

**BİTKİSEL KAYNAKLI BAZI UÇUCU YAĞ  
ve  
MONOTERPENLERİN OLASI GENOTOKSİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Adalet Kılıç**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Eylül- 2005**

## JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Adalet Kılıç' ın “ Bitkisel Kaynaklı Bazı Uçucu Yağ ve Monoterpenlerin Olası genotoksik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi.....tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav yönetmenliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

<u>Adı- Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye(Tez Danışmanı):Yard. Doç. Dr. Berrin AYAZ TÜYLÜ	.....
Üye :Yard. Doç. Dr. Mediha CANBEK	.....
Üye :Yard. Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL	.....

Anadolu üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BİTKİSEL KAYNAKLI BAZI UÇUCU YAĞ VE MONOTERPENLERİN OLASI GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ADALET KILIÇ

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman:Yard. Doç. Dr. Berrin AYAZ TÜYLÜ  
2005, 60 sayfa

Çeşitli bitkilerden ekstrakte edilen uçucu (esansiyel) yağlar ve bu yağlardan izole edilen terpenoid bileşikler; farklı biyolojik aktivitelerinden dolayı, aromaterapide, kozmatikte, gıda üretiminde, ilaç sanayisinde oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu tez çalışmasında, bazı bitkilere ait esansiyel yağ ve monotermenlerin olası genotoksik aktivitesi, insan periferel lenfositlerinde HPRT gen mutasyon testi ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kekik yağı uygulanan tüm dozlarda varyans frekansı değerini önemli ölçüde yükselterek , HPRT gen mutasyonu açısından etkin bir aktiviteye sahip olmuş bileşenlerinden olan karvakrolün, bu aktiviteyi çok düşük düzeyde gösterirken, timolün ise negatif bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan diğer test maddeleri olan defne ve adaçayı esansiyel yağı ile cineol-1,8'in ise yüksek olan ilk dozlarda, varyans frekeansı değerini çözücü kontrole göre yükselterek, doza bağlı olarak HPRT gen mutasyonuna sebep olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelime: Esansiyel yağ, monotermenler, HPRT, İnsan lenfositleri,  
Genetoksisite

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****GENOTOXIC ACTIVITY OF ESSENSTIAL OILS AND  
MONOTERPENES STUDIES****ADALET KILIÇ****Anadolu University  
Graduate schooll of Sciences  
Biology Program****Supervisor: Assist.Prof.Dr. Berrin AYZAZ TÜYLÜ  
2005, 60 pages**

Essential oils and isolated from its terpenoid compounds of extracted from various plants have different biological activities. In this case, they are used in aromatherapy, cosmetics, food and drug industries. In this study, genotoxic activity of some essential oils and monoterpenes obtained from some plants investigated with HPRT gen mutation assay in human lymphocytes. According to the results, thym essential oil have efficient HPRT gen mutation activity due to increase of variant frequency at all of the doses. Also, its compounds carvacrol has slight HPRT activity but thymol has negative effect. It was resulted that other test compounds bay-leaf, salve essential oil and cineol-1,8 cause the HPRT gene mutation at high concentrations by increase of variant frequency values.

**Keywords: Essential oils, Monoterpenes, HPRT, Human Lymphocytes,  
Genotoxicity**

## TEŞEKKÜRLER

Öncelikle, çalışmamda biyoloji bölümünün bütün imkanlarını sağladıkları için Fen Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya ve Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Merih KIVANÇ' a çok teşekkür ederim. Ayrıca çalışmamda beni destekleyen, yönlendiren ve her konuda yardımcı olan danışmam hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ' e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardımda bulunan yüksek lisans öğrencisi Tuba ÇULÇU ve Tuba BÜYÜKÇOBAN' a da ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz sevgilerimi sunarım.

Adalet KILIÇ

Eylül- 2005

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜRLER.....</b>	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ .....</b>	<b>ix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>x</b>
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Genotoksik Ajanlar .....	3
1.1.1. Genotoksik Etkili Fiziksel Ajanlar.....	3
1.1.1.1. İyonize Radyasyonun Teşvik Ettiği Mutasyonlar.....	3
1.1.1.2.İyonize Olmayan Radyasyonun Teşvik Ettiği Mutasyonlar.....	4
1.1.2. Genotoksik Etkili Kimyasal Ajanlar.....	4
1.1.2.1. Alkileyici Ajanlar.....	4
1.1.2.2. Hidroksile Edici Ajanlar.....	5
1.1.2.3. Çapraz bağlayıcı (Cross-Linking) Ajanlar .....	5
1.1.2.4. Psoralenler.....	6
1.1.2.5. Baz Analogları.....	6
1.1.2.6. Klastojenik Ajanlar.....	7
1.1.2.7. Metabolik Aktivasyon Reaksiyonları Sonucu Aktif Olan Kimyasallar Ajanlar.....	7
1.2. Toksik Bileşiklerin Metabolizması.....	9
1.2.1. Birinci Evre Reaksiyonları.....	10
1.2.1.1. Oksidasyon Reaksiyonları.....	10
1.2.1.2. Redüksiyon Reaksiyonları.....	10
1.2.1.3. Hidroliz Reaksiyonları.....	11
1.2.2. İkinci Evre Reaksiyonları.....	11
1.2.2.1. Sülfatlama.....	11

1.2.2.2. Glukuronidasyon.....	11
1.2.2.3. Glutasyon Konjugasyonu.....	12
1.2.2.4. Amino Asit Konjugasyonu.....	12
1.2.2.5. Metilasyon.....	12
1.3. Genotoksik Ajanların Etki Mekanizmaları.....	13
1.3.1. Kromozom Düzeyinde Meydana Gelen Mutasyonlar.....	13
1.3.1.1. Anöploidizasyon .....	13
1.3.1.2. Klastojenesis.....	14
1.3.2. Gen Düzeyinde Meydana Gelen Mutasyonlar.....	15
1.3.2.1. Transisyon .....	15
1.3.2.2. Transversiyon .....	15
1.3.2.3. Çerçeve Kayması Mutasyonu.....	16
1.4. DNA Onarımı.....	16
1.4.1. Direkt Onarım.....	16
1.4.1.1. DNA Polimeraz Proofreading ile Onarım.....	16
1.4.1.2. Fotoreaktivasyon ile Onarım.....	17
1.4.1.3. Alkilasyon Hasarının Onarımı.....	17
1.4.2. Kesme-Çıkarma Onarım Yolu .....	18
1.4.2.1. Baz Çıkarma Onarımı (BER).....	18
1.4.2.2. Nukleotit Çıkarma Onarımı (NER).....	18
1.4.2.3. Yanlış Eşleşme Onarımı (Mismatch Onarım = MER).....	19
1.4.3. Replikasyon Sonrası Onarımı.....	20
1.4.3.1. Rekombinasyonel Onarım.....	20
1.4.3.2. SOS Onarım Mekanizması.....	20
1.4.3.3. Çift Zincir Kırıklarının Onarımı.....	21
1.5. Genetik Toksikoloji Testleri.....	22
1.5.1. Bakteriyal Yöntemler .....	22
1.5.1.1. Ames (Salmonella/Mikrozom) Testi.....	22
1.5.1.2. SOS (umu) testi.....	23
1.5.2. Sitogenetik Yöntemler.....	24

1.5.2.1.Yapısal Kromozom Bozulma Analizi (Kromozom Aberasyonu Testi=CA).....	24
1.5.2.2. Mikronukleus Testi (MN).....	24
1.5.2.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD=SCE) Yöntemi .....	25
1.5.3. DNA Hasarı ya da Gen Mutasyonlarını Saptayan Yöntemler.....	25
1.5.3.1. Comet (Single Cell Gel Elektrophoresis ) Testi.....	25
1.5.3.2. Mouse Lymphoma Testi.....	26
1.5.3.3. Muta Mouse / Big Blue Yöntemi.....	26
1.5.3.4. HPRT Gen Mutasyon Testi .....	26
1.6. Genotoksisite çalışmalarında HPRT geni ve önemi.....	27
1.6.1. HPRT Geni ve Fonksiyonları.....	27
1.6.2. HPRT geni ve HPRT gen mutasyon testi.....	31
1.7. Esansiyel Yağ ve Monoterpenler.....	32
1.7.1. Çalışmada Kullanılan Esansiyel Yağlar.....	33
1.7.1.1. Kekik ( <i>Origanum onites L.</i> ) esansiyel yağı.....	34
1.7.1.2. Defne ( <i>Laurus nobilis L.</i> ) esansiyel Yağı .....	34
1.7.1.3. Adaçayı ( <i>Salvia fraticosa</i> ) esansiyel yağı.....	34
1.7.2. Çalışmada Kullanılan Monoterpenler.....	34
1.7.2.1. Karvakrol .....	35
1.7.2.2. Timol.....	35
1.7.2.3. (Cineol 1-8).....	37
<b>2. MATARYAL VE METOD.....</b>	<b>37</b>
2.1. Materyal.....	37
2.1.1. Kimyasal Maddeler.....	37
2.1.2. Test Maddelerin Dozları ve Hazırlanışı.....	37
2.2. Metod.....	37
2.2.1. Lenfosit Kültürü.....	37
2.2.2. Test Maddelerinin Uygulanması.....	37
2.2.2.1. Deney 1 (24 saatlik uygulama).....	37
2.2.2.2. Deney 2 (16 saatlik uygulama).....	38



