid exchange (SCE), chromosome aberration (CA) and micronucleus (MN) tests. Nuclear division index (NDI), replication index (RI) and mitotic index (MI) were also calculated to determine the cytotoxicity of thymol.

Thymol significantly increased the mean SCE especially at the lower concentrations. Thymol also increased the mean SCE at the highest concentrations without statistical significance. On the other hand, thymol induced both the structural CA and frequency of MN at all concentrations. However, thymol could not induce the numerical CA. There were no dose-dependent effects between mean SCE, structural CA, frequency of MN and concentrations of thymol. Thymol dose-dependently decreased the NDI for two treatment periods. Thymol decreased the RI for 24 hours treatment time without statistical significance. However, decreased the RI for 48 hours treatment time in a dose-dependent manner. Thymol also decreased the MI especially at the higher concentrations. However, no dose-dependent effect was observed.

Key Words: Thymol, 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 **Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI**'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarından dolayı Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Hocam **Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ**'a ve **Doç. Dr. Hasan Basri İLA**, **Arş.Grv. Ayşe YAVUZ KOCAMAN**'a, **Biyolog Şebnem PARLAK**'a ve **Biyolog Semir CANIMOĞLU**'na teşekkür ederim.

Projemizi maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Araştırma Fonu yöneticilerine de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IIIIV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XI
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
2.1. Uçucu Yağların Ana Komponentleri İle Yapılmış Olan Genotoksisite	
Çalışmaları.....	6
2.1.1 Anethole Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	6
2.1.2. Carvacrol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	6
2.1.3. S(+)-Carvone Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları....	7
2.1.4. Cinnamaldehyde Komponenti ile Yapılan Genotoksisite	
Çalışmaları.....	8
2.1.5. Citral Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	8
2.1.6. Ellagic Acid Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları...	9
2.1.7. Estragole Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	9
2.1.8. Eucalyptol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları....	9
2.1.9. Eugenol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	9
2.1.10. Isosafrole Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	10
2.1.11. (-) - Menthol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	11
2.1.12. (+)- α -Pinene Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	11
2.1.13. Safrole Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	11
2.2.14. Tannic Acid Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları...	12
2.1.15. γ -Terpinene Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları...	12
2.1.16. Terpineol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	12
2.2. Test Maddesi Thymol İle Yapılmış Olan Genotoksisite Çalışmaları...	13

3. MATERİYAL VE METOD.....	15
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	15
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	15
3.1.1.1. Thymol.....	15
3.1.1.2. Dimethyl Sulfoxide (DMSO).....	16
3.1.1.3. Kromozom Medyumu.....	16
3.1.1.4. Kolşisin (Kolkisin).....	17
3.1.1.5. Hipotonik Eriyik.....	17
3.1.1.6. Fiksatif.....	17
3.1.1.7. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU).....	18
3.1.1.8. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	18
3.1.1.9. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği.....	18
3.1.1.10. Giemsa.....	19
3.1.1.11. Entellan.....	19
3.1.1.12. Nitrik Asit (HNO ₃).....	19
3.1.1.13. Ethyl methanesulfonate (EMS).....	19
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	20
3.1.2.1. Hassas Terazî.....	20
3.1.2.2. Santrifüj.....	20
3.1.2.3. Mikroskop.....	20
3.1.2.4. İnkübatör.....	20
3.1.2.5. pH Metre.....	21
3.2. Lamların Temizlenmesi.....	21
3.3. 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, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler.....	21

3.3.1. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması.....	22
3.3.2. Preparatların Boyanması.....	23
3.3.3. Mikroskopik İnceleme.....	24
3.3.3.1. KKD ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması.....	24
3.3.3.1.(1). KKD Sayısının Saptanması.....	24
3.3.3.1.(2). Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması.....	25
3.3.3.2. Kromozomal Anormallikler (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	30
3.3.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması.....	30
3.3.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	31
3.4. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler.....	31
3.4.1. Mikronukleus Sayısını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması.....	31
3.4.2. Preparatların Boyanması.....	33
3.4.3. Mikroskopik İnceleme.....	33
3.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	35
3.6. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	35
4.BULGULAR.....	37
4.1. Thymol'ün KKD Üzerindeki Etkileri.....	37
4.2. Thymol'ün Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	40

4.3. Thymol'ün Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleer Bölünme İndeksi Üzerine Etkileri.....	47
4.4. Thymol'ün DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri.....	52
5. TARTIŞMA.....	56
5.1. Thymol'ün İnsan Periferik Lenfositlerinde KKD, KA ve MN Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	56
5.2. Thymol'ün Hücre Bölünmesi Üzerine Etkisi.....	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1. Değişik dozda thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde ortalama Kardeş Kromattid Değişimi (KKD) sayısı.....	38
Çizelge.4.2. Değişik dozda thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde yapısal kromozom anormallikleri (KA).....	41
Çizelge 4.3. Değişik dozlarda thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde mikronükleuslu (MN) binükleer hücre yüzdesi ve nükleer bölünme indeksi (NBI).....	48
Çizelge 4.4. Değişik dozda thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde Replikasyon İndeksi (RI) ve Mitotik İndeks (MI).....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Thymol'un açık formülü.....	16
Şekil 3.2. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi.....	25
Şekil 3.3. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.....	26
Şekil 3.4. BrdU'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması.....	28
Şekil 3.5. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.....	29
Şekil 3.6. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.....	29
Şekil 3.7. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.....	30
Şekil 3.8. Bir ve iki nükleus içeren hücreler.....	34
Şekil 3.9. Üç ve dört nükleus içeren hücreler.....	35
Şekil 4.1. Farklı dozlarda thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde KKD/Hücre	38
Şekil 4.2. Thymol ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (50 µg/ml, 24 saat, ♀).....	39
Şekil 4.3. EMS ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde indüklenmiş kardeş kromatid değişimi (0.7 µg/ml, 24 saat, ♀).....	39
Şekil 4.4. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde yapısal KA yüzdesi.....	42
Şekil 4.5. Thymol ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kromatid kırığı (25 µg/ml, 24 saat, ♂).....	42
Şekil 4.6. Thymol ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kromatid kırığı (25 µg/ml, 24 saat, ♂).....	43
Şekil 4.7. Thymol ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde tek kromatid birleşmesi (100 µg/ml, 48 saat, ♂).....	43
Şekil 4.8. Thymol ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kromozom kırığı (25 µg/ml, 24 saat, ♀).....	44
Şekil 4.9. Thymol ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kardeş	

kromatid birleşmesi (25 µg/ml, 48 saat, ♀).....	44
Şekil 4.10. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde fragment (50 µg/ml, 48 saat, ♀).....	45
Şekil 4.11. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde fragment..	45
Şekil 4.12. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde poliploid hücre ve kromatid kırığı (50 µg/ml, 24 saat, ♂).....	46
Şekil 4.13. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde poliploid hücre (50 µg/ml, 24 saat, ♀).....	46
Şekil 4.14. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MN'li binükleer hücre yüzdesi.....	49
Şekil 4.15. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde bir mikronükleus içeren binükleer hücre (50 µg/ml, 48 saat, ♀).....	49
Şekil 4.16. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde iki mikronükleus içeren binükleer hücre (75 µg/ml, 24 saat, ♀).....	50
Şekil 4.17. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde 8 mikronükleus içeren binükleer hücre (50 µg/ml, 24 saat, ♀).....	50
Şekil 4.18. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde nükleer bölünme indeksi.....	51
Şekil 4.19. Farklı dozlarda thymol ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde nükleer bölünme indeksinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.03).....	51
Şekil 4.20. Farklı dozlarda thymol ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde nükleer bölünme indeksinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.04).....	52
Şekil 4.21. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde replikasyon indeksi.....	54
Şekil 4.22. Farklı dozlarda thymol ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde replikasyon indeksinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.03).....	54
Şekil 4.23. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde mitotik indeks.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADI	:Günlük Alınabilir Miktar (Acceptable Daily Intake)
ATP	:Adenozin trifosfat
BrdU	:5'-Bromo-2'-Deoxyuridine
CA	:Chromosome Aberration
CHO	:Çin Hamster Ovaryum
dT	:Deoxytimidin
dU	:Deoxyuridine
DNA	:Deoksiribonukleik Asit
DMSO	:Dimethyl sulfoxide
EMS	:Ethyl methanesulfonate
IQ	:2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline
i.p.	:Intraperitoneal
K	:Potasyum
KA	:Kromozomal Anormallikler
KCl	:Potasyum klorür
KD	:Kromatid Değişimi
KKD	:Kardeş Kromatid Değişimi
MMC	:Mitomycin C
MI	:Mitotik indeks
MN	:Mikronükleus
NaCl	:Sodyum klorür
NBI	:Nükleer Bölünme İndeksi
NDI	:Nuclear Division Index
NOEL	:No Observed Effect Level (Etkinin Görülmediği Doz)
NTP	:National Toxicology Program (Uluslararası Toksikoloji Programı)
RI	:Replikasyon indeksi
rpm	:Round (Rotor) Per Minute (devir/dakika)
SCD	:Kardeş kromatidlerin farklı boyanması
SCE	:Sister Chromatid Exchange

SE	:Standart Error (Standart Hata)
SHE	:Syrian Hamster Embrio
SSC	:Standart Saline Citrate
SU	:Sister Union
UDS	:Unscheduled DNA Synthesis (Programsız DNA Sentezi)
UV	:Ultraviole (Morötesi)
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

1. GİRİŞ

Bitkiler insan uygarlığının başından beri tedavi amacıyla kullanılmış önemli kaynaklardır (Jain ve ark. 2007). Tıpta bitkilerin kullanımı muhtemelen insanın varlığından beri başlamıştır (Çelik ve ark., 2006). Hakkari'nin güneyindeki Şanidar Mağarasında ortaya çıkartılan Neanderthal mezarlar içerisinde bitki örneklerinin çıkması Anadolu insanının Paleolitik (Yontma taş) devrinden beri bitkileri tedavi amacı ile kullandığını göstermektedir. Eski çağlarda hem yabani bitkilerden, hem de kültürleri yapılarak üretilen bitkilerden ilaç yapımında faydalanılmıştır (Gürsoy ve Gürsoy, 2004). 20. yüzyılda tıp biliminin muazzam bir şekilde gelişmesine rağmen bitkilerin geleneksel tıpta kullanımı halen devam etmektedir (Jain ve ark. 2007).

91 ülkenin tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı çalışmalara dayanarak yapılan bir araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarının 20.000 ton kadar olduğu belirtilmiştir (Çelik ve Çelik, 2007). 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).

Esansiyel yağlar bitkilerin çiçek, tomurcuk, tohum, yaprak, meyve sapı, kabuk, odun, meyve ve köklerinden elde edilen aromatik yağlı sıvılardır (Burt, 2004). Bu yağlar mekanik presleme, distilasyon veya organik çözücülerde çözülmesi yöntemi ile bitkiden izole edilirler (Stammati ve ark., 1999; Mezzoug ve ark., 2007).

Uçucu yağlar aromatik bitkilerin esansiyel yağlarında doğal olarak bulunan bileşenler olup (İpek ve ark., 2005; Rozman ve ark., 2006), oda sıcaklığında sıvı (bazen donabilen) uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır (Çelik ve Çelik, 2007). Bu uçucu yağlar terpen, alkol, aldehid ve fenol içeren birkaç kimyasal bileşenin oluşturduğu kompleks karışımlardır (Prashar ve ark., 2004). Bitki uçucu yağları uzun yıllardan beri değişik amaçlara yönelik, özellikle bilimsel ve ticari olarak birçok alanda kullanılmaktadır (Çelik ve Çelik, 2007). Bu kullanım alanlarının

başında ilaç sanayisi, kozmetik ve parfümeri (güzel koku sağlamada), yiyecek endüstrisi (baharat, tatlandırıcı ve koruyucu madde olarak), ev temizlik ürünleri imalatı ve insektisit imalatı gelmektedir. Buna ilaveten çoğu uçucu yağ ve bileşenleri kas gevşetici, antibakteriyel ve antifungal olarak da kullanılmaktadır (De Oliveira ve ark., 1997; Gomes-Carneiro ve ark., 1998; Evandri ve ark., 2005; Benli ve Yiğit, 2005; İpek ve ark., 2005).

Uçucu yağlar lipofilik özellikleri ile hücre membranının bir tarafından diğer tarafına kolayca geçebildiklerinden dolayı uçucu yağlar tıpta kullanılmaktadır (Mezzoug ve ark. 2007). Son yıllarda antibiyotiklere karşı dirençli suşların ortaya çıkması ve doğal kaynaklı ilaçlarda görülmeyen veya az görülen yan etkilerin, sentetik ilaçlarda dikkati çekecek kadar çok olması bilim insanlarını doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya yöneltmiştir (Benli ve Yiğit, 2005). Esansiyel yağlarda bulunan thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde ve eugenol zararlı ve patojen mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olan önemli aktif bileşiklerdir (Di Pasqua ve ark., 2006).

Özellikle tıbbi amaçla kullanılan uçucu yağlar ve içerdikleri aromakimyasallar, çeşitlerine ve aerokimyasalların elde edilmesinde kullanılan teknolojiye göre değişik riskler taşımaktadırlar. Carson ve Riley (1995), çay ağacının uçucu yağları ile yapmış oldukları çalışmada bu bitkinin deride allerjik reaksiyonlara sebep olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda kadife çiçeği (*Tagetes patula*) (Bilsland ve Strong, 1990), çay ağacı, limonene, α -terpinene, aromadendrene, terpinen-4-ol, *p*-cymene, α -phellandrene (Knight ve Hausen, 1994) ve lavanta uçucu yağının (Sugiura ve ark., 2000) deriyle temas ya da solunum yolu ile allerjik reaksiyonlara sebep olduğu bildirilmiştir. Halbuki Anton (2000) uçucu yağların birçoğunun kozmetik ürünlerde özellikle de aromaterapide kullanılabileceği ve allerjik reaksiyonlara sebep olmadıklarını bildirmiştir. 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). Bu bileşiklerin en büyük tehlikeleri de mutasyon ve/veya kansere sebep olabilme riskleridir.

Esansiyel yağ bileşiklerinin pek çok amaçla kullanılmalarının yanında, 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 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, 1995). 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.

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan timol (thymol)'ü yapısında bulunduran *Tymbra spicata* (Karabaşkekik, Mercanköşk); ayrıca ester ve uçucu yağ da içermektedir. Yaprak ve çiçekleri antiseptik ve uyarıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1984). Çalışmada kullanılan thymol fenol grubu bileşiklerindendir. Fenolik bileşikler bitki-toprak sisteminde büyük öneme sahip olduğu bilinen çok yaygın sekonder metabolitler arasındadır. Bu bileşikler allelopatik etkileri (canlı ya da çürümüş bitki dokuları tarafından üretilen kimyasal maddelerin çevrelerindeki diğer bitkilerin gelişimine, çoğalmasına ve büyümesine olan olumsuz etkileri) ile hücre ve bitki büyümesini engellemektedirler (Müller ve ark., 1964; Müller ve Del Moral, 1966; Müller ve Hauge, 1967; Müller ve ark., 1968; Tsuzuki ve Kawagoe, 1984; Duke, 1985; Tarayre ve ark., 1995; Seidjova ve Sarapatka, 1997; Gillespie, 1998; Robles ve ark., 1999). Yapılan çalışmalarda, uçucu yağların ana grubu olan monoterpenlerin buğdayın çimlenmesinde bir numaralı büyüme inhibitörü olduğu ve buğday tohumlarının citral gibi monoterpenlere maruz bırakıldığında metabolizmasının engellendiği görülmüştür (Dudai ve ark., 2000). Fenolik bileşikler bitkinin membran geçirgenliğini artırmakta, makro ve mikro besin elementleri

alımını ve düşük pH değerlerinde K alımını engellemekte, bitki büyümesini sağlayan IAA (Indol Asetik Asit)'i bloke eden IAA-oksidazı teşvik ederek gelişmeyi önlemektedir (Lenoir ve ark., 1983; Tansı, 1995).

Dorman ve ark. (2004), *Thymbra spicata* ekstraktının antioksidan bir etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir. Stamatı ve ark. (1999), *T. spicata*'nın aerokimyasalları olan thymol ve carvacrol'un Ames testinde mutajenik etkiye sahip olduklarını saptamışlardır. Halbuki Azizan ve Blevins (1995), thymol'ün herhangi bir mutajenik ya da antimutajenik etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir. *Thymbra spicata*'nın diğer bir ana komponenti olan carvacrol'ün insan lenfositlerinde KKD sayısını artırmadığı, ama MMC'nin KKD oluşumu üzerindeki etkisini azalttığı (İpek ve ark., 2003), aynı şekilde carvacrol'ün S9 mix yokluğunda TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik etkiye sahip olduğu, bununla birlikte S9 mix varlığında ve yokluğunda 2-aminofluorene ve 4-nitro-o-phenylenediamine maddelerinin mutajenik etkilerini inhıbe ettiğı (İpek ve ark., 2005) bildirilmiştir. Ayrıca thymol ve carvacrol'ün sıçan kemik iliğı hücrelerinde yapısal ve sayısal KA yüzdesini artırdığı ve sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Azırak, 2007). Fakat thymol'ün insan periferel lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkileri saptanmamıştır.

İşte bu çalışmanın amacı tıbbi ve aromatik madde olarak gerek eczacılıkta gerekse kozmetikte vazgeçilmez bir bileşen olarak kullanılan *Thymus vulgaris* ve *Thymbra spicata* (zahter) uçucu yağlarının aromakimyasallarından biri olan thymol'ün in vitro insan periferel lenfositlerinde genotoksik etkiye sahip olup olmadığını kardeş kromatid değışimi (KKD = SCE), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırmak ve bu testler yardımı ile insanlar için herhangi bir genotoksik risk oluşturup oluşturmadığını saptamaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**2.1. Uçucu Yağların Ana Komponentleri İle Yapılmış Olan Genotoksisite Çalışmaları****2.1.1. Anethole Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları**

Sekizava ve Shibamoto (1982) anethole maddesinin genotoksik etkisini 3 mikrobiyal test sisteminde çalışmışlardır. Ames Salmonella reversiyon testinde mutajen olduğunu, *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde S9 mix yokluğunda mutajen olmadığını ve *Escherichia coli* WP2 uvrA reversiyon testinde de mutajen olmadığını bildirmişlerdir. Howes ve ark. (1990) anethole'un sıçan karaciğer hücrelerinde UDS'ye (programsız DNA sentezine) sebep olmadığını dolayısıyla karaciğer kanserine sebep olmadığını bildirmişlerdir.