2.2.3. Lenfositlerin İzolasyonu.....	38
2.2.4. Preparatların Hazırlanması.....	38
2.2.5. Preparatların Boyanması ve Hücre Sayımı.....	39
2.2.6. Varyans Hesaplaması.....	39
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>40</b>
3.1. Deney I bulgular.....	40
3.2. Deney II bulgular.....	43
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>47</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>50</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa no</u></b>
1.1 Pürin Metabolizması.....	28
1.2 Pürin Kurtarma Yolu.....	29
2.1 İnsan Lenfositlerinde Tek ve İki Çekirdekli Hücre.....	45
2.2 İnsan Lenfositlerinde İki Çekirdekli Hücre.....	45
2.3 İnsan Lenfositlerinde Üç Çekirdekli Hücre.....	46
2.4 İnsan Lenfositlerinde Dört Çekirdekli Hücre.....	46

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa no</u></b>
1- HPRT Deney 1- Kekik test maddesi uygulama sonuçları.....	40
2- HPRT Deney 1- Adaçayı test maddesi uygulama sonuçları.....	41
3- HPRT Deney 1- Defne test maddesi uygulama sonuçları.....	41
4- HPRT Deney 1- Karvakrol test maddesi uygulama sonuçları.....	41
5- HPRT Deney 1- Timol test maddesi uygulama sonuçları.....	42
6- HPRT Deney 1- Cineol test maddesi uygulama sonuçları.....	42
7- HPRT Deney 1- Kontrol grupları uygulaması sonuçları.....	42
8 -HPRT Deney 2- karvakrol test maddesi uygulama sonuçları.....	43
9 -HPRT Deney 2- cineol test maddesi uygulama sonuçları.....	43
10- HPRT Deney 2- defne test maddesi uygulama sonuçları.....	44
11- HPRT Deney 2- kontrol gruğları uygulama sonuçları.....	44

**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

6 TG	:	6-tioguanin
HPRT	:	Hipoksantin Guaninin Fosforibozil Transferaz
PRPP	:	5-fosforibozil pirofosfat
Cyt-B	:	Sitokalsin B
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
MMS	:	Metil methane Sülfanat
EMS	:	Etil Methane Sülfanat

## 1-GİRİŞ

Genetik Toksikoloji çalışmaları, insanlar başta olmak üzere, tüm canlıların doğal genetik bütünlüğüne zarar veren tüm etkenleri saptamak suretiyle, bu konuda bilgilenmeyi ve risk analizi yaparak gerekli korunma önlemlerinin alınmasını sağlar (Jagetia ve ark., 2001).

Genetik Toksikoloji araştırmaları sayesinde, mutajen ve olası kanserojen etkenler ortaya çıkarılmaktadır. Çünkü, çağımızın en ölümcül hastalıklarından biri olan kanserin oluşumu, somatik mutasyon birikimi ile açıklanmaktadır. İnsan kanserojenlerinin hemen hepsinin mutajen yani genotoksik etkili olduğu düşünülürse, bu çalışmaların önemi daha net anlaşılabilir. Genetik Toksikoloji çalışmaları ayrıca, sebebi bilinmeyen birçok hastalığın genetik bağlantılarının ortaya çıkarılmasına ve bu bilgilerin hastalığın tedavisi için kullanımına olanak sağlar.

1980'li yılların başında yeni ve ilginç bir araştırma alanı olarak gelişmeye başlayan çevresel mutagenesis çalışmaları ile, insandaki çeşitli patolojik olgulardan, somatik hücre mutasyonlarının sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Pai, 1985). 80'li yıllardan günümüze kadar gelen süreç içinde ise, tüm dünyanın geçerliliğini kabul ederek, rutin olarak uyguladığı ve hatta sonuçlarını paylaşarak ortak değerlendirmeler yaptığı genotoksisite test yöntemleri geliştirilmiştir. Modern çevre bireyleri, gelişen teknoloji gereği çok geniş spektrumlu kimyasal madde çeşitlerine maruz bırakılmaktadır. Öyle ki her yıl yüzlerce yeni kimyasal ürün piyasada yerini almaktadır ve bunların insan kullanımına sunulmadan önce genotoksik potansiyel açısından test edilmesi gerekmektedir (Lelie ve ark., 1997). Genotoksinler, genlerde değişime ya da yeniden düzenlenmeye sebep olan ajanlardır. DNA hasarına yol açan bu değişimler mutasyon olarak adlandırılır. Mutasyonlar hücre ya da organizma için kalıtsal değişimlerdir. Genotoksinler; kansere sebep olurlar, genetik birikime yol açarlar. Oluşturdukları mutasyonların kalıtılması genetik hastalıkların artışı sağlar. Genotoksinlerin yarattığı sağlık hasarları nedeniyle, onları saptayabilen birçok yöntem geliştirilmiştir. İdeal bir test yöntemi; Hızlı, ucuz, hassas, etik kurallara uygun (insancıl), insan biyolojisi ile ilgili olmalı ve doğru sonuçlar vermelidir. Ancak, tek başına hiçbir test yöntemi bu kriterlerin tümünü

sağlayamamaktadır. Örneğin Ames testi hızlı ve etik olmasına rağmen insan biyolojisinden farklı bir sistemdir. Bunun yanı sıra, kemirgenler gibi deney hayvanlarıyla yapılan *in vivo* çalışmalar, insan için çok yaklaşık ve doğru değerler vermelerine karşın hızlı ve etik değildirler. Epidemiyolojik çalışmalar ise genotoksin riskini yansıtan önemli veriler sağlar Ancak bu analizler hızlı ucuz ve hassas değildir.

Genotoksik ya da mutajenik etkiyi araştıran test yöntemleri;

Çevresel ya da mesleki olarak belirli ajanlara sürekli maruz kalan bireylerin genetik yapılarının izlenmesi ve hasar tipinin belirlenmesinde (Gomez-Arroyo ve ark., 2000),

Çevresel kaynaklardan izole edilen her çeşit yapay madde ya da kirletici ajanın mutajenik etkilerinin araştırılmasında, (Monarca ve ark., 2001),

Sentez edilerek, gıda, sağlık, kozmetik, temizlik ve sanayi gibi farklı alanlarda kullanıma sunulan ya da sunulacak olan, kimyasal bileşiklerin mutajenik/karsinojenik potansiyellerinin ya da antimutajenik / antikarsinojenik özelliklerinin tespit edilmesinde (Laffon ve ark., 2001),

Çeşitli hastalıkların, özellikle de kanser olgularının genetik hasarla ilişkilendirilmesi çalışmalarında (Griffiths ve ark., 1996),

Son yıllarda giderek yaşamın bir parçası haline alan biyoteknolojik ürünlerin risk değerlendirmelerinin yapılmasında kullanılabilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Genetik toksikoloji alanında son zamanlardaki gelişmelerin bir çoğu, memeli organizmasındaki moleküler ve hücre biyolojisinin anlaşılabilirliğinin artmasından kaynaklanmaktadır. En önemlileri, somatik mutasyonları ortaya çıkarma, miktarını belirleme ve doğal mutasyonlarla özel tip kimyasal hasar arasında bağlantı kurma yeteneklerine sahiptirler. (Aidoo, A. ve ark., 1997). Bu gelişmeler memeli hücrelerinin kullanıldığı *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleridir. Bunlar arasında kromozom düzeyindeki genetik hasarları saptayabilen, kromozom aberasyon (CA), kardeş kromatit değişimleri (SCE) ve mikronükleus (MN) testi gibi sitogenetik metodlar ile DNA' daki daha küçük boyutlu hasarları belirleyen Fare Lymphoma (L5178Y) Timidin kinaz testi ve Hipoksantin Guanin

Fosforibosil Transferaz (HPRT) gibi gen mutasyon testleri bulunmaktadır (Albertini 2000).

### **1.1. Genotoksik Ajanlar**

Genomda, kromozomlarda ya da genlerde değişimlere ya da hasara yol açan etkenlere, genotoksik ajan ya da mutajen adı verilmektedir. Mutajenler temel olarak fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir: Birçok genetikçi kimyasal mutajenlerin fiziksel mutajenlerden çok daha zararlı olduğuna inanmaktadır. Çünkü radyasyon kaynağını tespit etmek, miktarını ölçmek ve korunma önlemi almak olası iken, aynı anda uzun süreli olarak, birçok kompleks kimyasal madde karışımına maruz kalan bireylerin uğradığı zararın analizi çok daha zor olmaktadır. Diğer yandan kimyasal mutajen kaynakları sınırsızdır. Çünkü farklı alanlarda, her çeşit kimyasal madde üretilerek kullanıma sunulmakta ya da çevrenin bir parçası haline almaktadır.