2.1.2. Carvacrol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Stammati ve ark. (1999) antifungal etki gösteren carvacrol'un sitotoksik ve genotoksik etkisini mikroorganizma ve memeliler üzerinde kısa süreli in vitro testlerle araştırmışlardır. DNA tamir testinde *Escherichia coli* WP2 ve bunun izogenik özelliğini taşıyan fakat DNA tamir sistemi eksik olan CM871 suşlarını kullanmışlardır. SOS Kromoteste carvacrol'un toksik olmayan dozlarda DNA'ya zarar vermediğini, Ames testinde TA 100 suşunda S9 mix olmaksızın toksik olmayan dozlarda revertant kolonilerin sayısının arttığını, Hep-2 hücreleri ile yaptıkları çalışmada ise 0.2 mM dozda hücrelerin canlılığının ve bölünmesinin inhibe edildiğini bildirmişlerdir. İpek ve ark. (2003) antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antiparazit etkili olan carvacrol'un genotoksik ve antigenotoksik etkilerini insan lenfositlerinde SCE (KKD: Kardeş Kromatid Değişimi) metodu ile araştırmışlardır. Kullandıkları dozların tümünde de (0.1, 0.5, 1 ve 5 µl/ml) KKD oluşumunda bir artışın olmadığını, MMC'nin sebep olduğu mutajenik etkiyi doza bağlı olarak düşürdüğünü ve memeli hücrelerinde önemli derecede antigenotoksik etkili olduğunu bildirmişlerdir. Aydın ve ark. (2005) carvacrol'un insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerini tek hücre jel

elektroforezi ile incelemişlerdir. Aynı zamanda carvacrol'un 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) ve mitomycin C (MMC) tarafından indüklenen DNA'daki hasara karşı etkileri değerlendirilmiştir. Toksik olmayan 0.05 mM konsantrasyonun aşağısında insan lenfositlerini IQ ve MMC'nin genotoksik etkilerinden korumuş gibi görüldüğünü, fakat 0.1 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda DNA'da tek iplik kırıklarına neden olduğunu belirlemişlerdir. İpek ve ark. (2005) tıpta, yiyecekleri korumada ve tatlandırmada kullanılan carvacrol'un *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları ile Ames Salmonella/ mikrozom testini kullanarak genotoksik ve antigenotoksik etkilerini araştırmışlardır. Carvacrol, S9 mix varlığında ve yokluğunda 4-NPD (4-nitro-o-phenylendiamine) ve 2-AF (2-aminofluorene) tarafından oluşturulan mutajenik etkiyi önemli derecede düşürmüştür. S9 mix yokluğunda TA 98 suşundaki bütün dozajlarda, TA 100 suşunun sadece 0.01 ve 0.05 µl/petri dozlarında revertant koloni sayısında bir artışın olduğunu, S9 mix varlığında TA 98'in 0.01 ve 0.05 µl/petri dozlarını çözücü kontrol (DMSO) ile göre kıyasladıklarında mutajenik etki yarattığını, bütün dozlarda ise TA 100 suşunda mutajenik etkininin olmadığını bildirmişlerdir. Her iki suşta da 1 µl/petri dozunun toksik özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Azırak (2007) carvacrol'un sıçan kemik iliği hücrelerinde hem sayısal hem de yapısal KA sayısını artırdığını bildirmiştir.

2.1.3. S(+)-Carvone Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Stammati ve ark. (1999) antifungal aktivite gösteren carvone'un sitotoksik ve genotoksik etkisini mikroorganizmalarda ve memelilerde kısa süreli in vitro testlerle araştırmışlardır. DNA tamir testinde *Escherichia coli* WP2 ve bunun izogenik özelliğini taşıyan, fakat DNA tamir sistemi eksik olan CM871 suşlarını kullanmışlardır. 0.9 mM dozundaki carvone'un Hep-2 hücrelerinin canlılığını ve bölünmesini inhibe ettiğini, SOS Kromotest ile yapılan çalışmada carvone'un toksik olmayan dozlarında DNA'ya zarar vermediğini, Ames testinde kolonilerin geriye dönüş sayısını arttırmadığını ve DNA tamir testinde ise doza bağlı olarak belirgin bir toksisite gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.1.4. Cinnamaldehyde Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Stammati ve ark. (1999) cinnamaldehyde'in genotosik ve sitotoksik etkilerini memeli ve mikroorganizmalar üzerinde kısa süreli in vitro testlerle çalışmışlardır. Cinnamaldehyde'in 0.3 mM konsantrasyonda Hep-2 hücrelerinin bölünmesini inhibe ettiğini, SOS kromotest ile yapılan çalışmada toksik olmayan dozlarda DNA'ya zarar vermediğini, *E. coli*'nin DNA tamir sistemi olmayan CM871 ve WP2 suşları ile yapılan DNA tamir testinde cinnamaldehyde'in toksik olduğunu, Ames testi ile yaptıkları çalışmada ise *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarında S9 mix varlığında ve yokluğunda mutajen olmadığını bildirmişlerdir. Sekizawa ve Shibamoto (1982) cinnamaldehyde'in genotoksik etkisini 3 mikrobiyal test sisteminde çalışmışlardır. Cinnamaldehyde'in Ames *Salmonella* ve *Escherichia coli* WP2 uvrA reversiyon testlerinde mutajen olmadığını, halbuki *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde S9 yokluğunda mutajen olduğunu bildirmişlerdir. Azizan ve Blevins (1995) *Salmonella typhimurium*'un TA97, TA98 ve TA100 suşlarını kullanarak cinnamaldehyde'in mutajenik aktivitesini incelemişlerdir. S9 metabolik aktivite varlığında ve yokluğunda standart olmayan 120 dakikalık preinkübasyon sonucunda cinnamaldehyde'in mutajen olmadığını bildirmişlerdir.

2.1.5. Citral Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Gomes-Carneiro ve ark. (1998) citral'in mutajenik etkisini *Salmonella*/Mikrozom testi ile araştırmışlardır. S9 varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium*'un TA97a, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşlarını kullanmışlardır. S9 varlığında veya yokluğunda TA 102, TA 100, TA 98 ve TA 97a suşları için revertant kolonilerin sayısında önemli bir artışın gerçekleşmediğini, sonuçta citral'in mutajenik olmadığını bildirmişlerdir.

2.1.6. Ellagic Acid Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Kuo ve ark. (1992) ellagic acid'in antigenotoksik etkisini *Salmonella* suşları ve CHO (Chine Hamster Ovary) hücrelerinde araştırmışlardır. 1-nitropyrene- (1-NP) ve 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP)'in oluşturduğu genotoksik etkiye karşı çok zayıf antigenotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.1.7. Estragole Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Müller ve ark. (1994) sıçan karaciğer hücrelerinde estragole'un programsız DNA sentezini (UDS) indüklediğini bildirmişlerdir. Halbuki V79 hücreleri ile yaptıkları çalışmada direkt muamele ile ve S9 mix varlığında kromozom aberasyonunu arttırmadığını bildirmişlerdir. Sekizawa ve Shibamoto (1982) estragole'un genotoksik etkisini üç mikrobiyal testte incelemişlerdir. Ames *Salmonella* reversiyon testinde, *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde S9 yokluğunda ve *Escherichia coli* WP2 uvrA reversiyon testinde mutajen olmadığını bildirmişlerdir. Howes ve ark. (1990) estragole ile yaptıkları çalışma sonucunda sıçan ve farelerin karaciğer hücrelerinde programsız DNA sentezini uyardığını bildirmişlerdir.

2.1.8. Eucalyptol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Gomes-Carneiro ve ark. (1998) *Salmonella typhimurium*'un TA 97a, TA98, TA 100 ve TA 102 suşlarını kullanarak Salmonella/Mikrozom testi ile eucalyptol'un mutajenik etkilerini araştırmışlardır. S9 mix varlığında ve yokluğunda eucalyptol'un mutajenik etki yaratmadığını bildirmişlerdir.

2.1.9. Eugenol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Abraham (2001) eugenol'ün antigenotoksik etkilerini farelerde incelemiştir. 5 ml/kg vücut ağırlığı dozundaki eugenol'ü gavaj yoluyla farelere verdikten 2 ve 20

saat sonra 10 ml/kg vücut ağırlığı dozundaki genotoksin maddeleri (CPH: cyclophosphamide, PCB: procarbazine, MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, URE: urethane) intraperitoneal (i.p.) yolla farelere vermiştir. Sonuçta eugenol'un bu genotoksinlere karşı antigenotoksik etki gösterdiğini tespit etmiştir. Hikiba ve ark. (2005) dişçilik uygulamalarında kullanılan eugenol'un Suriye Hamster Embriyo (SHE) hücrelerinde kromozom aberasyonlarını oluşturma etkisini araştırmışlardır. Metabolik aktivatör yokluğunda 195 ve 650 µM dozlarındaki eugenol'un SHE hücrelerindeki kromozom aberasyon sayısını istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığını, metabolik aktivatör varlığında 20 ve 65 µM dozlarında istatistiksel olarak önemli derecede anormallik oluşturduğunu bildirmişlerdir. Sekizawa ve Shibamoto (1982) eugenol'un genotoksik etkisini 3 mikrobiyal test sisteminde çalışmışlardır. Ames *Salmonella* ve *Escherichia coli* WP2 uvrA reversiyon testlerinde mutajen olmadığını halbuki S9 yokluğunda *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde mutajen olduğunu belirtmişlerdir. Ramos ve ark. (2003) eugenol'un antimutajenik etkisini *Escherichia coli* IC 188 ile araştırmışlardır. 300-400 µg/petri dozajlarındaki eugenol'un tert-butylhydroperoxide (TBH) tarafından oluşturulan mutajenik etkiyi %50 oranında azalttığını bildirmişlerdir. Azizan ve Blevins (1995) *Salmonella typhimurium*'un TA97, TA98 ve TA100 suşlarını kullanarak eugenol'un mutajenik aktivitesini incelemişlerdir. S9 metabolik aktivite varlığında ve yokluğunda standart olmayan 120 dakikalık preinkübasyon sonucunda eugenol'un mutajen olmadığını bildirmişlerdir. Howes ve ark. (1990) kanserojen olduğu söylenen eugenol'un sıçan karaciğer hücrelerinde UDS'ye (programsız DNA sentezine) sebep olmadığını bildirmişlerdir. Burkey ve ark. (2000) erkek Fischer 344 sıçan ve dişi B6C3F1 farelerinin karaciğer hücrelerini kullanarak eugenol'un UDS (programsız DNA sentezi, unscheduled DNA synthesis)'ye neden olmadığını, 200-300 µM (letal konsantrasyonun yarısı) dozlarında sitotoksik olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.10. Isosafrole Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Howes ve ark. (1990), sıçan karaciğer hücrelerini kullanarak UDS test sistemi ile isosafrole'un DNA sentezi üzerindeki etkisini çalışmışlardır. Isosafrole'un

UDS'yi arttırmadığını, dolayısıyla da karaciğer kanserine sebep olmadığını bildirmişlerdir. Sekizawa ve Shibamoto (1982), isosafrole'un genotoksik etkisini 3 mikrobiyal test sistemi ile çalışmışlardır. Ames *Salmonella* reversiyon test sisteminde, *Bacillus subtilis* DNA tamir testinde S9 yokluğunda ve *Escherichia coli* WP2 uvrA reversiyon testinde mutajenik olmadığını bildirmişlerdir.

2.1.11. (-) - Menthol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Gomes-Carneiro ve ark. (1998) menthol'un mutajenik etkilerini S9 metabolik aktivatörü varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium*'un TA 97a, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşlarını kullanarak Salmonella/Mikrozom testi ile araştırmışlardır. Menthol'un 600-700 µg/petri (TA 97a, TA 98 ve TA 100) ve 200-400 µg/petri (TA 102) dozlarında, S9 metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda revertant (geri dönen) koloni sayısını arttırmadığını bildirmişlerdir.

2.1.12. (+)-α-Pinene Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Gomes-Carneiro ve ark. (2005) bitki uçucu yağı olan (+)-α-pinene'in *Salmonella typhimurium*'un TA 97a, TA 98, TA 100, ve TA 1535 suşlarında S9 mix varlığında ve yokluğunda mutajen olmadığını bildirmişlerdir.

2.1.13. Safrole Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Burkey ve ark. (2000) karaciğer kanserinin bir nedeni olarak bilinen safrole'un sitotoksik ve genotoksik etkilerini erkek Fischer 344 sıçanlarının ve dişi B6C3F1 farelerinin karaciğer hücrelerinde araştırmışlardır. Safrole'un sitotoksik olmadığını fakat karaciğer hücrelerinde 10 ile 500 µM arasındaki konsantrasyonlarda UDS (programsız DNA sentezi)'ye neden olduğunu bildirmişlerdir. Swanson ve ark. (1979) *Salmonella typhimurium*'un TA 98, TA 100 ve TA 1535 suşlarını kullanarak hem NADPH ile güçlendirilmiş sıçan karaciğeri mikrozomu ile hem de NADPH katılmamış sıçan karaciğeri mikrozomu ile safrole'u mutajenik etki bakımından

araştırmışlardır. TA 100 suşunda her iki durumda da safrole'un mutajenik etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

2.1.14. Tannic Acid Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Kuo ve ark. (1992) tannic acid'in antigenotoksik etkisini *Salmonella* suşları ve CHO (Chine Hamster Ovary) hücrelerinde araştırmışlardır. *Salmonella typhimurium*'un TA 98 suşunda 1-nitropyrene- (1-NP) ve 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP)'in oluşturduğu mutajenik etkiyi güçlü bir şekilde düşürdüğünü ve CHO hücrelerinde yaptıkları çalışmada da 1-NP ve 1,6-DNP'in oluşturduğu SCE (KKD) sayısını doza bağlı olarak önemli derecede düşürdüğünü bildirmişlerdir.

2.1.15. γ -Terpinene Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Aydın ve ark. (2005) γ -terpinene'nin insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerini tek hücre jel elektroferezi ile incelemişlerdir. Aynı zamanda γ -terpinene'nin 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) ve mitomycin C (MMC) tarafından indüklenen DNA'daki hasara karşı etkilerini de değerlendirmişlerdir. γ - terpinene'nin 0.1 mM konsantrasyonun aşağısındaki konsantrasyonlarda DNA'da tek iplik kırıklarında bir artışa sebep olmadığını, fakat 0.2 mM konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonda DNA'da tek iplik kırıklarında önemli bir artış olduğunu belirlemişlerdir. Düşük konsantrasyonlarda, IQ ve MMC tarafından DNA'da oluşturulmuş olan tek iplik kırıklarını önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir.

2.1.16. Terpeneol Komponenti ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Gomes-Carneiro ve ark. (1998) terpeneol'ün mutajenik etkisini *Salmonella typhimurium*'un TA 97a, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşlarında metabolik aktivatör (S9 mix) varlığında ve yokluğunda *Salmonella*/Mikrozom testi ile araştırmışlardır. Metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda terpeneol'un 1500-2000 μ g/petri

dozlarına kadar olan dozları kullanılmıştır. TA 97a, TA 98 ve TA 100 suşlarında mutajenik etkisinin görülmediğini, fakat TA 102 suşunda doza bağlı olarak revertantların sayısında bir artışın olduğunu (mutajen olduğunu) bildirmişlerdir.

2.2. Test Maddesi Thymol İle Yapılmış Olan Genotoksisite Çalışmaları

Aydın ve ark. (2005) thymol'un insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerini tek hücre jel elektroferezi ile incelemişlerdir. Aynı zamanda thymol'un 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) ve mitomycin C (MMC) tarafından indüklenen DNA'daki hasara karşı etkilerini değerlendirmişlerdir. Thymol'un 0.1 mM konsantrasyonun aşağısındaki konsantrasyonlarda DNA'da tek iplik kırıklarında bir artışa sebep olmadığını, fakat 0.2 mM konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonda DNA'da tek iplik kırıklarında önemli bir artışa neden olduğunu belirlemişlerdir. Düşük konsantrasyonlarda IQ ve MMC tarafından DNA'da oluşturulmuş olan tek iplik kırıklarını önemli derecede azaltmış olduğunu belirlemişlerdir. Stamatii ve ark. (1999) antifungal aktivite gösteren thymol'un sitotoksik ve genotoksik etkilerini mikroorganizmalarda ve memelilerde kısa süreli in vitro testlerle araştırmışlardır. 0.7 mM dozundaki thymol'un Hep-2 hücrelerinin canlılığını ve bölünmesini inhibe ettiğini, DNA tamir testinde doza bağlı olarak belirgin bir şekilde toksik olduğunu, SOS Kromoteste toksik olmayan dozlarda DNA'ya zarar vermediğini, Ames testinde TA 100 suşunda toksik olmayan dozlarda metabolik aktivatörden bağımsız olarak kolonilerdeki spontan geriye dönüş sayısını arttırdığını bildirmişlerdir. Hikiba ve ark. (2005) dişiçilik uygulamalarında kullanılan thymol'un kromozom aberasyonlarına etkisini Suriye Hamster Embriyo (SHE) hücrelerinde araştırmışlardır. 520 µM konsantrasyondaki thymol'un sitotoksik özellik gösterdiğini, bu dozun altındaki dozajlarda kromozom aberasyon seviyesinde artışın olmadığını, dış metabolik aktivatör varlığında da 130 µM ve üstündeki dozajlarda kromozom aberasyonu seviyesinde istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğunu bildirmişlerdir. Azizan ve Blevins (1995) thymol'un mutajenik etkisini, *Salmonella typhimurium*'un TA 97, TA 98 ve TA 100 suşlarının S9 mix varlığında ve yokluğunda 20 dakikalık preinkübasyonu ile incelemişlerdir. Thymol'un mutajen

etki göstermediğini bildirmişlerdir. Azırak (2007) sıçan kemik iliği hücrelerinde thymol'un sayısal ve yapısal KA oluşumunu artırdığını, yani hem anejenik hem de klastojenik etkiye sahip olduğunu fakat anejenik etkisinin nispeten zayıf olduğunu bildirmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı raporda 451 µg/petri dozunda thymol'un S9 mix varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium*'un TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1538 ve TA 1537 suşlarında mutajenik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (WHO, 2001). Yine aynı raporda thymol'un Syrian Hamster Embryo (SHE) hücrelerinde 0.3-30 µg/ml dozlarının KKD sayısında bir artışa neden olduğu, metabolik aktivatör yokluğunda ve 0.3-30 µg/ml dozlarında thymol'un UDS (programsız DNA sentezi)'ye sebep olmadığı fakat metabolik aktivatör varlığında ve 1-10 µg/ml dozlarında thymol'un UDS'ye sebep olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

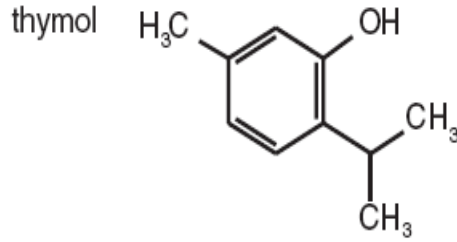
Bu çalışmada test maddesi olarak thymol, materyal olarak da sigara içmeyen yaşları bir birine yakın sağlıklı iki erkek (23 ve 26 yaşlarında) ve iki bayandan (22 ve 24 yaşlarında) alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları**3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler****3.1.1.1. Thymol**

Bu çalışmada test maddesi olarak kullandığımız thymol, bir terpenoidtir ve kekik (*Thymus vulgaris*, *Thymbra spicata*) yağında bulunur. Kekikotu (*Origanum vulgare*) ve ilgili türler karakteristik kekik kokusuna sahiptir. Thymol ($C_{10}H_{14}O$), sık sık “akdeniz lezzeti” taşıyan ürünler için sentetik aromalarda kullanılır. Suda çok az ya da hiç çözünmez, fakat alkolde ve yağlarda çok kolay çözünür. Lezzet amacıyla kullanılması dışında thymol, antihelmintik, antiseptik, antifungal olarak ve ayrıca gingivitis (diş etinde şişme, kızarma ve iltihap meydana getiren bakteri plağı) azaltıcı olarak da kullanılmaktadır. Thymol’un kimyasal özellikleri aşağıda ve açık formülü de Şekil 3.1’de görülmektedir.