#### **1.1.1. Genotoksik etkili fiziksel ajanlar**

Kısa ve görünür ışıktan daha yüksek dalga boyları içeren elektromanyetik spektrumun bir kısmı iyonize radyasyona, diğer kısmı da iyonize olmayan radyasyona dönüşebilir.

##### **1.1.1.1. İyonize radyasyonun teşvik ettiği mutasyonlar**

İyonize ışınlar (X ışını, gama ışını, kozmik ışınlar) yüksek enerjili, kısa dalga boyludur ve canlı dokulara nüfuz ettikleri için tıbbi teşhiste de kullanılırlar. Bu ışınlar nüfuz ettikleri hücrelerde pozitif yüklü moleküllerden elektron salınımına yol açarlar. Bu olay DNA molekülünü oluşturan atomların reaktifliğini artırdığı için mutajenik etkinin temelidir. İyonize radyasyon pirimidin bazları arasında dimer oluşumuna neden olabilir. Dimerleşme tek iplik üzerinde olabildiği gibi, karşılıklı ipliklerde bulunan pürin ya da pirimidinler arasında da meydana gelebilir. İyonize radyasyon bir başka şekilde, bazların halka yapılarının bozulmasına da sebep olabilir. Yapısı bozulan bir baz, karşısına gelen diğer bir bazla bağ oluşturamadığı için iplik kırılmasına yol açabilir. Bu kırılma kromozom düzeyinde de oluşabilir. İyonize radyasyonun mutajenik etkisi, radyasyonun

dozuna, hücrenin hayat döngüsünde bulunduğu evreye, oksijen basıncı ve ısıya bağlı olarak değişebilmektedir (Lazuka ve ark., 1999, Vijayalaxami ve Tice, 1992).

#### **1.1.1.2. İyonize olmayan radyasyonun teşvik ettiği mutasyonlar**

İyonize olmayan radyasyonun en önemli tipi UV ışınlarıdır. UV ışınları düşük enerjili olup, yüksek bitki ve hayvanlarda sadece yüzeysel hücre tabakasına nüfuz eder. UV ışınları çarptığı atomlara enerji verir ve elektronları yüksek enerji seviyelerine çıkarır. Bu durum UV ışınıyla indüklenen mutasyonun temelini oluşturur. Pürin ve pirimidin bazıları UV ışığını absorbe ederek reaktif duruma geçebilirler. UV ışığı tek hücreli organizmalar için potansiyel bir mutajendir. UV'nin DNA tarafından max. absorblanan dalga boyu 254 nm.'dir, max. mutajenlik de bu dalda boyunda başlar. *In vitro* çalışmalar özellikle pirimidinlerin UV'yi 254 nm'de kuvvetle absorbe ederek reaktif hale geldiklerini göstermiştir. Bu durumda ya pirimidin hidratlar ya da pirimidin dimerleri oluşur. Dimerler DNA çift sarmalını ve dolayısıyla DNA replikasyonunu bozar (Otoshi ve ark. 2000).

#### **1.1.2. Genotoksik etkili kimyasal ajanlar**

##### **1.1.2.1. Alkileyici ajanlar**

İçinde karsinojenliği kanıtlanmış ya da şüpheli olan çok sayıda kimyasal çeşidi bulunan alkileyici ajanlar, organik makro moleküllerin nükleofilik merkezlerine affinite gösteren elektrofilik bileşiklerdir (Lawley, 1989). Dimetil-nitrosamin, N-metil-N-nitrosourea, 1,2-dimetilhidrazin, Metil metan-sülfonat, Dietil-nitrosamin, N-etil-Nitrosourea gibi monofonksiyonel alkileyici ajanlar, deneylerde mutajen olarak sıklıkla kullanılırlar (Gollapudi ve ark., 1998). Bu ajanlar monofonksiyonel ya da bifonksiyoneldir. Monofonksiyonel olanlar tek bir reaktif gruba sahiptir ve DNA'daki tek nükleofilik merkezle kovalent bağ yaparlar. Bifonksiyonel ajanlar ise 2 reaktif grup taşımakta ve DNA ile 2 ayrı bölgede reaksiyona girebilmektedir. Potansiyel alkilleme bölgeleri 4 baz içinde belirlenmiş ve herbirinin farklı reaktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin etil grubu bağlanan 7-etil guanin, timinle eşleşir. (yanlış baz eşleşmesi olur)



Genelde bazların halkasal nitrojenleri, oksijenlerinden daha nükleofiliktir. Fosfodiester bağlarındaki oksijenin alkilasyonu fosfotriesterlerin oluşumu ile sonuçlanır (Roberts, 1978). Diğer yandan alkilasyonla değişime uğrayan bazlarda N-glikosilik bağları zayıflatmakta ve çok sayıda alkilleyici ajan bazlarda depurinyasyon-depirimidinyasyona yol açarak, abazik bölgelerin oluşumuna neden olmaktadır (Loeb ve Preston 1986). Alkilleyici ajanlar, nokta mutasyonların 3 tipini de indükler. DNA ipliğinde çapraz bağlanma yaparak kromozom kırıklarına yol açabilirler.

#### **1.1.2.2. Hidroksile edici ajanlar**

Bazları hidroksilleme etkileri vardır. Yanlış baz eşleşmelerine yol açarlar. Örneğin hidroksilamin ile reaksiyona giren sitozin, hidroksilaminositozin formunda, adeninle eşleşir (Gupta ve ark., 1995).

#### **1.1.2.3. Çapraz bağlayıcı (Cross-Linking) Ajanlar**

Daha önce sözü edildiği gibi bifonksiyonel alkilleyici ajanlar DNA'da 2 farklı nükleofilik merkez ile reaksiyona girebilirler. Eğer bu 2 bağlanma bölgesi zıt polinükleotit iplikleri üzerinde ise DNA iplikleri arasında çapraz bağlanma meydana gelmekte, aynı polinükleotit zinciri üzerinde yer alıyorsa iplikçi çapraz-bağlanma oluşmaktadır.

DNA iplikleri arasındaki çapraz bağlanma, DNA'daki kimyasalların yol açtığı hasarların önemli bir sınıfıdır. Bu tip hasar DNA iplik ayrımını engellediği için replikasyon ve transkripsiyonu bloke eder. Bu özelliği nedeniyle nitroz asit, mitomisin C, nitrojen mustard, sülfür mustard, cis platinum gibi çeşitli platinyum türevleri ve ışıkla aktive olan psoralen gibi ajanlar kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Fram 1992). Örneğin,  $5 \times 10^{-7}$  M konsantrasyonunda nitrojen mustard ile muamele edilen bakteriyel DNA'da, bazların yaklaşık %0,005'inin alkilendiği gösterilmiştir. Bunun dışında, 254 nm dalga boylu UV radyasyonu ve iyonize radyasyon da DNA'daki moleküller arasında karşılıklı bağlanma gibi daha küçük DNA hasarlarına sebep olabilirler. Düşük hücre içi klor konsantrasyonu, sonucu meydana gelen klor kaybı, bileşikleri yüklü elektrofilik ajanlara dönüştürür. Nükleofilik bölge ile reaksiyon sonucu ise DNA'da iplik içi

ya da iplikler arası bağlantılar meydana gelir Bu ajanlar, aynı zamanda DNA-protein çapraz bağlanmasına da sebep olabilmektedir.

#### **1.1.2.4. Psoralenler**

Psoralenler, temel kimyasal yapılarında, UV varlığında DNA'nın pirimidin bazları ile bir ya da iki uçtan bağlanarak reaksiyona giren 3 aromatik halka bulunduran kimyasal yapılardır. Psoralenlerin DNA ile etkileşimi ve bağlantısı 2 şekilde olmaktadır. İlk şekli, uzun dalga boylu UV radyasyonunun etkisi ile DNA ile tek noktadan (timin ile) çift bağ kurulması sonucu meydana gelir(Gasparro ve Fresco, 1986). İkinci şekli ise kimyasal yapının her 2 reaktif grubunun da bağımsız bir şekilde UV'yi absorbe ederek, iki DNA ipliği üzerinde biri alt, diğeri üst konumda bulunan iki baz arasında karşılıklı çapraz bağlantı kurması şeklinde gerçekleşmektedir. Sözü edilen ilk bağlantı tipi, çapraz bağlanmayı oluşturan bağlantı şeklinden 3 kat daha fazla meydana gelmektedir.

Fotoreaktivasyon ile DNA iplikleri arasında çapraz bağlanmayı sağlayan psoralenler, muamele edildikleri bakteri, bakteriyofaj ve ökaryotik hücrelerin biyolojik inaktivasyonuna sebep olmaktadır (Averbeck, 1989). Bu nedenle, psoralenin teşvik ettiği çapraz bağlanma reaksiyonları, çeşitli biyolojik sistemlerde meydana gelen iplikler arası çapraz bağlanmanın onarımı çalışmaları için ideal bir model olmuştur (Sage,1993). UV ışığı ile aktive olan psoralenler, aynı zamanda bölünen hücrelerde DNA replikasyonunu engellediği için sedef hastalığı gibi, epitel hücrelerinin düzensiz çoğalması ile karakterize olan bir hastalığın tedavisinde de kullanılmaktadır.