Bilinen Adları	: 5-methyl-2-(1-methylethyl)phenol
CAS kayıt no	: 89-83-8
Kapalı Formülü	: $C_{10}H_{14}O$
Molekül Ağırlığı	: 150.22 g/mol
Erime Sıcaklığı	: 49-51°C
Kaynama Sıcaklığı	: 232°C
Yoğunluğu	: 0.965 g/cm ³
Suda Çözünürlüğü	: ~900 mg/l-1 g/l (25°C) ³ g/L
Fiziksel Durumu	: İnce toz

Renk	: Beyaz
Sıçan oral LD₅₀	: 980 mg/kg
Sıçan i.v. LD₅₀	: 100 mg /kg
Sıçan s.c. LD₅₀	: 1600 mg/kg
Sıçan i.p. LD₅₀	: 110 mg/kg
Saflık düzeyi	: % 99.6



Şekil 3.1. Thymol'ün açık formülü

3.1.1.2. Dimethyl Sulfoxide

Bu çalışmada thymol'ün konsantrasyonlarının hazırlanmasında çözücü olarak dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Cat. No: 8418) kullanılmıştır. DMSO'nun genel yapısı ve diğer özellikleri aşağıda verilmiştir.

Kimyasal adı	: Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
Saflık düzeyi	: $\geq$ %99.9
Kapalı formülü	: C ₂ H ₆ SO
Sigma no	: D8418
CAS kayıt no	: 67-68-5

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 her tüpe 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

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 kaptaki 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 (BrdU)

BrdU Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) temin edilmiştir. BrdU eriyiği bidistile su içerisinde hazırlanmış, daha sonra 0.2 µm çapındaki 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. Giemsa

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 (HNO₃)

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

3.1.1.13. Ethyl methanesulfonate (EMS)

Pozitif mutajen olarak kullanılmıştır. EMS (Sigma, M0880) %50'lik etil alkolde hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. EMS stok çözeltisi her hafta taze olarak hazırlanmış ve kültür tüplerine 0.7 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. EMS'nin kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir.

Safılık düzeyi	: $\geq$ %99.9
Kapalı formülü	: C₃H₈O₃S
Molekül ağırlığı	: 124.15

CAS kayıt no	: 62-50-0
Yoğunluk	: 1.15 g/cm ³
Diğer isimleri	: Methanesulfonic acid ethyl ester, half-myleran, MSC 26805, ENT 26396.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Hassas Terazı

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.

3.1.2.5. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için WTW 315i (Germany) marka pH metre 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. 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, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

İnsanlarda genotoksik etkiye sahip olabilecek mutajenlerin ve kanserojenlerin genotoksik etkilerinin saptanması başta KKD, KA ve MN testleri yardımıyla olabilmektedir. Bu tür çalışmalar planlanırken, uygulanırken ve yorumlanırken uluslararası yönergelerle uygun hareket edilmesi zorunluluğu bulunmaktadır. Bundan dolayı thymol'ün insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerinin belirlendiği bu çalışma Albertini ve ark. (2000)'ları tarafından yayınlanan IPCS (The International Programme on Chemical Safety) yönergesine göre gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

Bu çalışmada KKD ve KA'ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması Evans (1984), Perry ve Thompson (1984)'un metodlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. 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) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Yine steril şartlarda ve daha önce hazırladığımız BrdU eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde 37±1°C'de 72 saat için inkübe edilmiştir.

Thymol'ün etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 ve 48 saat kala thymol'ün daha önce belirlenmiş konsantrasyonları olan 25, 50, 75 ve 100 µg/ml'lik miktarları, DMSO'da çözündürülüp kültür tüplerine ilave edilmiştir. 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde çözücü kontrol olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO tüplere 4 µl/ml olacak şekilde verilmiştir. Thymol beyaz ince toz yapısındadır ve suda çözünmez. Bu amaçla thymol'ü çözmek için DMSO kullanılmıştır. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak EMS kullanılmıştır. EMS tüplere 0.7 µg/ml olacak şekilde verilmiştir. 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 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 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 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. 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 ısısında bekletilmiştir.

3.3.2. 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 solüsyonundan 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 mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

3.3.3. Mikroskopik İnceleme

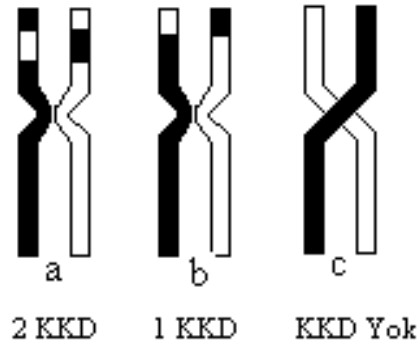
Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).

3.3.3.1. KKD ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması

3.3.3.1.(1). KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (4 kişiden toplam 100 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 3.2.a), uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.2.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.2.c).



Şekil 3.2. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).

3.3.3.1.(2). Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması

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

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

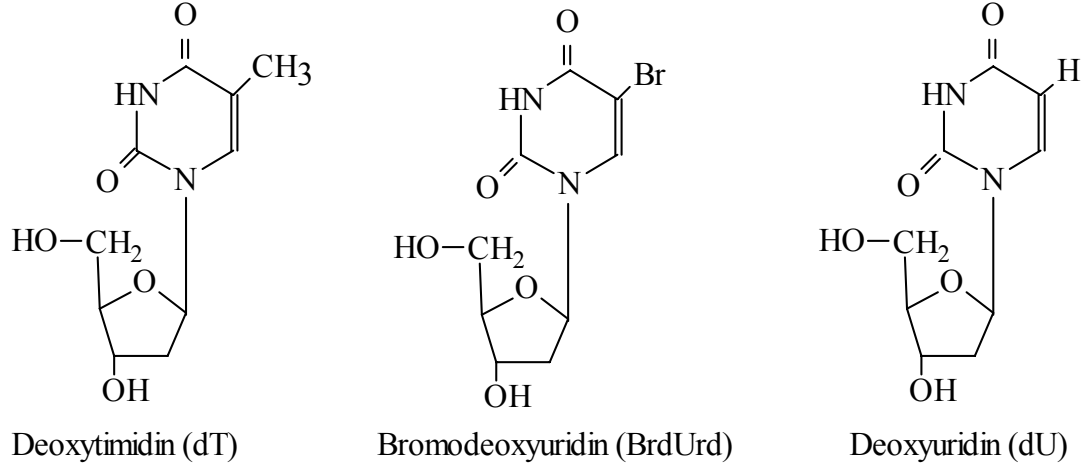
M₁: 1. Mitozdaki hücre sayısı

M₂: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M₃: 3. Mitozdaki hücre sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990): BrdU, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analoğu olan bileşiklerdir (Şekil 3.3). BrdU, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları benzen

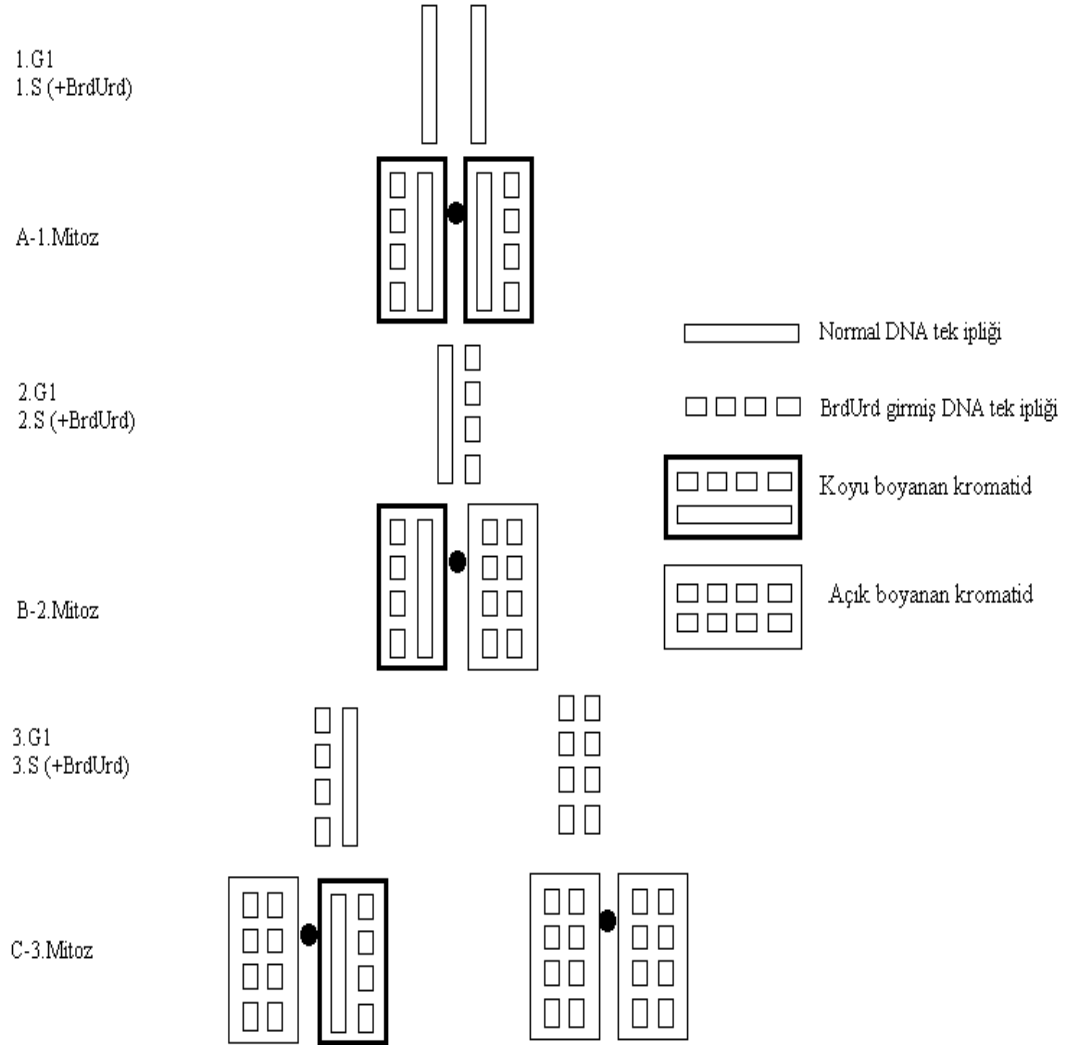
halkasındaki 5.C atomuna dT'de CH₃, BrdU'de Br ve dU'da H atomunun bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.



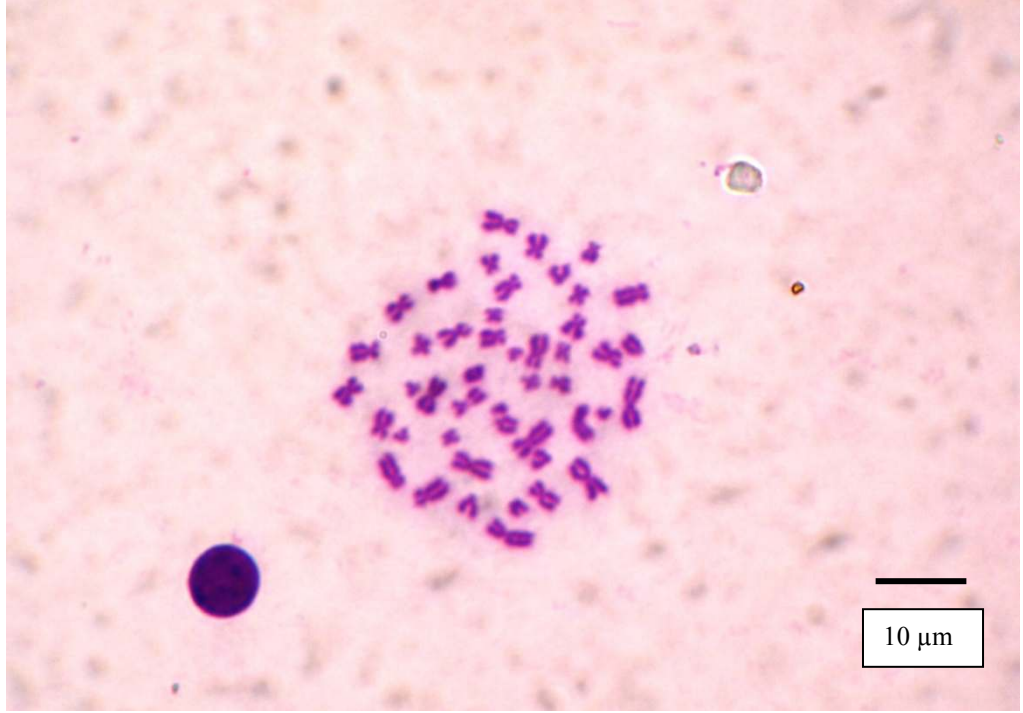
Şekil 3.3. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdU) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.

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

(Şekil 3.4.B ve Şekil 3.6). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU'lu ortamda 3.S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdU girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık renkte boyanacaktır (BrdU/BrdU:BrdU/BrdU). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdU'lu ve diğer kromatidin bir ipliği BrdU'lu diğer ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, bir kromatidi de açık renkte boyanacaktır (dT/BrdU:BrdU/BrdU). 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 3.4.C ve Şekil 3.7). 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 replikasyon indeksi (RI) hesaplanmıştır.



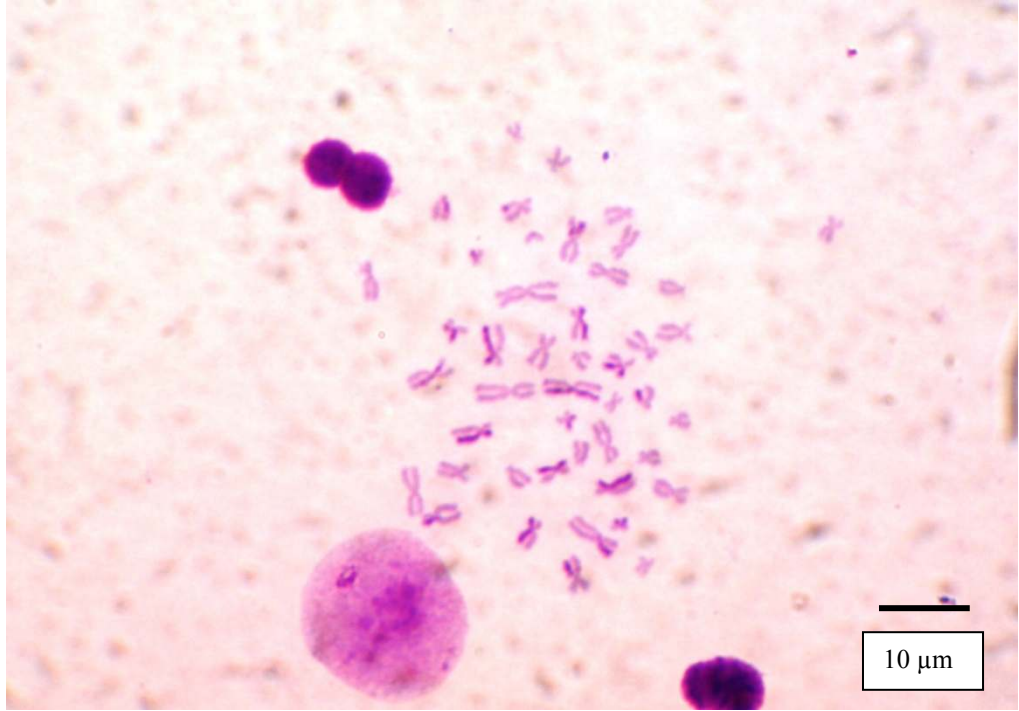
Şekil 3.4. BrdU'nin DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During 1985'e göre Topaktaş ve Speit 1990'den).



Şekil 3.5. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.



Şekil 3.6. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.



Şekil 3.7. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.

3.3.3.2. Kromozomal Anormallikler (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

3.3.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (4 kişiden toplam 400 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 yapısal ve total kromozom anormalliklerinin 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.

3.3.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Thymol'un 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. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İncelemeler

3.4.1. Mikronukleus Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

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.

Thymol'ün etkisini incelemek için, daha önce belirlenmiş olan konsantrasyonlardaki (25, 50, 75 ve 100 µg/ml) thymol, kültür tüplerine ilave edilerek hücrelerin 24 ve 48 saat boyunca thymol ile muamele edilmeleri sağlanmıştır. İki nukleuslu hücre oluşumunu sağlamak için de kültür bitimine 24 saat kala bütün tüplere 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin B (Cytochalasin B, Sigma Cat. No. C6762) ilave edilmiştir. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak EMS kullanılmıştır. EMS tüplere 0.7 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 fiksatiften 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 lamin 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 ısısında bekletilmiştir.

3.4.2. 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 süzülmüştür. Kurduğundan emin olunan preparatlar direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 13 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.