#### **1.1.2.5. Baz analogları**

Genel olarak DNA yapısında herhangi bir kimyasal ajanın etkisi olmaksızın, biyolojik olarak meydana gelebilen baz hasarları oluşmaktadır. Bu hasarlar DNA replikasyonunun değil, replikasyon sırasında diziye katılan deoksiribonükleotitlerin hatalı olmasından kaynaklanmaktadır (Topal, 1988). DNA replikasyonu sırasında, bazlara yapı olarak uygun substratlar onların yerine replikasyona katılırlar. Baz analogları olarak adlandırılan bu bileşikler deneysel olarak DNA hasarının ve bu hasarın yarattığı hücresel cevabın belirlenmesi

çalışmalarında kullanılır. En yaygın olarak çalışılan baz analogları arasında halojenlenmiş 5-bromourasil, 5-fluorourasil ve 5-iyodourasil gibi urasil türevleri yer almaktadır (Friedberg ve ark., 1995). Bunların tümü timin analogu olup, DNA replikasyonuna katıldıkları zaman mutasyona sebep olmaktadır. Örneğin timinin yerini alan 5-bromo-urasil, Guanin ile eşleşir. Aynı şekilde adenin analogu 2-aminopurin de mutajenik özelliğe sahiptir (Sowers ve ark., 1987).

#### **1.1.2.6. Klastojenik ajanlar**

Genetik materyale kromatit ve kromozom kırıkları ve dolayısıyla meydana gelen yapısal kromozom anomalileri şeklinde zarar veren ajanlardır (Emerit, 1985). İyonize radyasyon, nitro furan, benzen, benzo(a) pren, siklofosfamid,vinil klorit) gibi ajanlar klastojenik etkilidir. Klastojenik etki bazen, memelilerdeki hücrel metabolizma sonucu da meydana gelmektedir. Yapılan bir araştırmada atom bombası sonrası hayatta kalanların hücrelerinde bu etkinin 31 yıl boyunca sürdüğü ortaya konulmuştur (Porter ve Coon, 1991). Diğer yandan *in vitro* koşullarda herhangi bir fiziksel ya da kimyasal etken ile muamele edilen kan hücrelerinde klastojenik etki meydana gelebilmektedir (Sivikova ve Dianovsky, 1999). Bir başka şekilde tümör promotorları da tıpkı radikal üreten kimyasallar gibi klastojenik etkiyi uyurabilmektedir (Emerit ve ark., 1985). Genel olarak süperoksit dismutas gibi radikal-koruyucu enzimlerin varlığı klastojenik aktivitenin oluşumunu önlemektedir (Emerit, 1994)

#### **1.1.2.7. Metabolik aktivasyon reaksiyonları sonucu aktif olan kimyasallar ajanlar**

DNA'daki kimyasal hasara ilişkin çalışmalarda, kimyasal olarak reaktif olmayan, nonpolar gruplar taşıyan çeşitli tipte kimyasal bileşiğin canlı vücudundaki metabolik aktivasyon tepkimeleri ile daha reaktif formlara dönüşerek, tıpkı alkilleyici ajanlar gibi, DNA'daki nüfleofilik merkezle etkileşime girdiği tesbit edilmiştir. Bu özellikte olan çok sayıda bileşik potansiyel mutajen ve karsinojendir. Bu grupta bulunan karsinojenlerin metabolizması hassas türler üzerinde çalışılarak aydınlatılmıştır. Bazı karsinojenik aromatik aminlerin tümöre neden olduğu yıllardır bilinmektedir. Örneğin N,N-dimetil-4-aminoazobenzen

sıçanlarda (rat) etkili bir karaciğer karsinojenidir, kendisi sıçan karaciğer proteinlerine bağlanamazken, metaboliti bağlanabilmektedir. Bu bileşiklerin ve pek çok diğer karsinojenin genotoksik aktivitesi metabolik enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir (Anders ve Dekant, 1994).

N-2-Asetil-2-Aminofluorene (AAF), insanda kanser olgusunun artmasıyla bağlantılı olan aromatik amin grubu bileşiklerin bir sınıfıdır. Başlangıçta bir insektisit olarak kullanılmış olan bu bileşiğin metabolik aktivasyonundaki ilk basamak, (sitokrom P-450 katalizörlüğünde) bir N-hidroksi türevinin oluşumudur. Bu ürün proksimate karsinojen olarak adlandırılır ve nükleik asitlerle reaksiyona girmez. Fakat ardından sitosolik enzimlerin aktivasyonu sonucu oluşan sülfat ya da asetat ester gibi reaktif alkilleyici bir ajandır (Miller ve Surh, 1994).

Çeşitli endüstriyel ürünlerde ve kömür katranında bulunan benzo [a] pyrene günümüzde çok etkili karsinojenik bileşiklerden biri olarak bilinmektedir ve çevresel olarak sigara dumanı ve otomobil eksoz gazı gibi benzo [a] pyrene kaynağı olan bileşiklerde çok yaygın olarak bulunmaktadır. Benzo [a] pyrene metabolize edilmemiş doğal yapısıyla reaktif olmayan nonpolar bir bileşik olup, bu yapısı nedeniyle DNA çift ipliğindeki bazlar arasına hidrojen bağları kurarak girmektedir. Bu durum DNA hasarına giden yolda bir başlangıç oluşturur. Vücutta P450 enzim sisteminin bileşiklerinden arilhidrokarbon hidroksilaz enzimi benzo [a] pyrene ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbonları, onların ester konjugatları olan fenollere ve dihidrodiolelere metabolize etmektedir (Hall ve Grover 1990). Diğer yandan benzo [a] pyrenin bazı metabolizma ürünleri olarak elektrofilik epoksitler oluşmaktadır ki bunlar çok iyi bilinen karsinojenik formlardır ve anti diol-epoksitler olarak adlandırılırlar (Friedberg ve ark.,1995).

Bilinen en etkili karaciğer karsinojenleri arasında olan Aflotoksinler doğal bir metabolizma ürünü olup, DNA hasarına yol açabilen ilginç bir örnektir (Groopman ve Cain, 1990). Fungus kaynaklı aflotoksinler arasında en kuvvetli hepatokarsinojen olanı Aflotoksin B1'dir. Aflotoksin B1, karaciğer mikrozomal enzim ekstraktında bulunan P-450'nin, karışık fonksiyonlu oksijenaz enzimleriyle okside olarak, aflotoksin B1-8,9-epoxide denilen bir ana ürüne dönüşmektedir.

## 1.2. Toksik Bileşiklerin Metabolizması

Bu enzim sistemlerinin gerçek biyolojik fonksiyonları, potansiyel toksik nonpolar kimyasalları suda çözünerek atılabilir şekle dönüştürerek, hücreleri sitotoksik etkilere karşı koruma amacına yöneliktir. Kimyasal bileşiklerin çoğu bu enzim reaksiyonları ile zararsız ve vücuttan atılabilir metabolitlere dönüştürülürken, bazıları ise elektrofilik formda aktif bir yapı kazanarak DNA gibi organik makro moleküllerdeki nükleofilik merkezle etkileşime girebilir hale gelmektedir. Bu tip kimyasal ajanlar direkt olarak sitotoksik değil iken, potansiyel genotoksik şekle dönüştürülmektedirler. Bu reaksiyonlarda yer alan enzim aktivitelerine en iyi örnek, çeşitli monooksijenaz aktivitesi içeren, bir seri membrana bağlı proteinin indükleyici cevabıdır. Bir ya da daha fazla zara bağlı flavaprotein redüktaz enzimi kombinasyonunun oluşturduğu bu komplekse, 450 nm'de güçlü absorbanza sahip olmaları nedeniyle sitokrom P-450 sistemi denilmektedir

Bu çok bileşenli enzim sistemi, aktivitesi için NADPH ve atmosferik oksijen gerektirir. Başlangıç reaksiyonu genellikle, hidrofobik nonpolar substratların, daha polar oksijenlenmiş ara ürünlere dönüştürülmesidir. Oluşan ürünler ikincil reaksiyonların substratları olup, enzimlerle hücreden ya da vücuttan hızlıca atılacak konjugatlara katalize edilirler. Genotoksik kimyasalların aktivasyonunda; mikrosomal ve sitoplazmik glutatyon-s-transferaz, sulfotransferaz, asetiltransferaz, VDP-glukonasiltransferaz gibi diğer enzimler de rol oynamaktadır.