3.4.3. 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 (binükleer) hücre sayılmış, 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 oranı saptanmıştır (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). Bu orandan yola çıkarak Nukleer Bölünme İndeksi (NBİ) (Nuclear Division Index = NDI) hesaplanmıştır (Fenech, 2000). Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

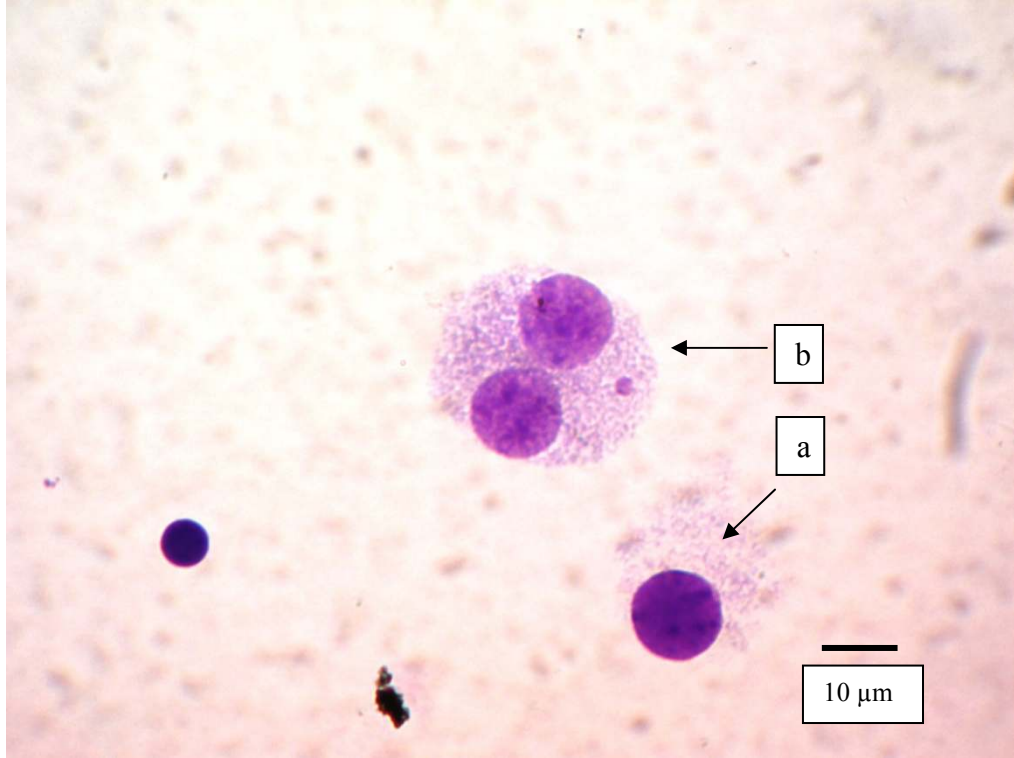
$$NDI = (1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4) / 2000$$

N_1 : 1 nukleuslu hücre sayısı

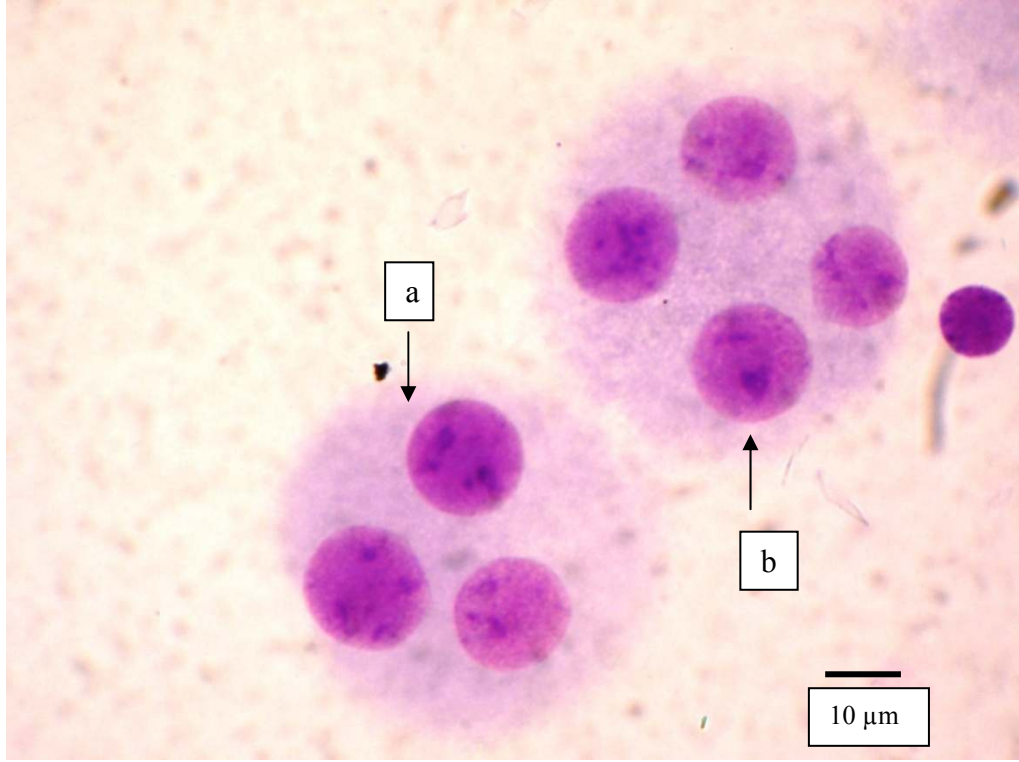
N_2 : 2 nukleuslu hücre sayısı

N_3 : 3 nukleuslu hücre sayısı

N_4 : 4 nukleuslu hücre sayısı



Şekil 3.8. Bir (a) ve iki (b) nükleus içeren hücreler.



Şekil 3.9. Üç (a) ve dört (b) nükleus içeren hücreler.

3.5. 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'lerine ait örneklerin, iki nükleuslu hücrelerden mikronukleusa sahip olanların ve bir, iki, üç ve dört nükleuslu hücrelerin birkaç örneğinin fotoğrafları çekilmiştir. (Olympus CX31RTSF; 7,1 Megapixel).

3.6. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda muameleli gruplardan elde edilen KKD, KA, MN, NBI, RI ve MI t-test metoduna göre muamelesiz, çözücü (DMSO) ve pozitif (EMS) kontrolleri ile karşılaştırılmıştır.

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**4.1. Thymol'ün KKD Üzerindeki Etkileri**

Thymol'ün 4 farklı konsantrasyonu (25, 50, 75 ve 100 µg/ml) ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan lenfositlerinde saptanan ortalama kardeş kromatid sayısı (KKD/Hücre) çizelge 4.1'de görülmektedir. 24 saatlik muamele süresinde thymol, en yüksek doz (100 µg/ml) hariç KKD sayısını hem kontrol hem de çözücü kontrole nazaran önemli derecede artırmış, fakat pozitif kontrol olan EMS kadar etkili olamamıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). En yüksek dozda ise thymol KKD sayısını artırmamıştır. 48 saatlik muamele süresinde de thymol 25 ve 50 µg/ml'lik dozlarda KKD sayısını kontrole nazaran artırmıştır, fakat 75 ve 100 µg/ml'lik dozlarda thymol KKD sayısını artmasına rağmen istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır. KKD sayısındaki bu artış çözücü kontrole nazaran önemli bulunamamıştır. Thymol ikinci mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısını özellikle 48 saatlik muamele süresinde azaltmış, bundan dolayı da KKD sayısını saptamak için yeterince hücre bulunamamıştır.

Hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde KKD sayısı ile doz arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır.

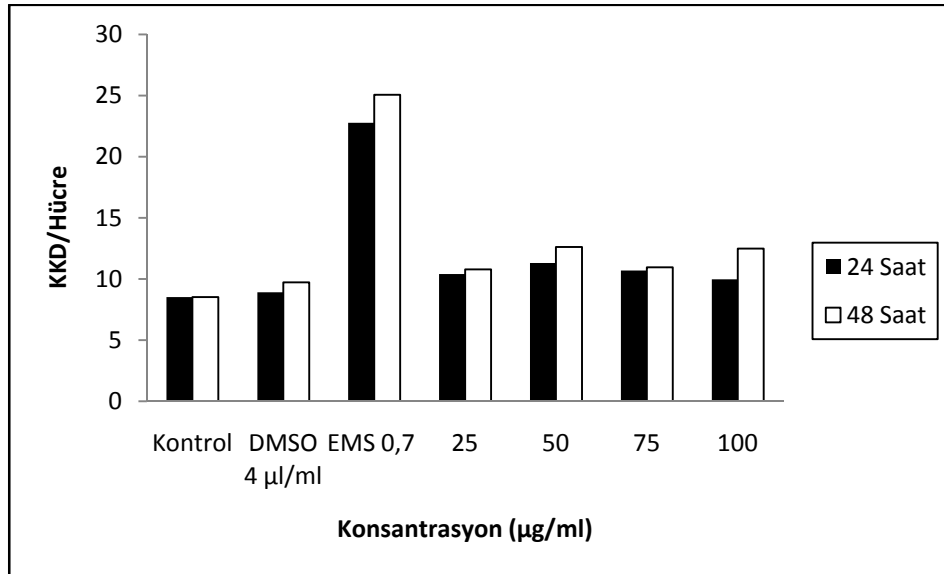
Çizelge 4.1. Değişik dozda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değışimi (KKD) sayısı.

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon $\mu\text{g/ml}$	Min-Max KKD	KKD/Hücre $\pm$ SE
Kontrol	-	-	2-15	8.52 $\pm$ 0.85
DMSO	24	4 $\mu\text{l/ml}$	2-16	8.91 $\pm$ 0.23
EMS	24	0.7	6-57	22.77 $\pm$ 7.49
Thymol	24	25	2-25	10.40 $\pm$ 0.46 a1b1c3
"	24	50	2-17	11.31 $\pm$ 0.14 a3b3c3
"	24	75	2-24	10.69 $\pm$ 0.45 a1b1c3
"	24	100	3-28	9.97 $\pm$ 1.23 c2*
DMSO	48	4 $\mu\text{l/ml}$	2-16	9.73 $\pm$ 0.96
EMS	48	0.7	4-66	25.07 $\pm$ 4.38
Thymol	48	25	2-17	10.78 $\pm$ 0.75 a1c3
"	48	50	2-21	12.62 $\pm$ 1.29 a1c2
"	48	75	2-23	10.96 $\pm$ 0.97 c2
"	48	100	3-23	12.49 $\pm$ 1.84 c2*

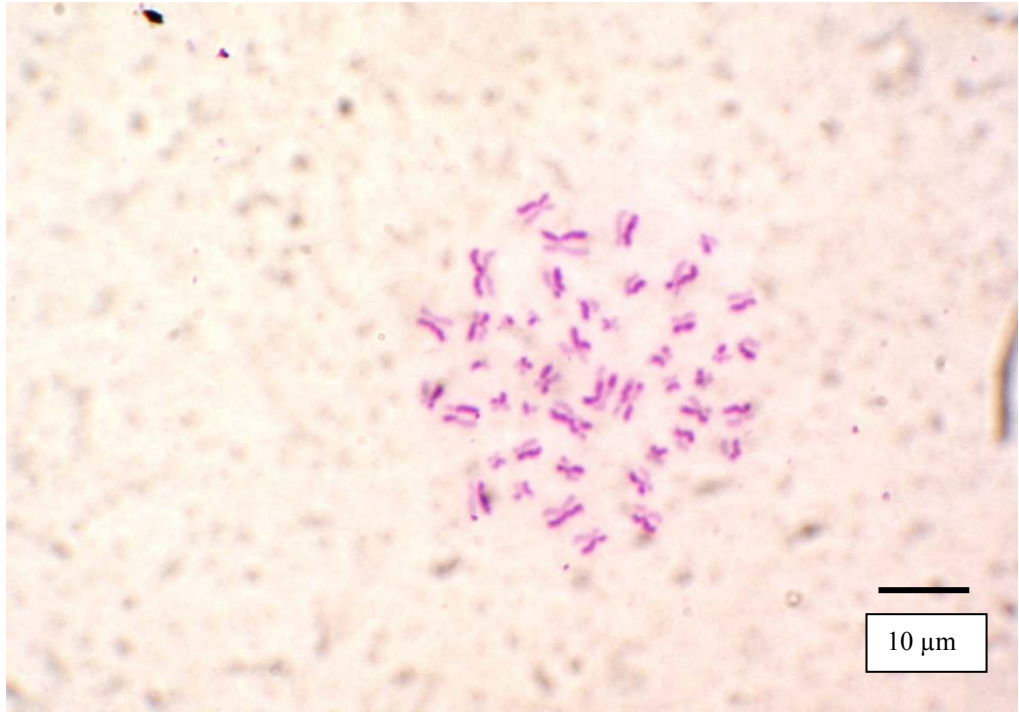
a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

1: $P \leq 0.05$; 2: $P \leq 0.01$; 3: $P \leq 0.001$

*Yüksek sitotoksiteden dolayı sırasıyla sadece toplam 91 ve 69 ikinci mitoz bölünme geçiren hücre sayılabılmıştır.



Şekil 4.1. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinde KKD/Hücre sayısı.



Şekil 4.2. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (50 µg/ml, 24 saat, ♀).



Şekil 4.3. EMS ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde indüklenmiş kardeş kromatid değişimi (0.7 µg/ml, 24 saat, ♀).

4.2. Thymol'ün Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Thymol tüm dozlarda ve muamele sürelerinde kromozom yapı anormalliğini kontrole nazaran önemli derecede artırmıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4). 24 saatlik muamele süresinde yapısal KA sayısı çözücü kontrole nazaran indüklenirken, 48 saatlik muamele süresinde ise en düşük doz (25 µg/ml) hariç yapısal KA sayısı çözücü kontrole nazaran önemli derecede artırılmıştır. Kromozom yapı anormalliğindeki bu artış 24 saatlik muamelenin en yüksek dozunda (100 µg/ml) pozitif kontrol EMS kadar olurken 48 saatlik muamelenin en yüksek dozunda EMS'nin kromozom yapı anormalliği sayısından daha fazla olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak da önemli bulunduğu saptanmıştır. In vitro insan periferik lenfositlerinde thymol'ün kromatid tipi kırıklara daha fazla sebep olduğu, kromozom tipi kırıkları da daha az oranda artırdığı saptanmıştır (Çizelge 4.2). Thymol ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KA oluşumunda herhangi bir doz-etki ilişkisine rastlanmamıştır.

Thymol ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kromatid tipi anormalliklerden özellikle kromatid kırığı (Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.12) ve tek kol birleşmesi (Şekil 4.7) gözlenmiştir. Kromozom tipi anormalliklerden özellikle kromozom kırığı (Şekil 4.8), kardeş kromatid birleşmesi (sister union) (Şekil 4.9) ve fragment (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11) gibi yapısal kromozom anormalliklerine rastlanmıştır. Bu çalışmada Thymol ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde sadece dört hücrede poliploidi (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13) gözlenmiş ve dolayısıyla Thymol'ün kromozom sayı anormalliğini artırmadığı saptanmıştır.

Çizelge.4.2. Değişik dozda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde yapısal kromozom anormallikleri (KA)

Test maddesi	Süre (saat)	Konsant. (µg/ml)	Anormallik çeşitleri		Yapısal KA±SE (%)
			Kromatid Tipi	Kromozom Tipi	
Kontrol	-	-	14	9	5.75±0.62
DMSO	24	4 µl/ml	22	12	8.50±0.64
EMS	24	0.7	64	54	29.50±0.64
Thymol	24	25	47	16	15.75±2.78 a1b1c1
"	24	50	80	10	22.50±0.28 a3b3c3
"	24	75	72	8	20.00±1.68 a2b2c1
"	24	100	58*	24*	27.50±2.95 a2b2
DMSO	48	4 µl/ml	27	5	8.00±0.70
EMS	48	0.7	93	30	30.75±5.07
Thymol	48	25	32	11	10.75±1.25 a1c3
"	48	50	55	9	16.00±2.94 a1b1c1
"	48	75	55	11	16.50±1.19 a2b2c3
"	48	100	64*	11*	34.09±0.94 a3b3c1

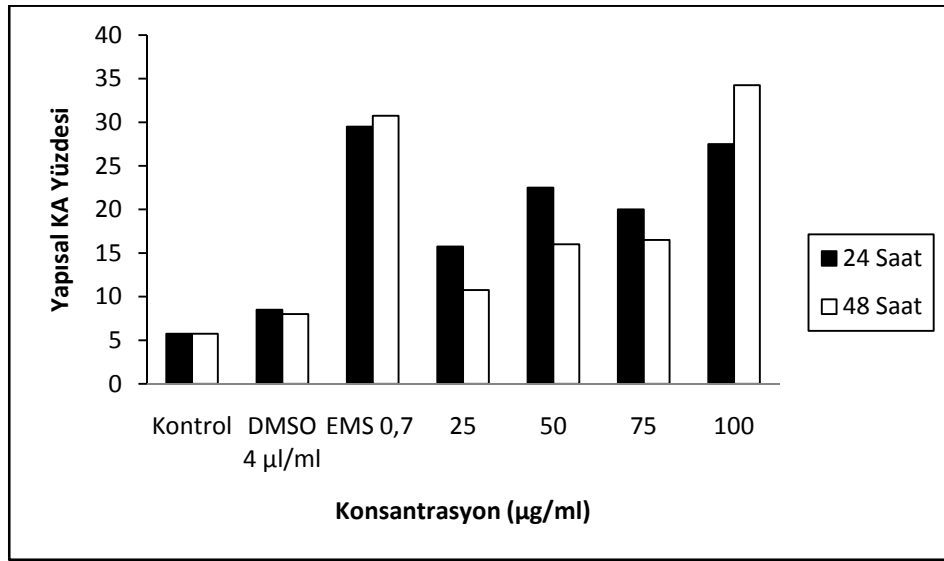
a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

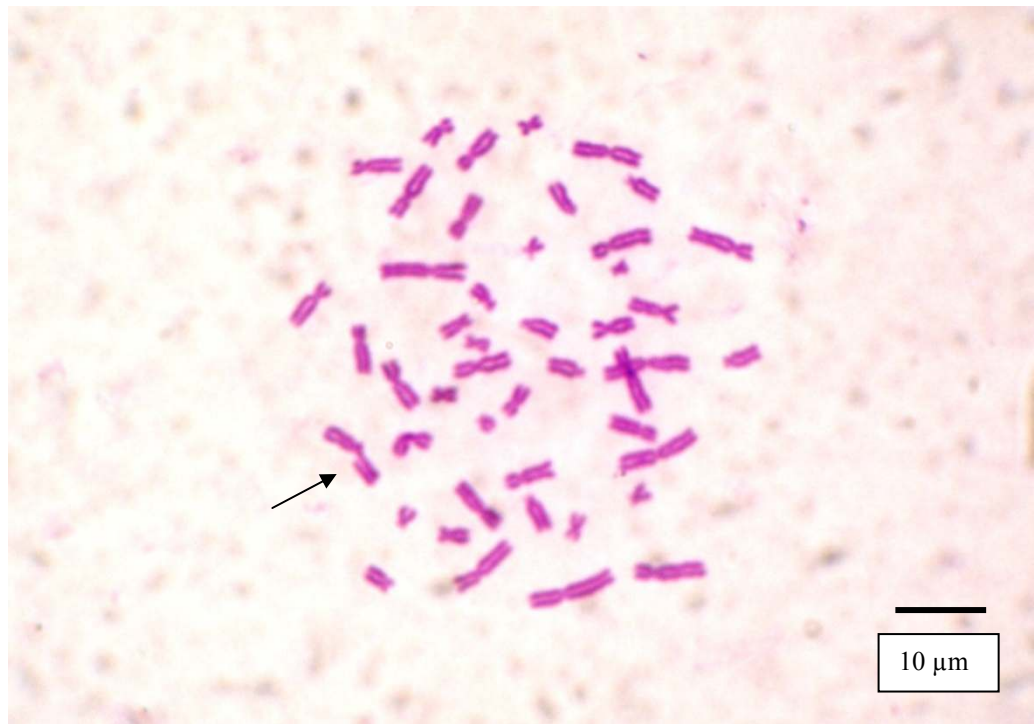
c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

1: P≤0.05; 2: P≤0.01; 3: P≤0.001

*Yüksek sitotoksiteden dolayı sırasıyla sadece toplam 298 ve 220 hücre sayılabilmektedir.



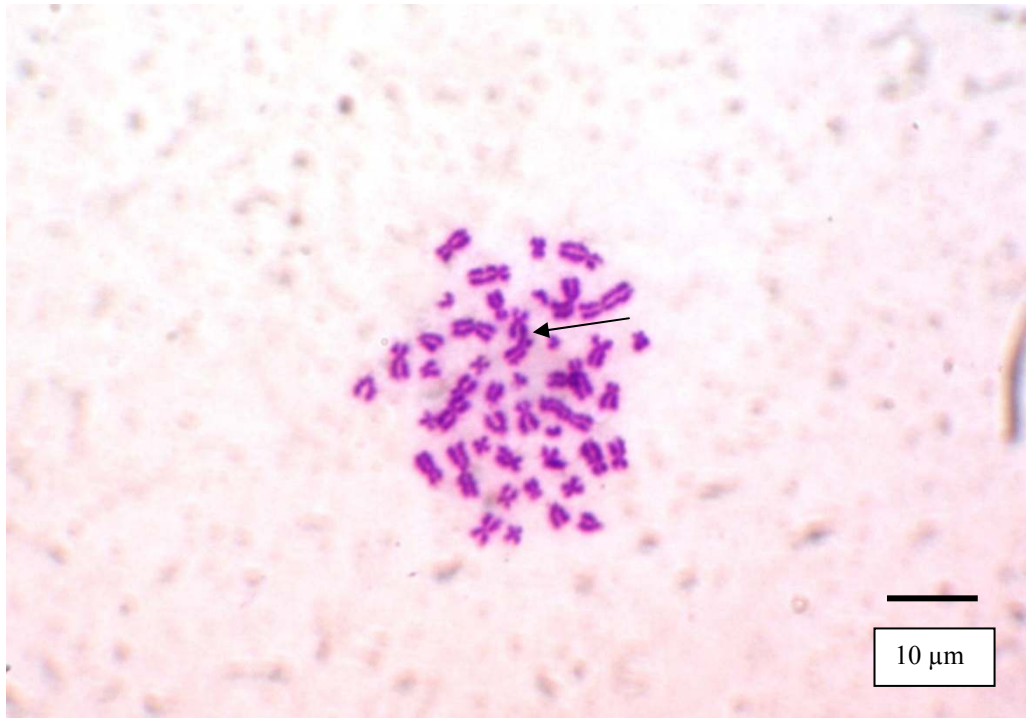
Şekil 4.4. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde yapısal KA yüzdesi.



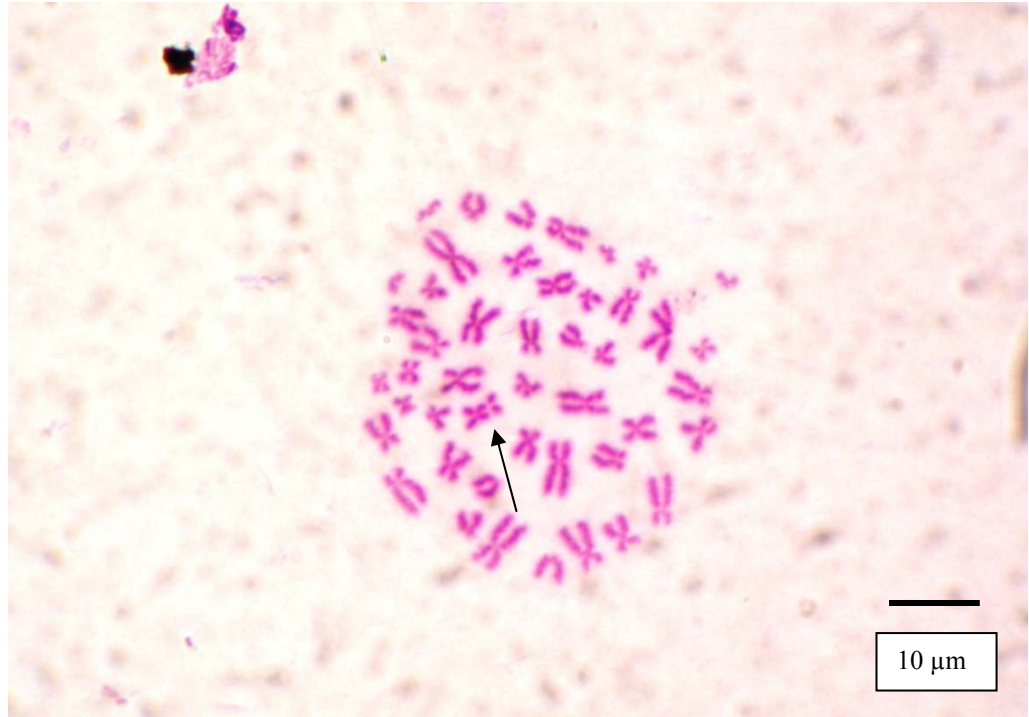
Şekil 4.5. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatid kırığı (25 µg/ml, 24 saat, ♂).



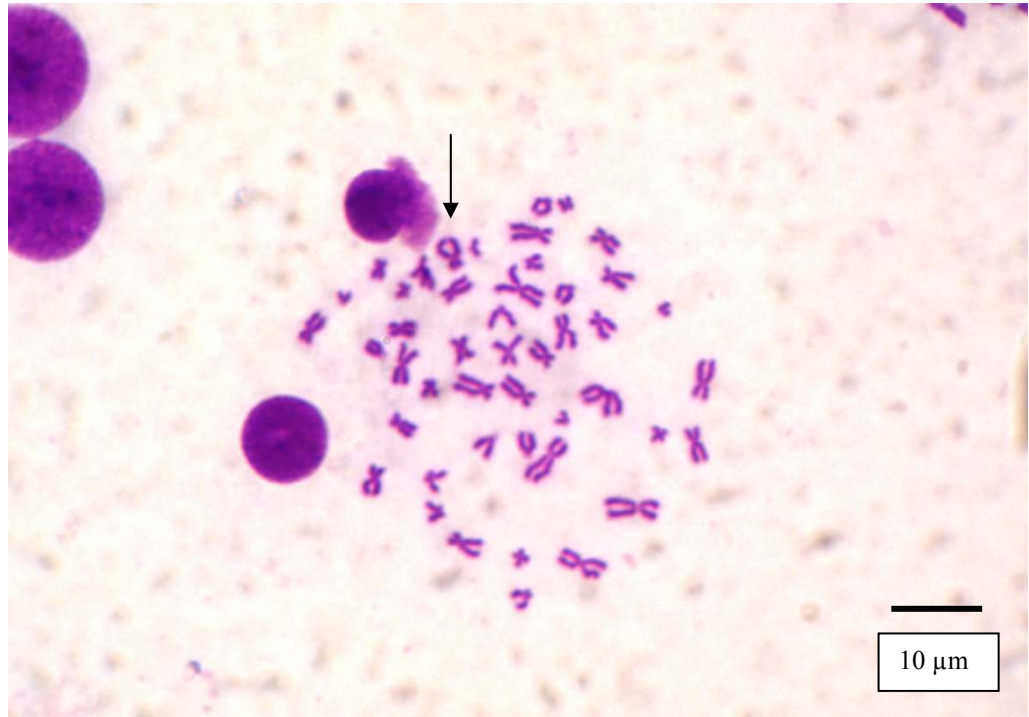
Şekil 4.6. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatid kırığı (25 µg/ml, 24 saat, ♂).



Şekil 4.7. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde tek kromatid birleşmesi (100 µg/ml, 48 saat, ♂).



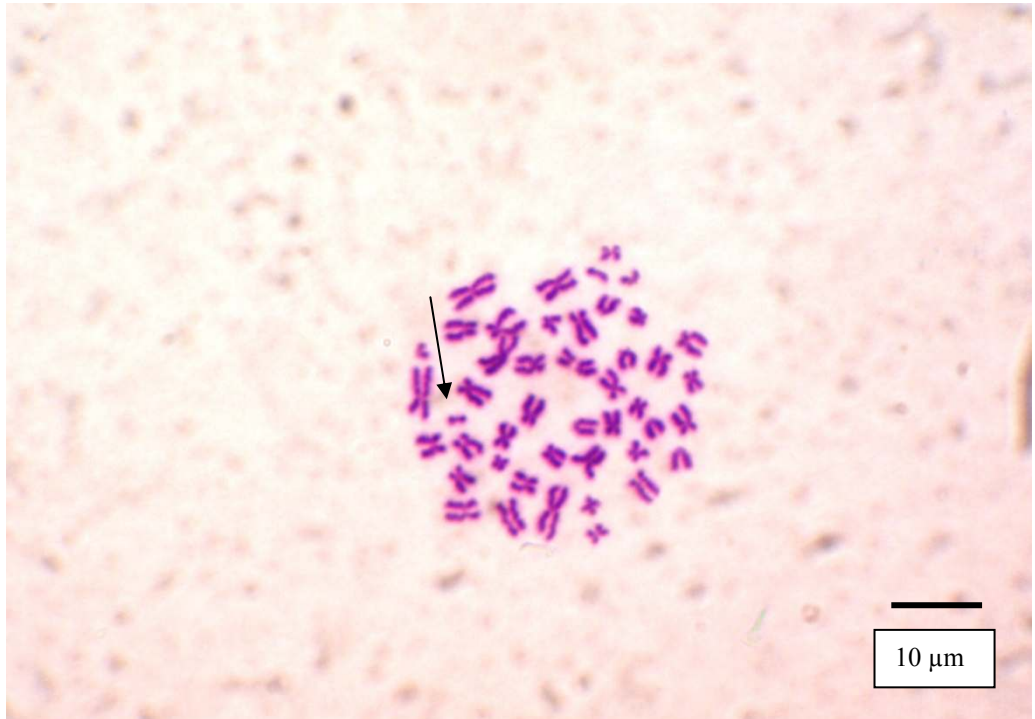
Şekil 4.8. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromozom kırığı (25 µg/ml, 24 saat, ♀).



Şekil 4.9. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kardeş kromatid birleşmesi (25 µg/ml, 48 saat, ♀).



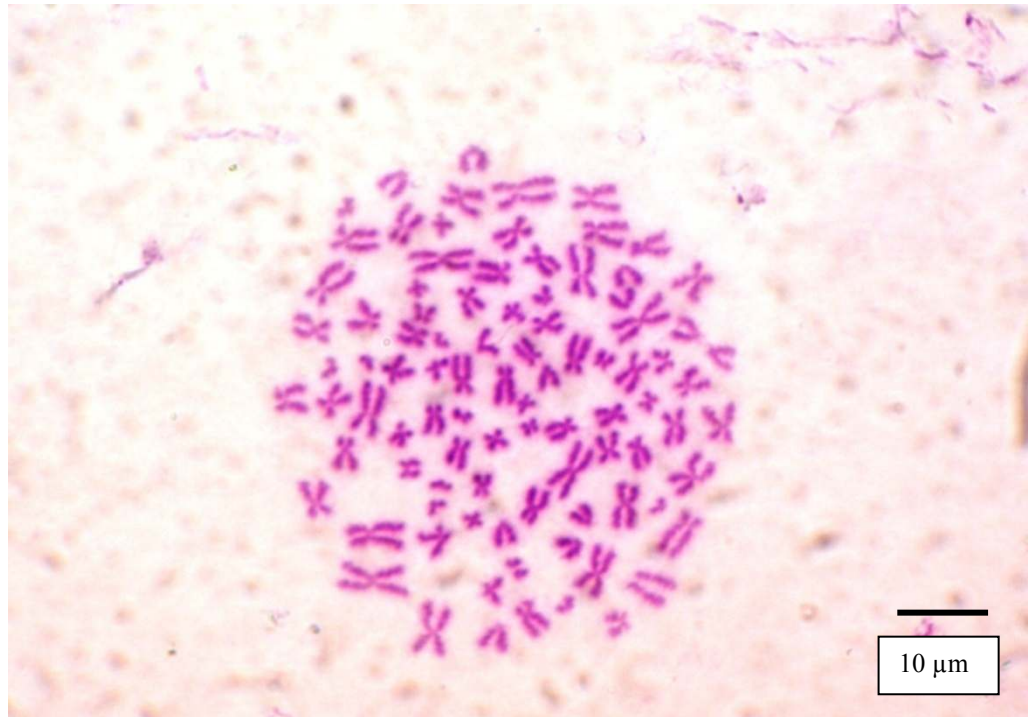
Şekil 4.10. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde fragment (50 $\mu\text{g/ml}$, 48 saat, ♀).



Şekil 4.11. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde fragment (75 $\mu\text{g/ml}$, 48 saat, ♀).



Şekil 4.12. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde poliploid hücre ve kromatid kırığı (50 µg/ml, 24 saat, ♂).



Şekil 4.13. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde poliploid hücre (50 µg/ml, 24 saat, ♀).

4.3. Thymol'un Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleer Bölünme İndeksi Üzerine Etkileri

Thymol, kullanılan tüm dozlarda ve muamele sürelerinde MN'lu binükleer hücre yüzdesini hem kontrola hem de çözücü kontrola nazaran önemli derecede artırmıştır. Hatta, 24 saatlik muamele süresinde thymol'un MN'lu binükleer hücre yüzdesini 75 µg/ml'lik doz hariç EMS kadar artırdığı saptanmıştır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.14). Fakat 48 saatlik muamele süresinde MN'lu binükleer hücre yüzdesindeki artış EMS kadar olamamıştır. Her iki muamele süresinde MN sayısının artışında doz-etki ilişkisine rastlanmamıştır. Thymol ile muamele edilen hücrelerde değişik sayıda MN içeren binükleer hücrelere rastlanmıştır (Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).

Thymol'un nükleer bölünme indeksini özellikle yüksek dozlarda düşürdüğü saptanmıştır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.18). 24 saatlik muamele süresinde sadece en yüksek iki dozda (75 ve 100 µg/ml) ve 48 saatlik muamele süresinde de en yüksek üç dozda (50, 75 ve 100 µg/ml) thymol NBI'ni hem kontrol hem de çözücü kontrola nazaran önemli derecede düşürmüştür. Her iki muamele süresinde thymol'un NBI'ni doza bağlı bir şekilde düşürdüğü saptanmıştır (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Thymol'un 24 saatlik muamele süresinde 100 µg/ml'lik dozda ve 48 saatlik muamele süresinde de 75 ve 100 µg/ml'lik dozlarda NBI'ni EMS'den daha fazla düşürdüğü görülmektedir.

Çizelge 4.3. Değişik dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde mikronükleuslu binükleer hücre yüzdesi (MN) ve nükleer bölünme indeksi (NBI).

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon $\mu\text{g/ml}$	Mikronükleus'lu binükleer hücre (%) $\pm\text{SE}$	Nükleer bölünme indeksi $\pm\text{SE}$
Kontrol	-	-	0.405 $\pm$ 0.11	1.395 $\pm$ 0.063
DMSO	24	4 $\mu\text{l/ml}$	0.460 $\pm$ 0.17	1.380 $\pm$ 0.058
EMS	24	0.7	2.917 $\pm$ 0.41	1.272 $\pm$ 0.078
Thymol	24	25	1.875 $\pm$ 0.43 a1b1	1.310 $\pm$ 0.058
"	24	50	1.877 $\pm$ 0.44 a1b1	1.222 $\pm$ 0.078
"	24	75	1.702 $\pm$ 0.49 a1b1c1	1.147 $\pm$ 0.060 a1b1
"	24	100	2.530 $\pm$ 0.46 a1b1*	1.087 $\pm$ 0.031 a2b2c2
DMSO	48	4 $\mu\text{l/ml}$	0.602 $\pm$ 0.11	1.335 $\pm$ 0.034
EMS	48	0.7	5.120 $\pm$ 1.70	1.190 $\pm$ 0.050
Thymol	48	25	1.725 $\pm$ 0.10 a3b1c3	1.280 $\pm$ 0.051
"	48	50	1.992 $\pm$ 0.43 a1b1c2	1.147 $\pm$ 0.041 a2b1
"	48	75	1.415 $\pm$ 0.16 a2b1c3	1.112 $\pm$ 0.022 a3b2c1
"	48	100	2.237 $\pm$ 0.39 a2b1c2*	1.065 $\pm$ 0.013 a3b3c2

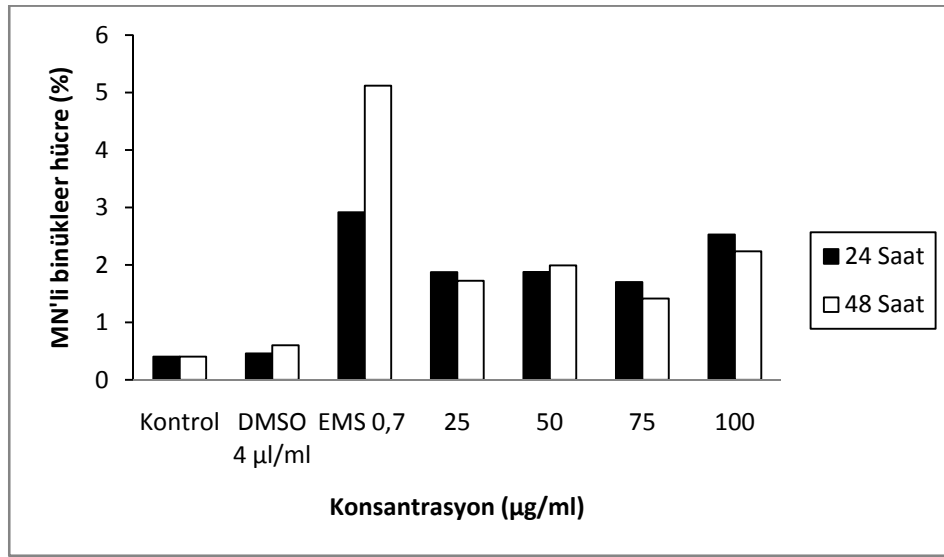
a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

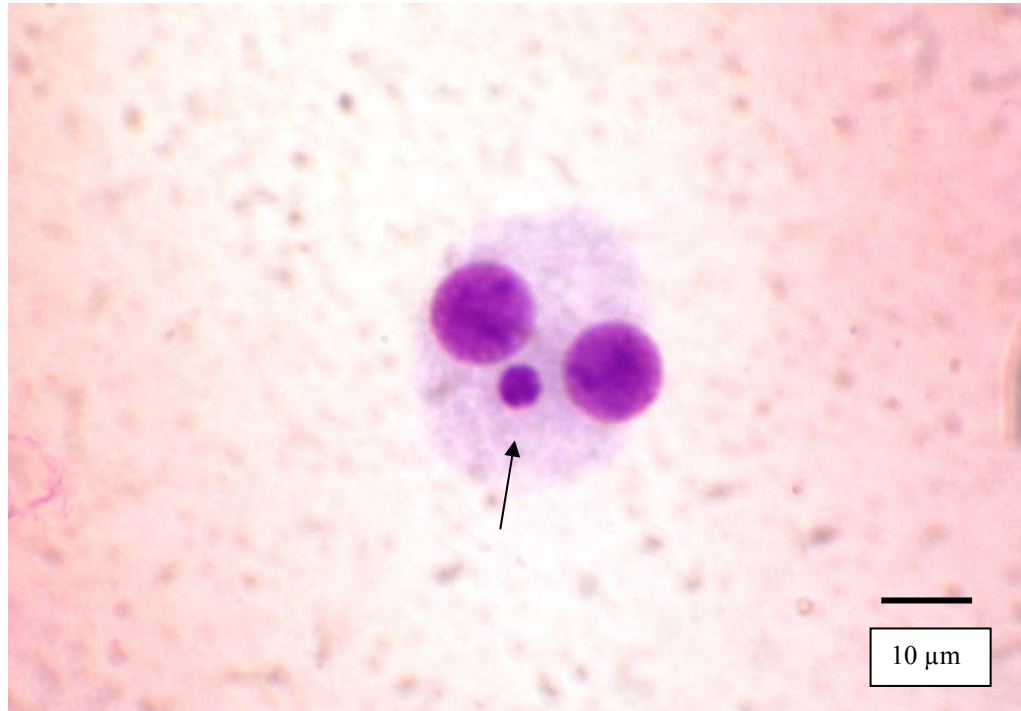
c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