Hayvanlardaki biyotransformasyon, sudaki çözünürlüğü artırarak atılmayı hızlandırma işlemine dayanır. Burada dikkate alınması gereken önemli bir nokta, bir molekülün, canlı organizmaya yabancı bile olsa, kimyasal yapısı uygun durumdaysa, normal metabolik olaylarda görev alan bir enzim tarafından substrat olarak kullanılabilir. Yabancı bileşiklerin metabolize edilmesi o bileşiğin toksisitesinde azalmaya sebep olduğundan bu olay detoksifikasyon olarak nitelendirilir. Bununla beraber, bazı durumlarda bunun tam tersi olur ve oluşan ürün ana üründen daha toksik bir hal alabilir. Örneğin siklofosamid, benzo(a)pren ve N-nitrosodimetilamin gibi mutajen/ karsinojenlerin metabolik enzimler ile

reaksiyonu ile türevlenen metabolitlerin insan sperm kromozomları üzerinde aberasyonlara neden olduğu saptanmıştır.

Biyotransformasyon çoğunlukla memelilerde, karaciğerde bolca bulunan enzimler tarafından belli başlı iki evrede katalizlenir. Birinci evrede toksik madde değişime uğrar. Bu değişimle bileşiğe bir fonksiyonel grup ilave edilir. İkinci evrede fonksiyonel gruba başka bir madde bağlanarak birleşme (konjugasyon) gerçekleşir (Gatehouse ve ark., 1990).

### **1.2.1. Birinci evre reaksiyonları**

#### **1.2.1.1. Oksidasyon reaksiyonları**

Bu reaksiyonların çoğu bir enzim sistemi tarafından katalize edilirler. Sitokrom P450 monooksijenaz sistemi (30 civarında enzim) olarak adlandırılan bu enzimler hücrenin granülsüz endoplazmik retikulumunda yerleşmişlerdir. Birçok dokuda bulunabilmekle birlikte, bu enzimler en çok karaciğerde yer alırlar. P450 enzimlerinin özellikle kanserojen maddelerin detoksifikasyonunda önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir. Hemoprotein yapısında olan enzim, sistein amino asidine bağlı “hem demiri” (porfirin halkasına bağlı demir iyonu) içerir. Yabancı bileşiklerin oksidasyonu genelde bu demir grubu üzerinden gerçekleşir. Katalizlenen reaksiyonlar, NADPH, moleküler oksijen ve magnezyuma gereksinim duyar.

Alkol dehidrojenazsantin oksidaz, monoamin ve diaminoksidazlar ile peroksidazlar gibi diğer enzimlerin de belirli oksidasyon reaksiyonlarını katalizledikleri bilinmektedir. Sitokrom P450(CYP) enzimleri prokarsinojen ve promotajenlerin de içinde bulunduğu çok sayıda kimyasal ajanın oksidasyonunu katalize ederek, onları mutajen ya da karsinojen özellikteki reaktif metabolitlere dönüştürmektedir (Kadlubar ve Hammons, 1987).

#### **1.2.1.2. Redüksiyon reaksiyonları**

Bu reaksiyonlar, hem mikrozomal hem de sitolojik redüktazlar tarafından katalizlendiği gibi, redüktaz ihtiva eden barsak bakterileri tarafından da katalizlenebilir. Bu tip reaksiyona en iyi örnek, besine renk veren tartrazin

maddesinde bulunan nitro ve azo gruplarının indirgenmesi reaksiyonudur (Güven,1999).

### **1.2.1.3. Hidroliz reaksiyonları**

Esterler esterazlar tarafından, amidler ise amidazlar tarafından hidrolizlenir. Bu enzimler genel olarak birçok dokuda hücre sitozolünde bulunur (Güven,1999).

### **1.2.2. İkinci evre reaksiyonları**

Konjugasyon reaksiyonları olarak da bilinen bu reaksiyonlar, polar bir grubun yabancı moleküllere eklenmesi ile meydana gelmektedir. Bu polar grup, ya bileşik üzerinde hazır bulunan bir gruba ya da birinci evre reaksiyonları sonucunda oluşan hidroksil gibi gruplara konjuge olabilir. Polar gruplar, yabancı molekülleri suda daha çözünür kılar ve böylece vücuttan uzaklaştırma kolaylaştırılarak toksik etkide bir azalma meydana getirilir. Konjugasyon reaksiyonları aşağıda kısaca açıklanmıştır.

#### **1.2.2.1. Sülfatlama**

Bir hidroksil grubuna sülfat eklenmesi, yabancı maddelerin konjugasyonunda izlenen önemli bir yoldur. Bu reaksiyon, sitozolik bir sülfotransferaz enzimi tarafından katalizlenmektedir. Reaksiyonun meydana gelebilmesi için fosfoadenozin fosfosülfat koenzimi de kullanılmaktadır. Aromatik ve alifatik hidroksil grupları yanında N-hidroksil grupları ile amino grupları da sülfatla konjuge olabilirler (Pluth ve Ark. 2000)

#### **1.2.2.2. Glukuronidasyon**

Glukuronik asit, polar ve suda çözünebilen bir molekül olup hidroksil, karboksilik, amino ve tiol gruplarına kolayca eklenebilir. Bu reaksiyon, mikrozomal enzimler olan glukuronosil transferazlar tarafından katalizlenir. Diğer karbonhidratlar da konjugasyonda görev alabilirler. Riboz ve ksilozun da benzer biçimlerde kullanıldıkları bilinmektedir (Güven, 1999).

### **1.2.2.3. Glutasyon konjugasyonu**

Toksikolojik açıdan, özellikle reaktif ara ürünlerin uzaklaştırılmasında önemli bir fonksiyona sahip, temel bir hücre içi sülfidril bileşeni olan glutasyon, birçok memeli dokusunda (özellikle karaciğerde) bulunan ve üç peptitten oluşan bir bileşiktir. Bu enzim sınıfının önemi, alkil, aldehit ve keton gibi elektrofilik grupların metabolize edilmesinde rol almasıdır. Bu enzim, aerobik mikroorganizmalarda, bitki ve hayvanların çoğunda bulunmaktadır. Glutasyonda sistein aminoasidinden kaynaklanan sülfhidril grupları, reaktif veya elektrofilik metabolitlere bağlanmaktadır. Bu reaksiyonlar, glutasyon transferazlar tarafından katalizlenir (Bernardini ve ark. 1996). İndirgenme durumunda olan glutasyon güçlü bir nükleofiliktir ve elektrofillerle reaksiyona girmektedir. Bu konjugasyon reaksiyonları çeşitli sitozolik ya da mikrozomal glutasyon-s-transferaz enzimleri ile katalize edilmektedir. Ksenobiyotiklerin (organizma için yabancı madde) P450 ile oksidasyonunun ardından atılabilir duruma geldikleri glutasyon konjugasyonu, genellikle bir detoksifikasyon işlemi olarak kabul edilmektedir. Yapılan pek çok çalışma glutasyon konjugasyonunun, dihaloalkan, etilen diklorid, mustard veya N-nitroso gibi karsinogenik ajanların, genotoksik aktivasyonunda etkili olduğunu desteklemektedir (Guengerich, 1994)

### **1.2.2.4. Amino asit konjugasyonu**

Yabancı organik bileşikler amino asitlerle konjugasyon yapabilirler. Bu işlevde kullanılan amino asit türden türe farklılıklar göstermekte ve benzer bir evrimsel gruba dahil türlerin aynı amino asidi kullandıkları görülmektedir. Glisin, en çok kullanılan amino asittir teşkil eder ve yabancı organik bileşiklerle konjugasyonu mitokondride bulunan açılaz enzimi tarafından katalizlenir (Güven,1999).

### **1.2.2.5. Metilasyon**

Moleküllerdeki hidroksil, amino ve tiol grupları metiltransferaz enzimlerinden biri tarafından metillenebilirler. Bu reaksiyonlar, özellikle normal olaylarda oluşmakla birlikte, yabancı bileşikler aynı zamanda substrat olarak da kullanılabilir (Güven,1999).



### **1.3. Genotoksik ajanların etki mekanizmaları**

Toksik maddelerin genetik materyal ile etkileşimi ve bunun sonucunda meydana gelen mutasyon çeşitleri, kromozom düzeyinde ve gen düzeyinde (moleküler düzeyde) olmak üzere iki farklı mekanizma ile açıklanmaktadır.

#### **1.3.1. Kromozom düzeyinde meydana gelen mutasyonlar**

##### **1.3.1.1. Anöplodizasyon**

Bazı toksik maddelerin, normal kromozom setinde bir ya da birkaç kromozomun eksilmesi ya da eklenmesiyle sonuçlanan hasara neden olmalarıdır (Torous ve ark., 1998). Anöplodi hayvanlarda çoğu kez ölümcüldür, bu nedenle memelilerin ölü doğan fetüslerinde saptanabilmektedir. Bölünme olaylarında kromozomların eşit olarak yavru hücrelere geçmesi için; sentriollerin doğru pozisyon alması, kromozomların metafazda doğru şekilde yerleşmesi ve iğ iplikçiklerinin oluşumu gereklidir. Bu süreçte, herhangi bir etkene maruz kalma ve yaşlanma kromozom sayısında bir değişiklikle sonuçlanabilir (Güven,1999). Mitoz sırasında kardeş kromatidlerin, mayozda ise homolog kromozomların, düzensiz ve eşit olmayan paylaşımı sonucunda oluşan hücre çekirdeklerinden biri normalden çok, diğeri de az sayıda kromozoma sahip olmaktadır. Yapılan bir araştırmada insan prostat kanserinin tedavisinde antineoplastik ilaç olarak kullanılan “estramustin”nin, insan lenfositlerinde anöplodi’ye sebep olduğu gösterilmiştir (Migliore ve ark., 1998)

Anöplodinin bütün formları mayoz sonrası ciddi sonuçlar doğurur. Memelilerde X kromozomunun aktivasyonundan dolayı, seks kromozomlarındaki anöplodizasyon, otozomlarda olandan çok daha sık görülmektedir (Russel, 1998). İnsanda otozomal monosomi ( $2n-1$ ) çok nadir olarak, gelişmeden ölen embriyolarda görülmektedir. Buna karşın fetal ölümlere sebep olan anöplod anomalinin yarısını, otozomal trisomi ( $2n+1$ ) oluşturmaktadır. Sadece birkaç otozomal trisomi tipinde canlı doğumlar görülür, ancak bunların çoğunda erken ölüm meydana gelmektedir. Sadece 21. kromozomun trisomisi olan Down sendromunda bireyler yetişkinlik çağına gelebilmektedir (Griffiths ve ark., 1996).

### 1.3.1.2. Klastojenesis

Bazı genotoksik etkenlerin, özellikle de alkilleme özelliğine sahip ajanların, kromozomlarda parça kaybı, ilavesi veya yer değiştirmesi şeklinde etkili olmalarıdır. Bu olay “klastojenesis”, neden olan faktörler de “klastojen” olarak bilinmektedir (Friedberg ve ark., 1995). Kromozomlardaki yapısal değişiklikler, kromatit kollarında meydana gelen kırılmalardan kaynaklanmaktadır. Kırılmanın olduğu yere, kırılma tipine, sayısına ve kırılan parçaların tekrar birleşme özelliğine göre, çok çeşitli kromozom mutasyonları meydana gelebilmektedir (Güven,1999; Pai, 1985) Kromozom mutasyonları, “kromozom aberasyonları” olarak da adlandırılır.

Bir sonraki nesil hücrelere aktarılmayan yapısal kromozom değişiklikleri; kromatid ve kromozom kollarındaki boşluklar (gap), kromatid kırılmaları (fragment), kromatid uçlarının birleşmesi (sister union), halka kromozom oluşumu (ring) ve disentrik kromozomları kapsamaktadır. Servix, meme, tiroid ve akciğer kanseri olan hastaların lenfositlerinde, spontan klastojenik etkiyi araştıran bir çalışmada, gap, kromozom ve kromatid tipi kırıklar, translokasyon ve disentrik kromozom gibi aberasyonların, kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Tüm gruplarda gözlenen gap, kromozom ve kromatid tipi kırıkların, meme kanserli hücrelerde en yüksek değere ulaştığı vurgulanmıştır (Sobti ve ark., 1991). Yeni sentezlenen bir akrinin türevinin, insan lenfositlerinde, özellikle kromatid gaplarına sebep olduğu, bir antitümör antibiyotik olan, streptonigrin’in ise disentrik, halka, kırılma ve gap tipinde kromozom ve kromatid hasarlarına yol açtığı bildirilmiştir (Bolzan ve Bianchi, 2000)

Bir sonraki nesil hücrelere aktarılan sabit değişiklikler ise delesyon, duplikasyon, inversiyon, tranlokasyon olmak üzere 4 şekilde meydana gelmektedir (Griffiths ve ark., 1996; Russell, 1998). Delesyonun, ısı, radyasyon, virüsler, kimyasallar, transpozibil elementler ya da hatalı rekombinasyon gibi ajanların neden olduğu kromozom kırığından parça kopmasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Bolzan ve Bianchi, 2000).

### 1.3.2. Gen düzeyinde meydana gelen mutasyonlar

Bir genin genomdaki sayısı ve kromozom üzerindeki yeri değişmezdir, yapısı değişebilmektedir. Bu mekanizma, “Gen mutasyonu” ya da “nokta mutasyon” olarak adlandırılır.

Moleküler düzeyde, genlerin DNA dizilerinde meydana gelen mutasyonlar, kendiliğinden oluşabildiği gibi (spontan mutasyonlar), bazı fiziksel ya da kimyasal ajanlarla uyarılarak da gerçekleşebilirler (indüklenen mutasyonlar) (Bolsover ve ark., 1997; Griffiths ve ark., 1996; Friedberg ve ark., 1995).

Genellikle bir baz çiftinin etkilendiği nokta mutasyon tipleri düşük oranda spontan olarak meydana gelebilmektedir. Ökaryotlarda spontan mutasyon oranı jenerasyondaki gen başına  $10^{-4}$  - $10^{-6}$  iken, bakteriler ve fajlarda  $10^{-5}$  - $10^{-7}$  civarındadır. Spontan mutasyonlar, DNA replikasyonundaki hatalardan, DNA'daki spontan kimyasal değişimlerden (tatomerik değişim ya da metilasyon), genlerdeki kırılmalardan ve transpozibil genetik elementlerin hareketinden kaynaklanır. Çoğunluğu hücresel onarım mekanizmalarıyla düzeltilebilir olan spontan mutasyonların birikiminin, kanser olgusunda önemli rolü olduğu da bilinmektedir (Simpson, 1997).

Gen mutasyonları temel olarak üç şekilde meydana gelmektedir:

#### **1.3.2.1. Transisyon**

DNA zincirindeki bir pürin ya da pirimidinin, başka bir pürin ya da pirimidin ile yer değiştirmesidir. Hücre siklusunun herhangi bir safhasında meydana gelebilir. Adenin ve sitozin bazları, nitroz asit gibi bir ajanla deamine edildiğinde, adenin hipoksantine, sitozin ise urasile dönüşür. A:T'nin G:C'ye değişimi ile ikinci replikasyon sırasında mutajenik bir transisyon oluşabilir (Eckert ve Opreska, 1999).

#### **1.3.2.2. Transversiyon**

Bir pürin bazının, pirimidin bazı ile ya da bir pirimidin bazının, pürin ile yer değiştirmesi durumudur. Bu tip baz çifti değişimi sadece DNA molekülünün replikasyonu sırasında meydana gelmektedir. Timin analogu olan mutajenik 5-bromo-urasil, replikasyon esnasında timinin yerini alarak, adeninle eşleşmektedir. Aflatoksin B1'in sıçan p53 geninde (Lee ve ark.,1998), çevresel mutajenlerden

polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) benzo(a)pre'nin ise memeli sistemlerde, C:G-T:A tipi transversiyonu uyardığı ( Perlow ve Broyde, 2001) gösterilmiştir.

### **1.3.2.3. Çerçeve kayması mutasyonu**

DNA zincirinde çoğunlukla sık tekrar eden baz dizilerinin bulunduğu “polindromik bölgeler” de, bir veya birkaç baz çiftinin eklenmesi ya da çıkması ile meydana gelen mutasyon şeklidir. Baz çiftinin DNA dizisine eklenmesine “insersiyon”, DNA zincirinden kopup ayrılmasına “delesyon” adı verilir. Bu tip bir mutasyon, DNA’da baz çifti değişikliğinin olduğu yerden itibaren kodonların ve aynı zamanda kodlanan aminoasit diziliminin değişmesine neden olmaktadır. İnsan mtDNA’sının ilk stop kodonunda oluşan bu tip mutasyonların, sitokrom c oksidaz sentezini engellemesi bu durumu gösteren güzel bir örnektir (Hana ve ark., 1998).

## **1.4. DNA Onarımı**

Spontan ya da indüklenen mutasyonlar DNA’da hasara sebep olmaktadır (Perlow ve Broyde, 2001). Buna karşın, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde çeşitli onarım sistemleri gelişerek bu DNA hasarlarını giderme yolunda işlev görmektedir. Eğer onarım sistemi oluşan lezyonu tamamen gideremiyorsa, mutant hücre ya da organizmalar ortaya çıkmakta, onarılamayan lezyon büyükse hücre ölümü gerçekleşmektedir (Russel,1998). Bir hücrede bilinen DNA onarım mekanizmaları aşağıda açıklanmaktadır.

### **1.4.1. Direkt onarım**

#### **1.4.1.1. DNA polimeraz proofreading ile onarım**

Bakterilerde baz çiftlerinin spontan değişme sıklığı her replikasyon için  $10^{-7}$  - $10^{-11}$  civarındadır. Diğer yandan DNA polimerazın yeni sentezlenen ipliğe nükleotidleri eklerken yaptığı hata sıklığı ise  $10^{-5}$  ‘dir. Bu iki değer arasındaki fark polimerazın proofreading aktivitesidir. Çoğu bakteriyal DNA polimerazın 5’-3’ yönünde polimerizasyon, 3’-5’ yönünde ise eksonükleaz aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu sayede doğru olmayan nükleotidler 3’-5’ yönünde çıkarılmakta ve sentez 5’-3’ yönünde tekrarlanmaktadır. DNA polimerazın proofreading

aktivitesi, çevresel mutajenlerden polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) tarafından engellenebilmektedir (Perlow ve Broyde, 2001).