1: $P \leq 0.05$; 2: $P \leq 0.01$; 3: $P \leq 0.001$

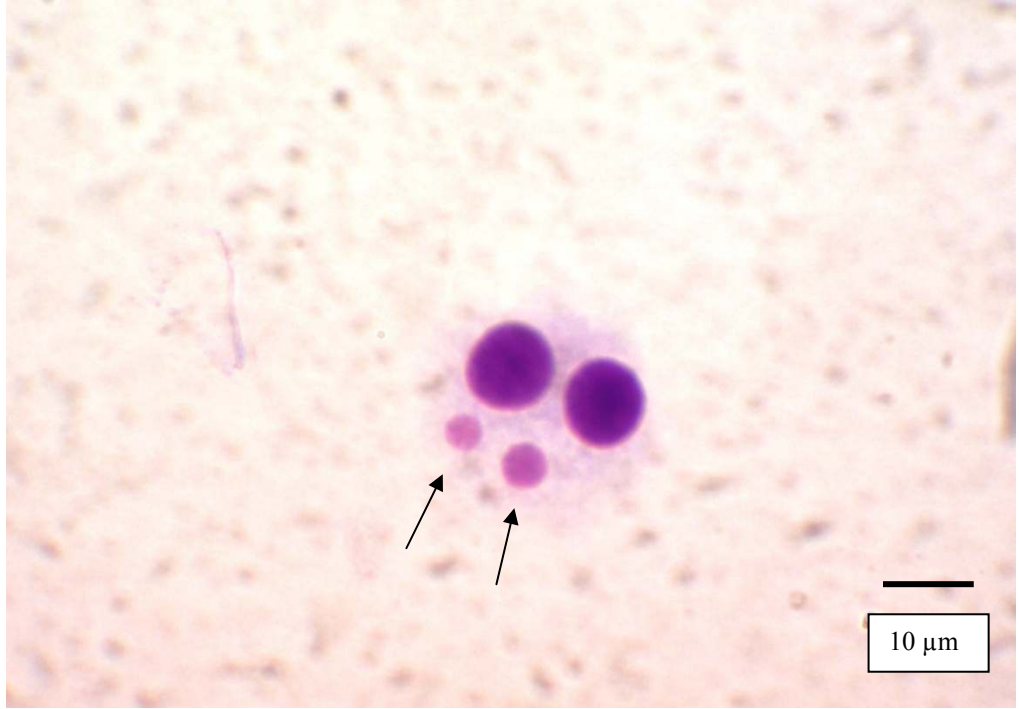
*Yüksek sitotoksiteden dolayı sırasıyla sadece toplam 5130 ve 2868 hücre sayılabilmektedir.



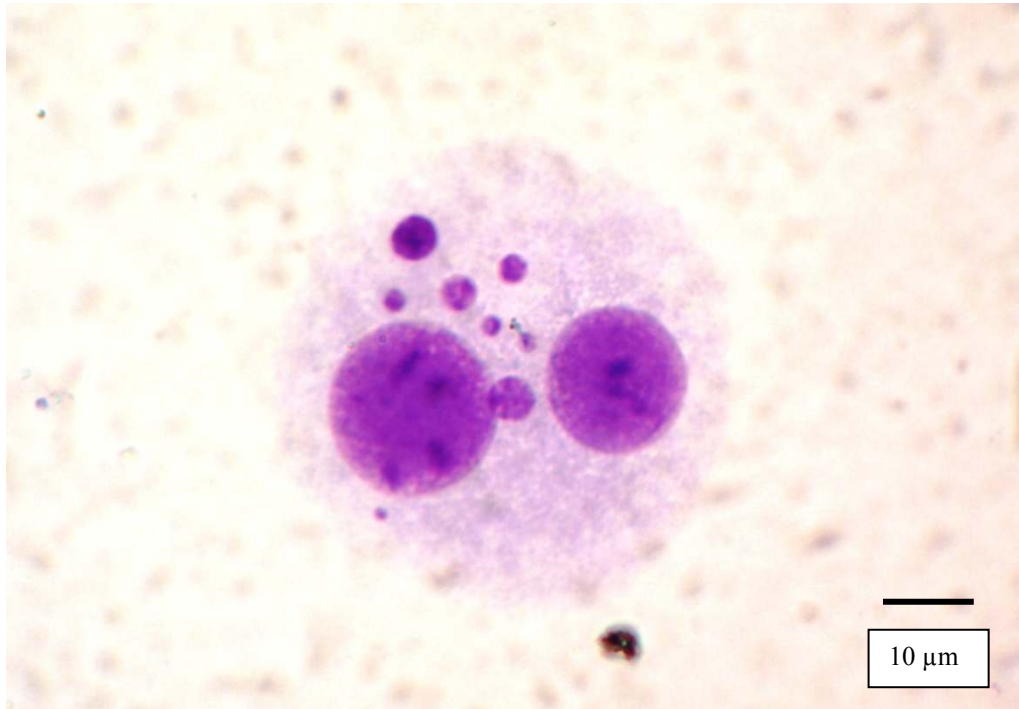
Şekil 4.14. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MN'li binükleer hücre yüzdesi.



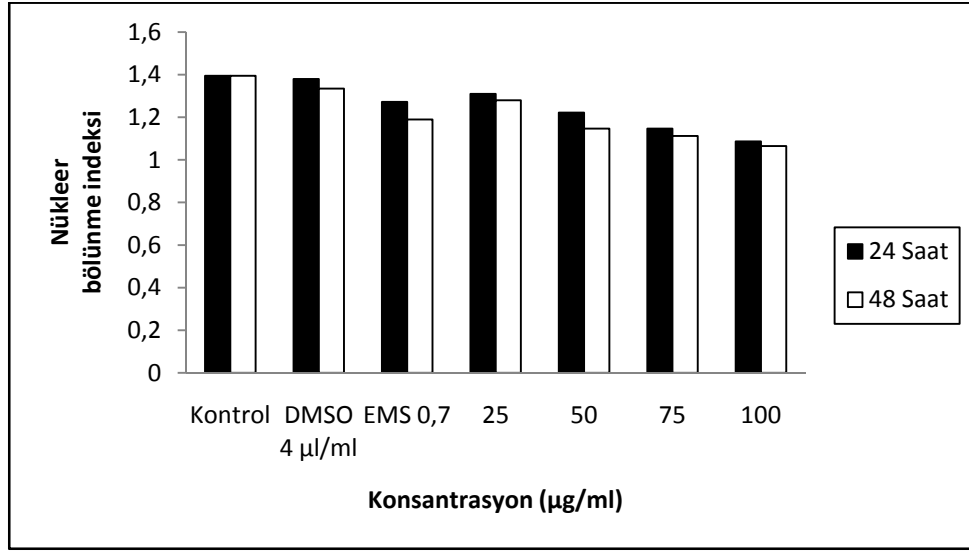
Şekil 4.15. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde bir mikronükleus içeren binükleer hücre (50 µg/ml, 48 saat, ♀).



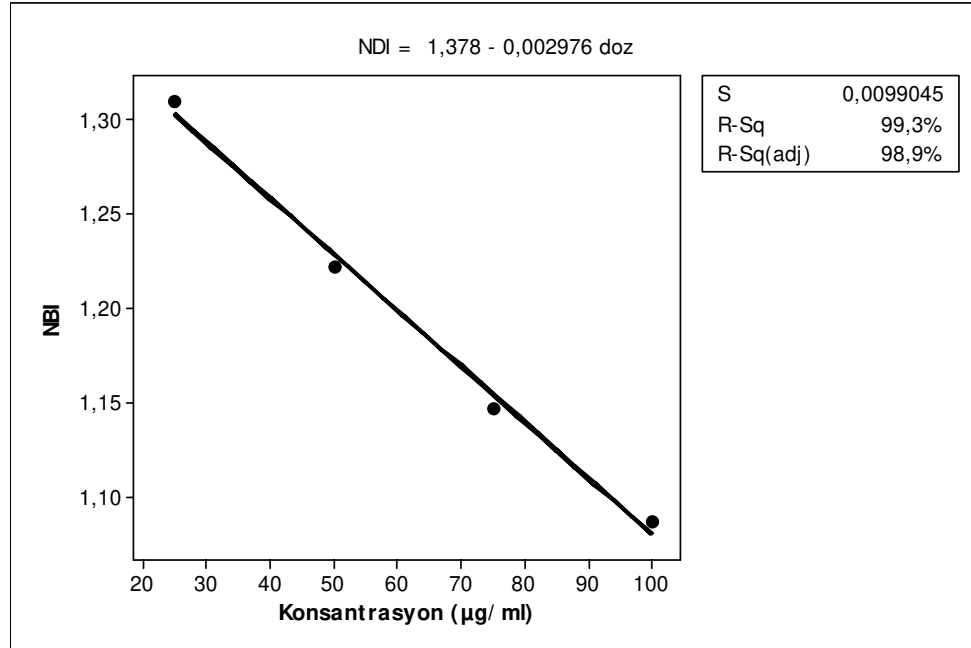
Şekil 4.16. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde iki mikronükleus içeren binükleer hücre (75 µg/ml, 24 saat, ♀).



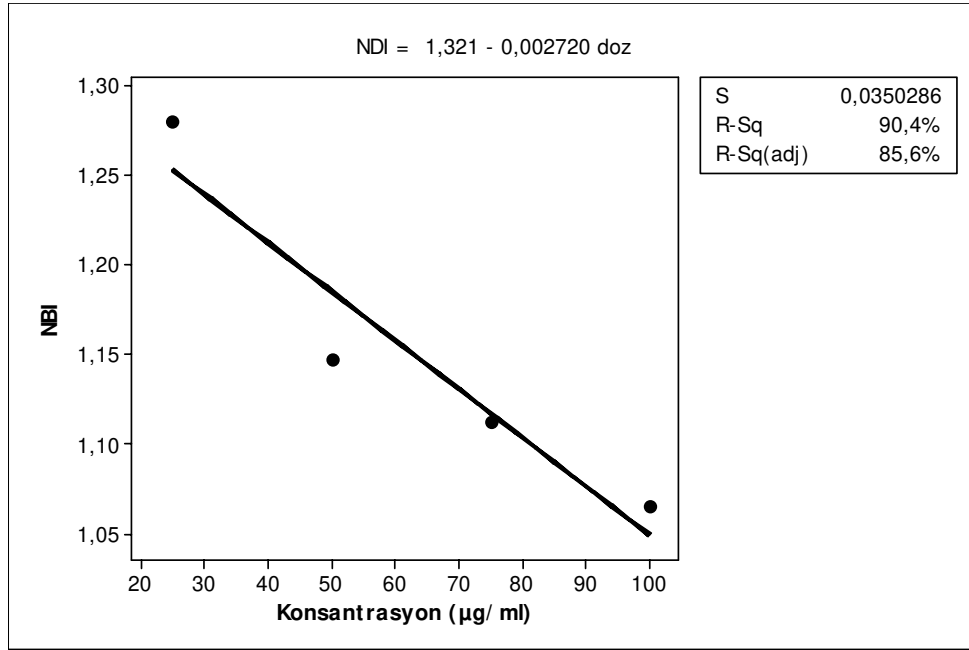
Şekil 4.17. Thymol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde 8 mikronükleus içeren binükleer hücre (50 µg/ml, 24 saat, ♂).



Şekil 4.18. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde nükleer bölünme indeksi.



Şekil 4.19. Farklı dozlarda thymol ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde nükleer bölünme indeksinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P < 0.03$).



Şekil 4.20. Farklı dozlarda thymol ile 48 saat muamele edilen insan periferallenfositlerinde nükleer bölünme indeksinin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P < 0.04$).

4.4. Thymol'ün DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

Thymol'ün DNA replikasyonu üzerindeki etkisi replikasyon indeksi'nin (RI), mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise mitotik indeks'in (MI) bulunması yoluyla saptanmıştır.

Thymol 24 saatlik muamele süresinde RI'ni etkilememiştir. 48 saatlik muamele süresinde ise thymol sadece en yüksek doz olan 100 µg/ml'lik dozda RI'ni hem kontrol hem de çözücü kontrole nazaran düşürmüştür (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.21). RI'ndeki bu düşüş 48 saatlik muamele süresinde doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.22).

24 saatlik muamele süresinde thymol 50 ve 100 µg/ml'lik dozda MI'i hem kontrol hem de çözücü kontrole nazaran önemli derecede düşürmüştür. Thymol'ün 24 saatlik muamele süresinde 25 µg/ml'lik doz hariç MI'i EMS kadar düşürdüğü saptanmıştır. 48 saatlik muamele süresinde ise thymol, sadece en yüksek dozda MI'i her iki kontrole nazaran önemli derecede düşürmüştür. Thymol 48 saatlik muamele

süresinde en düşük doz (25 µg/ml) hariç MI'i EMS kadar düşürmüş, en yüksek dozda da MI'i EMS'den daha fazla düşürdüğü saptanmıştır (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.23). Fakat MI ile doz arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır.

Çizelge 4.4. Değişik dozda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeks (MI).

Test maddesi	Süre (saat)	Konsant. µg/ml	M1	M2	M3	RI±SE	MI±SE
Kontrol	-	-	42	101	257	2.54 ±0.08	6.04 ±1.19
DMSO	24	4 µl/ml	40	126	234	2.48±0.05	5.23±0.84
EMS	24	0.7	45	185	170	2.31±0.03	3.69±0.68
Thymol	24	25	33	142	225	2.48±0.02 c3	6.99±0.41 c2
"	24	50	34	172	194	2.40±0.06 c1	3.45±0.82 a1b1
"	24	75	39	182	179	2.35±0.09	4.58±0.95
"	24	100	62	125	201*	2.36±0.17	2.89 ±0.86 a1b1
DMSO	48	4 µl/ml	34	136	230	2.49±0.08	7.05±0.79
EMS	48	0.7	93	165	127**	2.09±0.10	4.11±1.08
Thymol	48	25	46	135	219	2.43±0.09 c1	6.18 ±0.42 c1
"	48	50	78	188	134	2.14±0.16	4.27 ±0.72 b1
"	48	75	100	165	135	2.08±0.23	4.74 ±1.05
"	48	100	111	146	84***	1.92±0.17 a1b1	2.58 ±0.30 a3b3c1

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

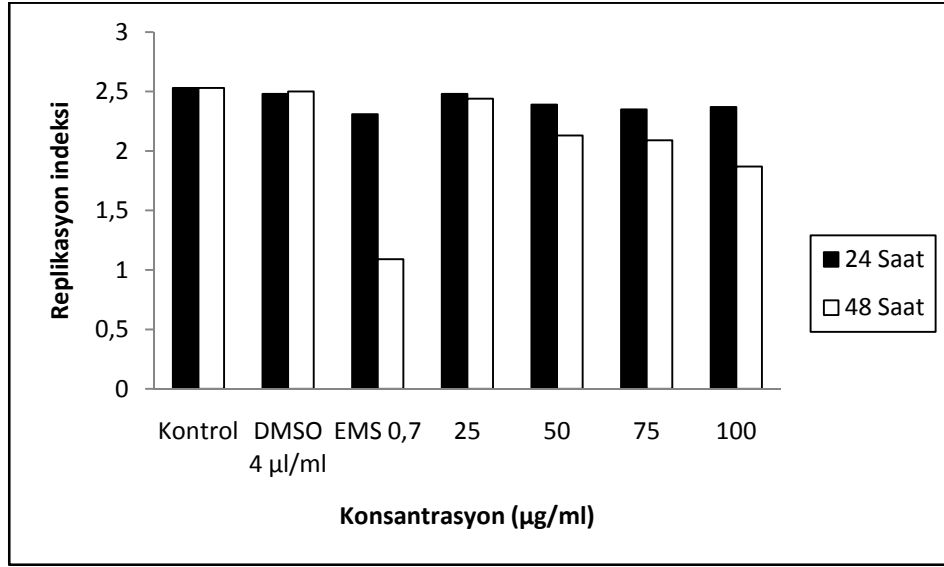
c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

1: P≤0.05; 2: P≤0.01; 3: P≤0.001

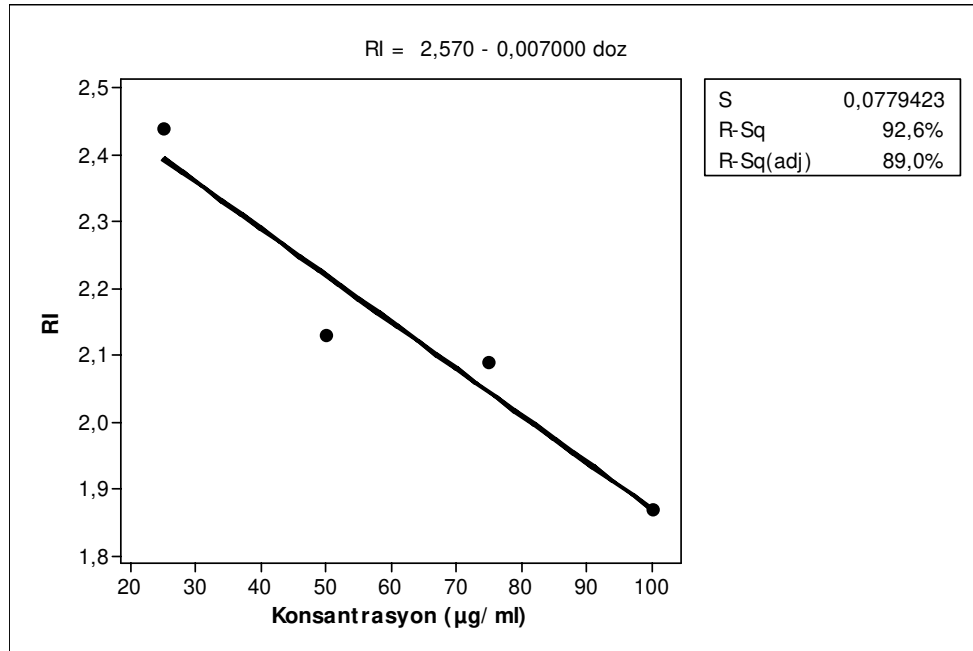
*Sadece toplam 388 hücre sayılabildi

**Sadece toplam 385 hücre sayılabildi

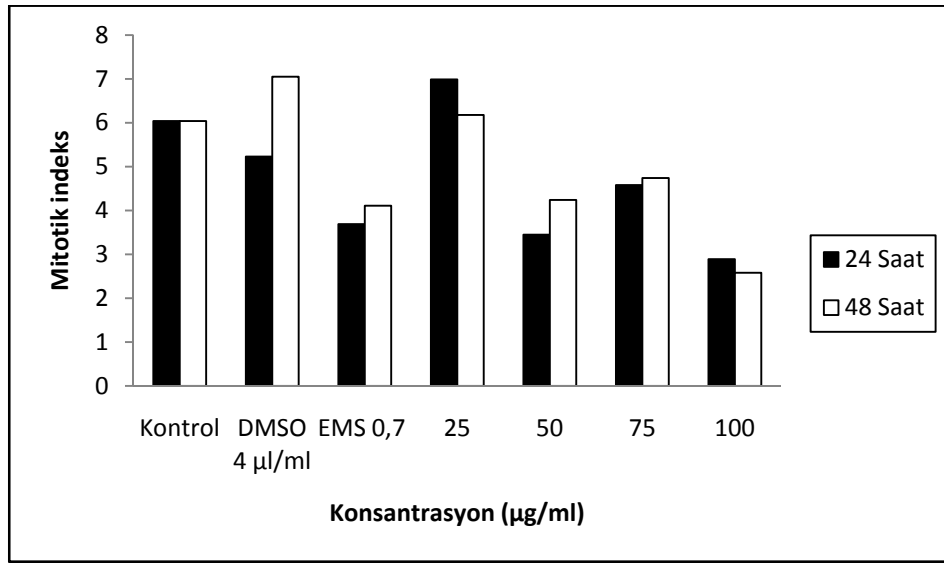
***Sadece toplam 341 hücre sayılabildi



Şekil 4.21. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinde replikasyon indeksi.