Ancak bazı bakterilerin taşıdığı mutator genler (E.coli mut D geni gibi) ve mutajenler, DNA polimeraz aktivitesine zarar vererek, yanlış nükleotitlerin eklenmesine ve hatanın tolere edilememesine sebep olmaktadır. Bu onarım yolu, kimyasal mutajenlerden, alkilici ajan N-etil-N-nitrosourea ile uyarıldığında yanlış baz çiftlerinin oluştuğu rapor edilmiştir (Eckert ve Opreska, 1999). 3'-5' ekzonükleaz aktivite bakteriyal DNA polimeraza ait bir özelliktir. Ökaryot polimerazı böyle bir aktiviteye sahip değildir (Russel, 1998).

#### **1.4.1.2. Fotoreaktivasyon ile onarım**

UV ışığı uyarısıyla oluşan timin ya da diğer pirimidin dimerleri 320-370 nm dalga boylu görünür ışığın varlığında direkt olarak geri dönüştürülür. Fotoreaktivasyon ya da ışık onarımı denilen bu mekanizma, fotoliz enzimi tarafından katalize edilir. Bu enzim dimerleri karanlıkta tanır ve onlara bağlanır ancak, ışıkla aktif hale gelerek dimerlerdeki kovalent bağ oluşumunu koparır. Fotoliz tüm prokaryotlarda ve ilkel ökaryotlarda var iken insanda bulunmamaktadır (Thoma, 1999). İnsan hücrelerinde, dimer oluşumları bu sisteme benzer bir kesip çıkarma onarımı ile düzeltilebilmektedir. Onarım enzimlerinden bir ya da bir kaçının eksikliği insanda Xeroderma Pigmentosum hastalığının nedenidir. Güneşin (UV ışınları) etkisiyle bu kişilerde deri kanseri oluşabilmektedir.

#### **1.4.1.3. Alkilasyon hasarının onarımı**

Alkilleyici ajan olarak bilinen mutajenler, memeli hücre DNA'sındaki bazların ya da fosfatların reaktif bölgelerinde bulunan, N- ya da O- atomlarına metil ya da etil gruplarını aktarırlar (Calleja ve ark., 1999). Alkillenen bazlar yanlış baz eşleşmeleri yaparlar. DNA'daki bu hasar, metil transferaz enzimi ile özgün bir şekilde onarılır. Bu enzim hatalı bazları değil, sadece onlara bağlı metil gruplarını kopararak uzaklaştırır (Russel, 1998).

#### **1.4.2. Kesme-çıkarma onarım yolu**

Bu mekanizma 1964 yılında bir grup bilim adamı tarafından keşfedilen ve tüm canlılarda gerçekleşen bir onarım mekanizmasıdır(Theis ve ark. 2000). Alkilleyici ajanların genotoksik etkilerinin tolere edilebildiği bu sistem dimerleri ışık gerektirmeyen bir reaksiyonla onardığı için “karanlık onarım” olarak da adlandırılır. Bu onarım tipinde hasar, enzimatik olarak tanınır, bir nukleaz ile kesip çıkarılır ve oluşan boşluk bölgesi DNA polimeaz ile tamamlanarak, DNA ligaz tarafından bağlanır. Kesme –Çıkarma onarımı 2 şekilde meydana gelebilir.

#### **1.4.2.1. Baz çıkarma onarımı (BER)**

DNA üzerindeki bazlarda deaminasyon gibi bir etki oluştuğunda, sitozin-urasile, adenin ise hipoksantine dönüşür. DNA glikosilaz enzimi bu anormal bazı tanır ve N-glikozidik bağı hidrolize ederek diziden koparır. Böylelikle DNA baz dizisi üzerinde, küçük bir boşluk şeklinde meydana gelen Apürinik ya da Apirimidinik bölgeler (AP), AP endonükleaz tarafından tanınır. Prokaryot ve ökaryotlarda homolog olduğu kaydedilen bu AP endonükleaz enzim grubu, DNA ipliğini AP bölgesi yakınından keserek bir çentik (nick) açar. Bu sebeple bu onarıma “AP Bölgesi Onarımı” da denir (Mol ve ark., 2000). Bu noktada DNA polimeraz I devreye girerek eksonükleaz aktivitesiyle birkaç nükleotidi koparır. Ardından 5’-3’ polimerizasyon aktivitesiyle, yeni iplik sentezi gerçekleşir ve eksik olan bazın yeri, doğru nükleotitle tamamlanır. DNA polimeraz I’in bu aktivitesi “nick translasyon” olarak adlandırılır. DNA ligaz ise fosfodiester bağı yapımını katalizler. Alkilleyici ajanlardan metil metanosülfonat (MMS)’nin sebep olduğu DNA hasarının bu onarım yolunu uyardığı rapor edilmiştir (Grzesiuk ve ark., 2001).

#### **1.4.2.2. Nükleotit çıkarma onarımı (NER)**

DNA helikal yapısında geniş bozulmalara neden olan DNA lezyonları onarılır. NER’de hasarlı bazlar oligonükleotit fragmanları olarak kesip çıkarılır.

Prokaryotlarda; hasar, uvrA, uvrB, uvrC genleri tarafından kodlanan uvrABC endonükleaz enzimleri tarafından tanınmaktadır. Bu enzimlerden uvrA-uvrB kompleksi DNA’yı tarar ve hasar bulduğunda bağlanır. Bağlanma sonrasında uvrA ayrılır, uvrB-uvrC kompleksi oluşur. uvrC hasarın 3’ ucuna 4-5 nükleotit, 5’

ucuna ise 8 nukleotit uzaktan çentikler açar. Böylece DNA tek ipliğindeki hasarlı bölgede 12 nukleotitlik kesilmiş olur. Sonra DNA helikaz kesilen kısmı uzaklaştırır ve oluşan boşluk DNA polimeraz 5'-3' aktivitesiyle doldurulur. Bu sayede, sadece pirimidin dimerlerini değil, DNA heliksinin distorsiyonunu (bükülme, katlanma) uyaran ciddi hasarları da onarabilmektedir. Bu aktivitede çok nadir olarak, yanlış baz eklenmesi sonucu hatalar oluşabilmektedir. DNA'da iplik içi ve iplikler arası bağlantı yapan kimyasal ajanların bu onarım yolunu aktive ettiği bildirilmiştir

İnsanda NER mekanizması çok daha komplektir. Birçok gen ( XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG, CSB gibi) tarafından kodlanan proteinlerce gerçekleştirilir. Transkribe olmayan DNA'daki hasar XPC/hHR23B kompleksi ile tanınır. Bu kompleksin DNA'ya bağlanması sonucu onarımda görevli diğer proteinlerin bu bölgeye gelmesi sağlanır. XPA, XPB ve XPD'nin helikaz aktiviteleri ile DNA zincirinde 20-30 nukleotitlik bir bölge açılır. XPG, 3' uç bölgesinde, hasardan 2-8 nukleotit uzaktan, XPF ise 5' uç bölgesinde hasardan 15-24 nukleotit uzaktan DNA zincirini keser. Sonuçta, ~24-32 nukleotitlik oligonukleotit serbest bırakılır. DNA zincirindeki boşluk, DNA Replikasyon Faktörü C (RFC), Prolifere Edici Nuklear Antijen (PCNA) ve DNA polimerazlar ile doldurulur. Daha sonra DNA ligaz I ile yeni sentezlenen zincirin bağlantısı yapılır (Hoogervorst, 2005).

#### **1.4.2.3. Yanlış eşleşme onarımı (Mismatch Onarım = MER)**

DNA replikasyonundan sonra dizide yer alan yanlış baz eşleşmelerinin pek çoğu, "Yanlış Eşleşme Onarımı-(Mismatch Onarım)" denilen diğer bir sistem tarafından düzeltilebilmektedir. Replikasyondan kısa süre sonra, DNA zincirinin GATC sekanslarındaki Adeninler geçici olarak metillenir. Bu sayede MER onarım sistemi tarafından tanınması sağlanır. Bu mekanizma prokaryotlarda, mut S, mut L ve mut H genlerinin ürünleri tarafından başlatılır. mut-S-mutL protein kompleksi yanlış eşleşen yere bağlanır. mut-H ise endonukleaz aktivite ile tek zinciri keser. DNA helikaz kesilen fragmanı uzaklaştırır. Oluşan boşluk, DNA polimeraz III ve ligaz ile tamamlanır.