Şekil 4.22. Farklı dozlarda thymol ile 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinde replikasyon indeksinin doza bağıll düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P < 0.03$).



Şekil 4.23. Farklı dozlarda Thymol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde mitotik indeks.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, thymol'ün insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormalliği (KA), mikronükleus (MN) oluşumu ve hücre bölünmesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla thymol'ün 25, 50, 75 ve 100 µg/ml'lik dozları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir.

5.1. Thymol'ün İnsan periferal lenfositlerinde KKD, KA ve MN Oluşumu Üzerine Etkileri

Bu çalışmada, thymol özellikle düşük dozlarda KKD sayısını istatistiksel bakımından önemli derecede artırırken yüksek dozlarda KKD sayısını artırmış fakat istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır. Diğer taraftan thymol tüm dozlarda hem yapısal KA sayısını hem de MN oluşumunu indüklemiş, sayısal KA oluşumunu ise artırmamıştır. Ortalama KKD, yapısal KA yüzdesi ve MN oluşumunda doz-etki ilişkisine rastlanmamıştır.

Çalışmamızın konusu olan thymol bileşenlerini içeren *Thymbra spicata* yağının metanollü ekstraktlarının ve γ -terpinene'nin düşük konsantrasyonlarda DNA ipliklerinde kırılmaya neden olmazken, yüksek konsantrasyonda DNA'da önemli zararlara neden olduğu tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda IQ ve MMC'nin neden olduğu DNA zararlarını azalttığı tespit edilmiştir (Aydın ve ark., 2005). Karpouhtsis ve ark. (1998), *Drosophila*'da *Thymbra spicata*'nın bir bileşeni olan carvacrol'ün güçlü bir şekilde insektisidal etki gösterdiği, diğer bir bileşen olan thymol'ün ise insektisidal etki göstermediği, ancak *Drosophila* üzerinde yapılan somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri neticesinde genotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. İpek ve ark. (2003), insan lenfosit hücrelerinde MMC'nin varlığında carvacrol'ün bütün dozlarda SCE'nin oluşumunu artırmadığı, hatta MMC'nin neden olduğu SCE oranlarını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Aydın ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada thyme yağının ana komponentlerinden olan carvacrol'ün 0.05 mM konsantrasyonlarda IQ ve MMC'nin neden olduğu genotoksik aktivitelere karşı koruyucu olduğu halde 0.1mM konsantrasyondaki carvacrol DNA'da zararlara

neden olduğu, thymol'ün ise yaklaşık 0.1mM konsantrasyonlarda DNA ipliklerinde kırılmaya neden olmazken 0.2mM konsantrasyonda DNA'da önemli zararlara neden olduğunu bildirmişlerdir. İpek ve ark. (2005), carvacrol'ün metabolik aktivitenin yokluğunda önemli bir mutajenik aktivite gösterdiğini, her iki türde hem S9 bulunan hem de bulunmayan ortamlarda sırasıyla 4-nitro-o-phenylenediamine ve 2-aminofluorene tarafından meydana getirilen mutajenitenin güçlü bir şekilde inhibe edildiğini ve carvacrol'ün önemli bir şekilde antimutajenik aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır. Ulusal Toksikoloji Programı (NTP, 1990), d-carvone üzerinde yaptıkları çalışmada *Salmonella typhimurium*'da mutajenik etkiye sahip olmadığını, ancak kardeş kromatid değişimine ve kromozomal aberasyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Burada yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen genotoksik, sitotoksik, kanserojenik ve antigenotoksik bulgular, bilim insanları tarafından genel olarak burada kullanılan bitkilerin içerdiği uçucu yağlara değil de bu uçucu yağların ana bileşenleri olan komponentlerden ileri geldiği şeklinde yorumlanmaktadır. Ayrıca Azırak (2007) *Thymbra spicata* uçucu yağının ana komponentleri olan carvacrol ve thymol'ün sıçanlarda genotoksik etkili olduğunu saptamıştır.

Bu çalışmada thymol'ün kuvvetli klastojenik etkiye sahip olduğu, bunun yanında aneujenik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Buradan da thymol'ün DNA molekülünün şeker fosfat omurgasındaki fosfodiester bağlarını koparması yoluyla yapısal kromozom anormalliklerine sebep olduğu ve dolayısıyla da thymol'ün genotoksik risk taşıyabileceği söylenebilir. Daha önce yapılan çalışmalarda da bizim bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçları desteklemiş ve *Thymbra spicata* ana komponentlerinin özellikle yüksek dozlarda DNA kırıklarına sebep olduğu bildirilmiştir.

Bununla birlikte uçucu yağların ana komponentlerinin anti-genotoksik ve özellikle anti-kanserojenik etkiye sahip oldukları yönünde bir çok çalışmaya rastlanmıştır (Kuo ve ark., 1992; Ruch ve Sigler, 1994; Gaworski ve ark., 1997; Higashimoto ve ark., 1998; Ramos ve ark., 2003). Görüldüğü gibi, aslında uçucu yağların birçoğu güvenilirdir. Onların muhtemel mutajenik ve kanserojenik etkileri ile istenmeyen allerjik olaylar gibi yan etkileri bunların gerektiği gibi kullanılmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü

(WHO), tüm ülkelere doğal tıp (fitoterapi) konusuna daha fazla eğilmeleri çağrısında bulunmuştur (WHO, 2001). Uçucu yağlar kullanılırken doz ve saflıklarına özen gösterilmesi gerektiği, dozun uçucu yağların güvenilirliğinde oldukça önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda bazı uçucu yağların yanlış veya oldukça yüksek dozlarda kullanılması sonucunda tümör oluşumuna ve vücutta bir takım zararlı değişikliklere sebep oldukları gözlenmiştir (Qu ve ark., 1992; Shields ve ark., 1995; Chiang ve ark., 1997; Franzios ve ark., 1997; National Toxicology Program, 1982; Lazutka ve ark., 2001; Al-Batina ve ark., 2003; Bakkali ve ark., 2005). Ayrıca uçucu yağların uygulanma şekilleri de önemlidir. Uçucu yağların uygulanmasındaki yöntemler uçucu yağa göre değişiklik gösterir. Genellikle uçucu yağlar kullanılırken sadece tek bir uygulama metodu kullanılması gerekir. Örneğin bazı uçucu yağların sadece nefes yoluyla kullanılması güvenilirdir. Eğer bu yağlar deri üzerinde kullanılırsa çok düşük miktarlarda bile thyme, oregano ve cinnamon yağlarında olduğu gibi % 3-5 oranında nörotoksik etkilerinin ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Young ve ark., 1970; Millet ve ark., 1981; Steinmetz ve ark., 1987; Wang ve ark., 1991; Cheng ve ark., 1992; Craing ve ark., 1994; Robles ve ark., 1999; Burkhard ve ark., 1999). Görüldüğü gibi bitkilerin uçucu yağlarının ve ana komponentlerinin genotoksik etkileri aşırı doz ve uygun olmayan kullanım metotlarından da kaynaklanabilmektedir.

Thymol kimyasal yapı olarak fenol grubu bileşiklerdendir. Bir benzen halkasına doğrudan doğruya bir hidroksil grubunun bağlandığı bileşiklere fenol adı verilir. Bu nedenle; fenol, hidroksibenzen'in özel ismidir ve hidroksibenzenden türevlendirilmiş bileşik ailesinin genel ismidir (Cengiz, 1996; Solomons, 1988). Fenol çok kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir (30.3 ± 2.8 dk.). Çok hızlı bir şekilde karaciğerde metabolize olur. Sülfat ve glukuronidle birleşmiş olarak idrarla atılır (Fager ve Messer, 1986; Nomato ve ark. 1987). İnsan ve tavşanlara ağız yoluyla verilen thymol'un metabolize olarak thymol sülfat, thymol glukoronit ve thymohydroquinone bileşenleri şeklinde idrarla atıldığı bildirilmiştir (BG Chemie, 2000). Bilindiği üzere fenolik bileşikler ve bunların türevleri gerek insan ve hayvan, gerekse bitkilerde sitotoksik ve genotoksik hasarlara sebep olmaktadır (De Marco ve ark., 1986; Williams, 1989; Migliore ve ark., 1990). Bu etkisini kardeş kromatid

değişiminde artışa neden olan DNA polimerazı inhibe ederek gösterdiği düşünülmektedir. Çünkü konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada kurşunun, toksik etkisini direkt DNA polimerazı inhibe ederek gösterdiği belirtilmiştir (De Marco ve ark., 1986). Capasso ve Cristinzio (1992), polifenol içeren atık sularla sulanmış tarım alanlarında yetiştirilen bitkiler üzerinde yaptıkları çalışmada atık sudaki polifenol bileşiklerin profazda granülasyona, heterojen kromatin dağılımına, metafazda yığılmaya, anafazda köprü oluşumuna, telofazda erken veya geç sitokineze, hücre plağının oluşmamasına, asimetrik kromozom dağılımına ve kromozomlarda heterojen çözümler gibi değişik anormalliklere neden olduğunu gözlemişlerdir. Bu anormalliklerin, muhtemelen atık suyun hücrede DNA sentezi ve tamir mekanizmasında yer alan enzimatik reaksiyonlar üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı meydana geldiği ileri sürülmektedir (De Marco ve ark., 1986). Bunların yanısıra mutajenik etki olarak kromozom yapılarında kırılmalara ve kromozom sayısında yüksek oranda sapmalara, nükleus parçalanmalarına ve mikronükleus oluşumlarına da rastlanmıştır (Aybeke ve ark., 2000).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2001) yayınladığı raporda thymol'un kullanılmaya uygun olmayacak kadar tehlikeli olduğu belirtilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü raporunda thymol'un NOEL (no observed effect level=etkinin görülmediği doz) değerinin 1000 mg/kg/günlük dozu olduğunu bildirmiş, fakat bu değer gerçeği yansıtmadığını çünkü tek bir seferde ve tekrarlanmadan verilen bir doz olduğunu da açıklamışlardır (WHO, 2001). Aynı raporda phenylphenol bileşiğinin günlük alınabilir dozunu (ADI) 0-0.2 mg/kg olarak açıklanmıştır. Bu değerler bizim bu çalışmada kullandığımız thymol değerlerinin oldukça altında olduğu görülmektedir. Dolayısıyla thymol gibi fenolik bileşiklerin mümkün olduğunca az kullanılmasının sağlık açısından oldukça gerekli olduğu söylenebilir.

5.2. Thymol'un Hücre Bölünmesi Üzerine Etkisi

Thymol'un insan periferik lenfositlerinde sisotoksik etkisi nükleer bölünme indeksi (NBI), replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeksi'nin (MI) saptanması ile belirlenmiştir. Thymol özellikle yüksek dozlarda ve her iki muamele süresinde

NBI'ni doza bağılı bir şekilde düşürmüştür. Thymol, RI'ni 24 saatlik muamele süresinde düşürmesine rağmen istatistiksel bakımından önemli bulunamamış, fakat 48 saatlik muamele süresinde RI'ni en yüksek dozda önemli derecede düşürmüş bu düşüş doza bağılı olarak gerçekleşmiştir. Thymol MI'i özellikle yüksek dozlarda düşürmüş, fakat doz-etki ilişkisine rastlanmamıştır.

Azırac (2007) thymol ve carvacrol'un in vivo sıçan kemik iliği hücrelerinde MI'i düşürdüğü ve sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Stamatı ve ark. (1999), antifungal aktivite gösteren carvacrol ve thymol'ü genotoksik ve sitotoksik açıdan değerlendirilmesi için memelilerde ve mikroorganizmalarda yaptıkları testler neticesinde S(+)-carvone, cinnamaldehyde ile 0,2 mM carvacrol'un Hep-2 hücrelerinin canlılığını ve bölünmesini tamamen inhibe ettiğini, DNA tamir testinde de carvacrol'un toksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Thymol'un mitoz bölünmeyi inhibe etmeleri yoluyla sitotoksik etki yaptıkları anlaşılmaktadır. Epel (1963) ve ayrıca Jain ve Andsorbhoy (1988) kimyasalların hücre enerji üretim merkezlerinin fonksiyonlarını baskı altında tuttıkları ve dolayısıyla ATP sentezinin azaltılması sonucu hücre bölünmesinin yavaşlatıldığını ve sitotoksik etkinin ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar da kimyasal maddelerin KA'yı uyarma yoluyla sitotoksik etkiye sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Armstrong ve ark. 1992; Hilliard ve ark. 1998; Galloway ve ark. 1998). Vock ve ark. (1998) ile Kirkland ve Müller (2000) bazı kimyasalların in vitro sitotoksik etkilerinin DNA çift iplik kırıklarının oluşmasına bağılı olarak ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada thymol DNA çift iplik kırıklarına sebep olarak kromozom yapı anormalliklerini artırdığı saptanmıştır. Muhtemelen test maddesi de sitotoksik etkisini bu yolla göstermektedir.

Ayrıca Madle (1993), KA içeren hücrelerin mitotik seleksiyon yoluyla döngüden çıkartılacağını ve dolayısıyla MI'in düşürüleceğini bildirmiştir. Mitotik seleksiyon, bölünme yönünden aktif olan hücrelerde kromozom aberasyonlu hücrelerin eliminasyonu olarak tanımlanabilir. Yani mitotik seleksiyon tamir edilemeyecek kromozom aberasyonu içeren hücrelerin hücre döngüsünden uzaklaştırılması ve öldürülmesi olayıdır. Bu araştırmacılara göre mitotik seleksiyona, DNA fragmentasyonu ve bunun sonucunda oluşan köprü oluşumu, asentrik

(kinetokorsuz) fragmentlerin kaybolması ile oluşan gen kaybı veya bunların sonucunda mikronükleus oluşumu dolayısıyla genetik materyalin kaybı gibi anormallikler sebep olmaktadır.

Thymol'ün sitotoksik etkisinden dolayı kanserleşmeyi önleyici etkisinin olabileceği söylenebilir. Çünkü anti-kanser olarak kullanılan ve ilaç diye tanımlanan kimyasalların sitostatik etkileri sonucu kanseri önledikleri bilinmektedir. Bununla birlikte bitkilerden elde edilen uçucu yağların insan akciğer ve kolon adenokarsinoma hücrelerini öldürdükleri (Sylvestre ve ark., 2005; Sylvestre ve ark., 2006), insan promyelocytic lösemi hücrelerinde (HL-60) apoptozu indükledikleri (Yoo ve ark., 2005) ve büyüme inhibitörü gibi davrandıkları (Jing ve Waxman, 1995) bildirilmiştir. Ayrıca Ivankovic ve ark. (2006), L929 farelerinin fibroblastları ve SCCVII ile FsaR tümör hücreleriyle in vivo ortamda yaptıkları çalışmada thymol'ün metabolitlerinin bir bileşeni olan thymohydroquinone'nin sitotoksik olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, thymol'ün insan periferel lenfositlerinde ya ATP üretimini baskı altında tutmasından ya da genotoksik etkisinden dolayı hücre bölünmesini azalttığı ve sitotoksik etki gösterdiği söylenebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bilindiği gibi thymol tıpta, eczacılıkta, kozmetikte, aromaterapide, endüstride, yiyecek ve içeceklerde ayrıca temizlik ürünlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Thymol insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi sayısını, yapısal kromozom anormalliklerini ve mikronükleus oluşumunu artırmış, nükleer bölünme indeksi, replikasyon indeksi ve mitotik indeksini düşürmüştür.

Thymol insanların yaşamında genel olarak her alanda kullanılmaktadır. Bu maddelerle insanlar bir şekilde güncel hayatlarında karşılaşmaktadırlar. Uçucu yağların genotoksik etkileri önemli ölçüde içerdiği komponentlerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle kullanılacak bitki ve komponentlerinin toksik olup olmadığı deneylerle kesinleşmeli ve daha sonra kullanılmalıdır. Ayrıca uçucu yağlar ve onun komponentleri belli bir dozdan sonra yine toksik etki göstermesi bakımından kullanılan dozlar ve miktarları iyice belirlendikten sonra kullanılmalıdır. Uçucu yağlar ve onun komponentleri aromaterapide genel olarak hastalıkların iyileştirilmesinde tamamlayıcı bir hekimlik olarak kullanılmaktadır. Yerine göre ve dozunda kullanıldığında şifa dağıtan uçucu yağlar ve komponentleri yanlış kullanıldığında insan için zararlı olabilmektedir.

Bu çalışmada insan lenfositleri ile yapılan in vitro ve daha önce sıçanlarla yapılan in vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlar insanlarda görülmesi muhtemel sonuçları bize göstermesi bakımından önemlidir. Yaptığımız çalışma sonucunda thymol'un genotoksik ve sitotoksik risk taşıyabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- ABRAHAM S.K., 2001. Antigenotoxicity of *trans*-anethole and eugenol in mice. Food and Chemical Toxicology, 39: 493-498.
- AL-BATAINA, B.A., MASLAT, A.O. and AL-KOFAHIL, M.M., 2003. Element analysis and biological studies on ten oriental spices using XRF and Ames test. J. Trace Elem, Med. Biol., 17(2): 85-90.
- 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.
- ANDERSON, D., 1988. Human Biomonitoring. Mutat. Res., 204: 353-541.
- ANTON, R., 2000. Are essential oils essentially safe. The Pharmaceutical Journal. 265(7119): 628.
- ARMSTRONG, M.J., BEAN, C.L. and GALLOWAY, S.M., 1992. A quantitative assessment of the cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells. Mutat Res., 265(1): 45-60.
- AYBEKE, M., OLGUN, G., SIDAL, U. ve KOLANKAYA, D., 2000. Zeytinyağı fabrikası atık suyunun buğday (*Triticum aestivum* L.) kök ucu hücrelerindeki mitoz bölünme ve total protein miktarı üzerine etkisi. Tr. J. Biol. 24: 127-140.
- AYDIN, S., BAŞARAN, A.A. and BAŞARAN, N., 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 581(1-2): 43-53.
- AZIRAK, S., 2007. Thymol ve carvacrol'un *in vivo* genotoksik etkilerinin araştırılması, Ç.Ü.Fen Bilimleri Eenstitiüsü, Doktora Tezi, 122 sayfa.
- AZIZAN, A. and BLEVINS R.D., 1995. Mutagenicity and antimutagenicity testing of six chemicals associated with the pungent properties of spesific spices as revealed by the Ames Salmonella/microsomal assay. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 28: 248-258.

- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., ZHIRI, A., and IDAOMAR, M., 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.*, 585(1-2): 1-13.
- BAYTOP, T., 1984. Türkiye de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları. No: 3255, İstanbul.
- BENLİ, M. ve YİĞİT, N., 2005. Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 3(08): 1-8.
- BG CHEMIE, 2000. Thymol No. 259. Toxicological Evaluation.
- BILSLAND, D., and STRONG, A., 1990. Allergic contact dermatitis from the essential oil of French Marigold (*Tagetes patula*) in an aromatherapist. *Contact Dermatitis*, 23(1): 55-6.
- 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., 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.
- BONASSI, S., UGOLINI, D., KIRSCH-VOLDERS, M., STRÖMBERG, U., VERMEULEN, R., 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., FENECH, M., 2007. An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. *Carcinogenesis*, 28: 625-631.

- BURKEY, J.L., SAUER, J.M., McQUEEN, C.A. and SIPES I.G., 2000. Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners—a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutat Res.*, 453: 25-33.
- BURKHARD, P.R., BURKHARDT, K., HAENQELI, C.A., and LANDIS, T., 1999. Plant-induced seizures: reappearance of an old problem. *J. Neurol.*, 246(8): 667-670.
- BURT, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223-253.
- CAPASSO, R., and CRISTINZIO, G., 1992. Evidente A. and Scognamiglio F.: Isolation spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste water. *Phytoch.*, 31(12): 4125-4128.
- 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.
- CARRANO, A.V. and NATARAJAN A.T., 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutat. Res.*, 204: 379-406.
- CARSON, C.F., and RILEY, T.V., 1995. Toxicity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* or tea tree oil [Letter; comment]. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*, 33(2): 193-194.
- CENGİZ, T., 1996. Endodonti. 4. baskı. Barış Yayınları, İzmir, 267 sayfa.
- 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, C.H.K., COSTALL, B., HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K., NAYLOR, R.J., WANG, Y., and JENNER, P., 1992. Toxic Effects of Solstitialin A 13-Acetate and Cyanoropicrin from *Centaurea solstitialis* L. (Asteraceae) in Cell Cultures of Foetal Rat Brain. *Neurupharmacology*, 31(3): 271-277.

- 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. *Mutat. 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. *Mutat. Res.*, 381(2): 157-161.
- CRAING, A.M., BLYTHE, L.L., ROY, D.N., and SPENCER, P.S., 1994. Detection and Isolation of Neurotoxins from Yellow Star Thistle (*Centaurea solstitialis*), the Cause of Nigropallidal Encephalomalacia 4th, Plant-Assos. Toxins, 257-262.
- 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.
- ÇELİK, E. ve ÇELİK, G.Y., 2007. Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2): 1-6.
- 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.
- DE MARCO, A., ROMANELLI, M., STAZZI, M.A., and VITAGLIANO, E., 1986. Induction of micronucleated cells in *Vicia faba* and *Allium cepa* root tips treated with NTA. *Mutat. Res.*, 171: 145-148.
- DE-OLIVEIRA, C.A.X., RIBERIO-PINTO, L. F. and PAUMGARTTEN, F.J.R., 1997. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicology Letters*, 92: 39-46.
- DI PASQUA, R., HOSKINS, N., BETTS, G. and MAURRIELLO, G., 2006. Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addiction of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde and Eugenol in the Growing Media. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 2745-2749.
- DORMAN, H.J., BACHMAYER, O., KOSAR, M., and HILTUNEN, R., 2004. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agric. Food. Chem.*, 52(4): 762-770.

- DUDAI, N., LARKOV, O., MAYER, AM., MAYBER, AP., PUTIEVSKY, E., and LERNER, HR., 2000. Metabolism of essential oils during inhibition of wheat seed germination. In: Seed Biology: Advances and Applications (M.J. Black, K.J. Bradford and J. Vazquez-Ramoz, eds.), CABI, Wallingford, Oxon, UK. Seed Biology, s. 315-320.
- 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.
- DUKE, S.O., 1985. Weed physiology. Herbicide physiology. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 2: 251.
- EPEL, D., 1963. The effects of carbon monoxide inhibition on ATP level and the rate of mitosis in the sea urchin egg. *J. Cell Biol.*, 17: 315-319.
- EVANDRI, M.G., BATTINELLI, L., DANIELE, C., MASTRANGELO, S., BOLLE, P. and MAZZANTI, G., 2005. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 1381-1387.
- EVANS, H.J., 1984. Handbook of Mutagenicity Test Procedures. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (Eds.), Human peripheral blood 63 lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Second edition, Elsevier Science Publishers, BV, pp. 405-427.
- FAGER, FK., and MESSER, HH., 1986. Systemic distribution of camphorated monochlorophenol from cotton pellets sealed in pulp chambers. *Journal of Endodontics*, 12: 225-230.
- 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. *Mutat. Res.*, 428: 271-283.
- FENECH, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81-95.
- FENECH, M., 2002. Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. *Toxicology*, 181: 411-416.

- FRANZIOS, G., MIROTSOU, M., HATZIAPOSTOULOU, E., KRAL, J., SCOURAS, Z.G. and MAVRAGANI, P.T., 1997. Insecticidal and Genotoxic Activities of Mint Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7): 2690-2694.
- GALLOWAY, S.M., MILLER, J.E., ARMSTRONG, M.J., BEAN, C.L., SKOPEK, T.R. and NICHOLS, W.W., 1998. DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactiveclastogens. *Mutat. Res.*, 400(1-2): 169-186.
- GAWORSKI, C.L., DOZIER, M.M., GERHART, J.M., RAJENDRANS, N., BRENNECKE, L.H., ARANYI, C. and HECK, J.D., 1997. 13-Week inhalation toxicity study of menthol cigarette smoke. *Food Chem. Toxicol.*, 35: 683-692.
- GILLESPIE, A.R., 1998. Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping. Effect of juglone on hydroponically grown corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.) growth and physiology. *Plant and Soil*, 203(2): 199-206.
- GOMES-CARNEIRO, M.R., FELZENSZWALB, I. and PAUMGARTTEN, F.J.R., 1998. Mutagenicity testing of ($\pm$)-camphor, 1,8-cineol, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/Microsome assay. *Mutat. Res.*, 416 129-136.
- GOMES-CARNEIRO, M.R., VIANA, M.E., FELZENSZWALB, I. and PAUMGARTTEN, F.J., 2005. Evaluation of beta-myrecene, alpha-terpinene and (+)- and (-)-alpha-pinene in the Salmonella/microsome assay. *Food Chem. Toxicology*, 43: 247-252.
- GÜRSOY, O.V. ve GÜRSOY, U.K., 2004. Anadolu'da dış ve dış eti ile ilgili hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bitkiler, kullanım şekilleri ve bitkisel özellikleri. Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, cilt:7, sayı:1.
- HAGMAR, L., BRØGGER, 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.
- 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. *Mutat. Res.*, 532: 103-115.
- HIGASHIMOTO, M., YAMATO, H., KINOUCHI, T., and OHNISHI, Y., 1998. Inhibitory effects of citrus fruits on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of ethanol. *Mutat. Res.*, 415(3):219-226.
- HIKIBA, H., WATANABE, E., BARRET, C.J. and TSUTSUI, T., 2005. Ability of chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in syrian hamster embryo cells. *J. Pharmacol Sci.* 97, 146-152
- HILLIARD, C.A., AMSTRONG, M.J., BRADT, J.I., HILL, R.B., GREENWOOD, S.K. and GALLOWAY, S.M., 1998. Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons. *Env. Mol. Mutag.* 31(4): 316-326.
- HOWES, A.J., CHAN, V.S. and CALDWELL, J., 1990. Structure-specificity of the genotoxicity of some naturally occurring alkenylbenzenes determined by the unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicology*, 28(8): 537-542.
- IVANKOVIC, S., STOJKOVIC, R., JUKIC, M., MILOS, M., MILOS, M. and JURIN, M., 2006. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone *in vitro* and *in vivo*. *Exp Oncology* 28(3): 220-224.
- İPEK, E., TÜYLÜ, B.A. and ZETİNOĞLU, H., 2003. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 43: 145-148.
- İPEK, E., ZEYTİNOĞLU, H., OKAY, S., TÜYLÜ, B.A., KÜRKÇÜOĞLU, M. and BAŞER, K.H.C., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and

- carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. Food Chemistry, 93: 551-556.
- JAIN, A.K., and ANDSORBHOY, R.K., 1988. Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding remarks. Cytologia, 53: 427-436.
- JAIN, S., SHRIVASTAVA, S., NAYAK, S. and SUMBHATE, S., 2007. PHCOG MAG.: Plant Review, Recent trends in *Curcuma longa* Linn. Pharmacognosy Reviews, Vol 1, Issue 1.
- JING, Y. and WAXMAN, S., 1995. Structural requirements for differentiation-induction and growth-inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavones.: Anticancer Res. 15(4): 1147-1152.
- KARPOUHTSIS, I., PARDALI, E., FEGGOU, E., KOKKINI, S., SCOURAS, Z.G., and MAVRAGANI-TSIPIDOU, P., 1998. Insectisidal and genotoxic activities of Oregano essential oils. J. Agric. Food Chem., 46(3): 1111-1115.
- 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.
- KIRKLAND, D.J., and MULLER, L., 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. Mutat. Res., 464(1): 137-147.
- 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. Mutat. 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. Mutat. Res. 540, 153–163.
- KNIGHT, T.E., and HAUSEN, B.M., 1994. Melaleuca oil (tea tree oil) dermatitis. J. Am. Acad. Dermatol. 30(3): 423-427.

- KUO, M.L., LEE, K.C. and LIN J.K., 1992. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3- carbinol in the Salmonella and CHO systems. *Mutat. Research*, 270(2): 87-95.
- LAZUTKA, J.R., MIERAUSKIEN, J., SLAPSYTE, G., and DEDONYTE, V., 2001. Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 39(5): 485-492.
- LENOIR, C., CORBINEAU, F., and COME, D., 1983. Role des glumalles dans la dormance des semences d'Orge. *Phy. Vég.*, 21(4): 633-643.
- MACE, M.L.J., DASKAL, Y. and WRAY, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutat. Res.* 52, 199–206.
- MADLE, S., 1993. Problem of the harmonization of philosophies for genotoxicity testing. *Mutat Res.*, 300(2): 73-76.
- MEZZOUG, N., ELHADRI, A., DALLOUH, A., AMKISS, S., SKALI, N.S., ABRINI, J., ZHIRI, A., BAUDOUX, D., DIALLO, B., EL JAZIRI, M. and IDAOMAR, M., 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat. Res.*, 629:N100-110
- MIGLIORE, L., BARALER, B.E., GIORGELLI, F., MINNUNNI, M., SCARPATO, R. and LOPRIENO, N., 1990. Genotoxicity of emthyglyoxal: cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro and intestinal cells of mice. *Carcin.*, 11(9): 1503-1507.
- MILLET, Y., JOUGLARD, J., STEINMETZ, M.D., TOGNETTI, P., JOANNY, P., and ARDITTI, J., 1981. Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Clin. Toxicol.*, 18: 1485–1498.
- MULLER, C., MULLER, WH., and HAINES, BL., 1964. Volatile growth inhibitörs produced by aromatic shrubs. *Science*, 143:471-473.
- MULLER, C.H., and DEL MORAL, R., 1966. Soil toxicity induced by terpenes from *S. leucophylla*. *Bull. Torrey Bot. Club*, 93: 130-137.
- MULLER, W.H., and HAUGE, R., 1967. Volatile growth inhibitörs produced by *S. leucophylla*: Effect on seedling anatomy, *Bull. Torrey Bot. Club*, 94: 182-191.

- MULLER, C.H., HANAWALT, R.B., and MCPHERSON, J.K., 1968. Allelopathic control of herb growth in the fire cycle of *Californica chaparral*. Bull. Torrey Bot. Club., 95: 225-231.
- MULLER, L, KASPER, P, MÜLLER-TAGETHOFF, K. and PETR, T., 1994. The genotoxic potential in vitro and in vivo of the allyl benzene etheric oils estragole, basil oil and trans-anethole. Mutat. Res., 325: 129-136.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM., 1982. CHO cell cytogenetics; chromosome aberrations and sister chromatid exchanges from exposure to 1,8 cineole. Study, 590755.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM., 1990. NTP toxicology and carcinogenesis studies of d-Carvone (CAS no. 2244-16-8) in B6C3F1 mice (gavage studies). National Toxicology Program Tech. Rep. Ser., Mar; 378:1-191.
- NOMATO, Y., FUJITA, T., and KITANI, Y., 1987. Serum and urine levels of phenol following phenol blocks. Can. J. Anaesth., 34(3): 307-10.
- 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. Mutat. Res., 600 (1-2): 37-45.
- 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.
- PERRY, P.E. and THOMSON, E.J., 1984. The methodology of sister chromatid exchanges, in: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.),

- Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam, pp. 459–529.
- PRASHAR, A., LOCKE, I.C. and EVANS, C.S. 2004. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif.* 37: 221-229.
- 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. *Mutat. Res.*, 298(2): 105-111.
- RAMOS, A., VISOZO, A., PILOT, J., GARCIA, A., RODRIGUEZ, C.A. and RIVERO, R., 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 87(2-3): 241-246.
- 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.
- ROBLES, C., BONIN, G., and GARZINO, Z., 1999. Autotoxic and allelopathic potentials of *Cistus albidus* L. *C. R. Acad. Sci. III.*, 322(8): 677-685.
- ROZMAN, V., KALINOVIC, I. and KORUNIC, Z. 2006. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, doi:10.1016/j.jspr.2006.09.001.
- RUCH, R.J., and SIGLER, K., 1994. Growth inhibition of rat liver epithelial tumor cells by monoterpenes does not involve rat plasma membrane association. *Carcinogenesis*, 15: 787-789.
- SAVAGE, J.R.K., 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. *Env. Mol. Mutagen.*, 22: 198-207.
- SEIDJOVA, J. and SARAPATKA, B., 1997. Bioherbicidal effects of peppermint (*Mentha piperita*) on selected weed species: a laboratory study. *Biologia, Bratislava*, 52(1): 85-90.
- SEKIZAWA, J. and SHIBAMOTO, T., 1982. Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems. *Mutat. Res.*, 101(2): 127-140.
- SHIELDS, P.G., XU, G.X., BLOT, W.J., FRAUMENI, J.F. TRIVERS, G.E., PELLIZZARI, E.D., QU, Y.H., GAO, Y.T., and HARRIS, C.C., 1995.

- Mutagens from heated Chinese and U.S. cooking oils. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87(11): 836-841.
- SOLOMONS, T.W.G., 1988. Organic chemistry fourth edition. John Wiley&Sons, 649.
- 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.
- 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. *Hum. Gen.*, 70, 126-129.
- STAMMATI, A., BONSI, P., ZUCCO, F., MOEZELAAR, R., ALAKOMI, H.L. and Von WRIGHT, A., 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chem Toxicol.*, 37: 813-823.
- STEINMETZ, M.D., VIAL, M., and MILLET, Y., 1987. Actions of essential oils of rosemary and certain its constituents (eucalyptol and camphor) on the cerebral cortex of the rat in vivo. *J. Toxicol Clin. Exp.*, 7(4): 259-271.
- SUGIURA, M., HAYAKAWA, R., KATO, Y., SUGIURA, K., and HASHIMOTO, R., 2000. Results of patch testing with lavender oil in Japan. *Contact Dermatitis*, 43(3): 157-160.
- 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. *Mutat. Res.*, 342: 43-59.
- SWANSON, A.B., CHAMBLISS, D.D., MILLER, E.C. and MILLER, J.A., 1979. The mutagenicities of safrole, estragole, eugenol, trans-anethole and some of their known or possible metabolites for *Salmonella typhimurium* mutants. *Mutation Research*, 60(2): 145-153.
- SYLVESTRE, M., LEGAULT, J., DUFOUR, D., and PICHETTE, A., 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12(4): 299-304.

- SYLVESTRE, M., PICHETTE, A., LONGTIN, A., NAGAU, F., and LEGAULT, J., 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharmacol.*, 103(1): 99-102.
- TANSI, S., 1995. Uçucu yağların bazı bitkiler ve toprak mikroorganizmalarına etkileri. *Çukurova Üniversitesi Zir. Fak. Der.*, 10(2):43-50.
- TARAYRE, M., THOMPSON, J.D., ESCARRE, J., and LINHART, Y.B., 1995. Intra-specific variation in the inhibitory effects of *Thymus vulgaris* (Labiatae) monoterpenes on seed germination. *Oecologia*, 101(1): 110-118.
- TOPAKTAŞ, M. ve RENCÜZOĞULLARI, E., 1995. Sitogenetik. *Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü*. s. 68.
- TOPAKTAS, 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.
- TSUZUKI, E., and KAWAGOE, H., 1984. Studies on allelopathy among higher plants. *Bull. Fac. Agric. Miyazaki Univ.*, 31: 189-196.
- 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. *Mutat. Res.*, 297: 101-180.
- VOCK, E.H., VAMVAKAS, S., GAHLMANN, R., and LUTZ, W.K., 1998. Investigation of the induction of DNA double-strand breaks by methylenediphenyl-4-4'-diisocyanate in cultured human lung epithelial cells. *Toxicol Sci.*, 46(1): 83-9.
- WANG, Y., HAMBURGER, M., CHENG, C.H.K., COSTALL, B., NAYLOR, R.J., JENNER, P., and HOSTETTMANN, K., 1991. 12. Neurotoxic sesquiterpenoids from the yellow star thistle *Centaurea solstitialis* L. (Asteraceae)", *Helv. Acta Chim.*, 74(1): 117-123.
- WHO, 2001. Phenol and phenol derivatives, Prepared By; Mattia, A. and Sipes, G.I. Food Additive Series No: 46.
- WILLIAMS, G.M., 1989. Methods for evaluating chemical genotoxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29: 189-211.

- YOO, C.B., HAN, K.T., CHO, K.S., HA, J., PARK, H.J., NAM, J.H., KIL, U.H. and LEE, K.T., 2005, Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.*, 225(1): 41-52.
- YOUNG, S., BROWN, W.W., and KLINGER, B., 1970. Nigropallidal encephalomalacia in horses fed russian knapweed (*Centaurea repens* L.)", *Am. J. Vet. Res.*, 31(8): 1393-1404.

ÖZGEÇMİŞ

Hatay'ın Antakya ilçesi Serinyol beldesinde 1982 yılında doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Serinyol'da tamamladım. 2001 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü okumaya hak kazandım. 2005 yılında lisans eğitimini tamamlayarak Biyolog ünvanını aldım. 2005 yılında aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimime başladım.