Yanlış eşleşme onarımı, ökaryotlarda da çok benzer şekilde, ancak başka genler tarafından yürütülür. Bu genler hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 olarak belirlenmiştir. hMSH2, E.coli'nin mut S geni ile, diğer üç gen de E.coli mut L geni ile homoloji göstermektedir. Bu genlerin fonksiyon kaybı, genomdaki mutasyon birikimini arttırdığı için “mutator genler” olarak bilinirler. Mutant hMSH2 ve hPMS2 genlerinin kodladığı, hasarlı Msh2 ve Pms2 proteinlerinin, farelerin lac I geninde transisyon ve transversiyon tipi, başka bir geninde ise çerçeve kayması tipi nokta mutasyonları arttırdığı görülmüştür (Andrew ve ark.,2000).

Yanlış eşleşme onarım sistemi, insan genomunda oluşan spontan mutasyonların birikimini engelleyen ve kontrol altında tutan bir mekanizma olduğundan, eksikliği kansere zemin hazırlamaktadır. İnsan mismatch onarım genlerinden herhangi birinde oluşan mutasyonun, kolon kanserinin bir çeşitinde kalıtsal yatkınlık fenotipini ortaya çıkardığı bilinmektedir (Russell, 1998).

### **1.4.3. Replikasyon sonrası onarım**

DNA hasarı diğer onarım sistemleriyle onarılmamışsa, replikasyondan sonra aktif olan mekanizmalardır.

#### **1.4.3.1. Rekombinasyonel onarım**

Replikasyon sırasında, DNA polimerazın ilerleyişi pirimidin dimerleri ve diğer lezyonlar tarafından bloke edilir. Replikasyon hasar bölgesi dışında okazaki fragmenti şeklinde tekrar devam eder.Replikasyon sırasında oluşan bu boşluk, bu bölgenin komplementeri olan DNA dizisinin (replikasyon öncesindeki komplementer dizi), komplementer iplikten çıkarılıp, boşluk bölgesine eklenmesi ile doldurulur. Bu rekombinasyon işlevi Rec A proteinin sayesinde gerçekleştirir. Komplementer zincirde oluşan boşluk ise, onun yeni komplementer ipliğindeki dizilime uygun şekilde, DNA polimeraz ve DNA ligaz aktivitesiyle doldurulur (Bryant, 2004).

#### **1.4.3.2. SOS onarım mekanizması**



Çeşitli mutajenler DNA'nın bir ya da daha fazla bazında mutasyon oluşturduğunda, özgül baz çiftleşmesi meydana gelememektedir. Bu da replikasyonun hatalı sonlanmasına, gapların ve replikasyon çatalının oluşumuna yol açmaktadır. E.coli'de diğer onarım mekanizmalarının gideremediği geniş çaplı DNA hasarı tarafından uyarılan kompleks bir onarım sistemi vardır (Mckenzie ve ark. 2000). Bu sistem mutasyonel hasara karşı verilecek tepkiyi acilen uyardığı için, SOS cevap olarak bilinmektedir. SOS cevap, bazı yeni mutasyonların oluşumuna yol açsa da, hücrelerin yaşamasını sağlayacak işlemlere sahiptir, aksi halde ölümcül olaylar gelişebilmektedir.

SOS onarım sisteminde DNA hasarının onarımı pek çok enzimin senteziyle düzenlenmektedir. Bu sistemi kontrol eden 2 anahtar gen, Lex A ve Rec A'dır. DNA hasarının olmadığı durumlarda; Lex A geninin kodladığı Lex A proteini, 17 genlik bir transkripsiyon bölgesini baskılamaktadır. Genlerin tümü SOS kutusu denilen 20 nükleotidlik bir düzenleyici diziye sahiptir. Diğer anahtar genin sentezlediği recA proteini ise DNA hasarının oluşumu ile aktive olmakta ve DNA ipliğine bağlanarak, Lex A proteininin yıkımını, yani inaktivasyonunu sağlamaktadır. Lex A'nın inaktivasyonu, baskıladığı DNA onarım genlerinin transkripsiyona başlamasına olanak sağlamaktadır. Onarım, ifade edilen genlerin ürünleriyle gerçekleştirilmektedir ve sona erdiğinde genler, Lex A proteini ile tekrar baskılanmaktadır (Friedberg ve Hanawalt, 1988).

SOS cevabın kendisi aynı zamanda, bir mutajenik sistemdir. Normal koşullarda DNA sentezi sırasında etkin olan SOS cevapda, bazlar, hatalı bölgede orijinal olarak hangi bazın bulunacağı belirlenmeksizin diziye eklenmektedir. Bu mekanizma umu C ve umu D genlerini de içerir ve "error-prone"(hataya açık onarım) olarak bilinir. UV radyasyonu ile oluşan timin (TT) dimerleri SOS sistemde kopyalanarak, yeni DNA ipliğinde A-A baz dizilimi şeklinde düzeltilir. Ancak sitozin içeren pirimidin dimerlerinde (TC, CT, CC) ise sitozin deamine olarak urasile dönüştüğü için, yeni iplikte karşısına adenin bazı sentezlenir ve orijinal C-G bölgesi, T-A'ya dönüşmüş olur. Bu transisyon, UV mutagenезisinin yaygın bir sonucudur. Umu C ve Umu D proteinlerinin ise DNA polimeraz III'e bağlanarak, adenin bazının dimer içeren bazların karşısına eklenmesini sağladığı düşünülmektedir (Griffths ve ark., 1996).

### **1.4.3.3. Çift zincir kırıklarının onarımı**

İyonize radyasyon ve oksidatif hasar gibi etkenler sonucu veya spontan oluşan DNA çift zincir kırıkları 2 şekilde onarılır.

#### **a) Serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (Non Homolog End Joining =NHEJ)**

Hızlı ve hataya meyilli bir sistemdir. Ku 70-Ku 80 kompleksleri, DNA kırık uçlarına bağlanırlar. DNA bağımlı protein kinaz aktive olarak, görevli diğer proteinlerin hasar bölgesine gelmesini sağlar. Bu protein komplekslerinin formasyonu, DNA ligaz IV-XRCC4 kompleksinin kırık uçları bağlamasını sağlar (Weinert, 2005).

#### **b) Homolog rekombinasyon**

Bu onarım RAD ve BRCA genleri tarafından yönlendirilir. Öncelikle RAD 52 proteini 3' uçlara bağlanır. Daha sonra, RAD51-BRCA2 kompleksi bu uçların kardeş kromatitleriyle karşılıklı olarak eşleşmesini sağlar. Eşleşme bölgelerinde, kardeş kromatit dizilimine uygun olarak, DNA polimeraz ile sentez yapılır. Sentezlenen DNA parçaları orijinal lokuslarına rekombinasyon ile bağlanırlar (Goetz,2005).

## **1.5. Genetik Toksikoloji Testleri**

### **1.5.1. Bakteriyal yöntemler**

Mutajenite test sistemleri içinde, kısa zamanlı bakteriyal testler daha basit, hızlı ve ekonomik olmaları nedeniyle genel kabul görmekte, genotoksik ajanların, taranması ve yasal uygulamaların yapılmasında önemli rol oynamaktadır. kısa zamanlı bakteriyal testler içinde en önemli olanları (Gatehouse ve ark., 1990):

#### **1.5.1.1. Ames (Salmonella/Mikrozom) testi**

Farklı tipteki gen mutasyonlarını tespit edebilen, kısa zamanlı, bir geri-mutasyon test sistemidir. Salmonella/mikrozom testi, bakteriyal mutasyon testleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Gatehouse ve ark., 1990 ;

Russell, 1998; Friedberg ve ark., 1995). Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (*hisG*, *his C*, ya da *his D*), gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Bir mutant suş, tek bir baz değişimi şeklinde nokta mutasyona sahip iken, kendiliğinden ya da bir mutajen uyarısıyla yabani tipe dönüştüğünde, transisyon ya da transversiyon şeklinde mutasyon geçirmiş olmaktadır. Ames yönteminde pozitif sonuç veren bir ajan için, insan ya da diğer memelilerde mutajenik veya karsinojeniktir denilemez. Bakteriyal mutasyonun pozitif olması, ajanın potansiyel zararı konusunda bir ön uyarı anlamı taşır. Ayrıca yüksek organizmalarda yapılacak daha kapsamlı çalışmaları yönlendiren önemli bir belirteçtir. Ames testi bu sebeple dünya çapında pek çok laboratuvarında rutin olarak uygulanmaktadır.

#### 1.5.1.2. SOS (umu) testi

Bakterilerde meydana gelen mutasyonların genetik ve moleküler analizinde kullanılan bir ileri (forward) mutasyon yöntemidir. Umu test sistemi, kimyasal ajanların genotoksik etkilerini saptamak amacıyla kullanılan kolorimetrik, bakteriyel bir test sistemidir (Quillardet ve Hofnurng, 1985). SOS-cevap esas alınarak geliştirilmiştir regülatör bir sistem olan SOS sistemi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içinde ilk olarak karakterize edilmiş olan en kapsamlı, en kompleks ve en iyi anlaşılmiş sistemdir (Oda ve ark., 1985). Umu test sistemi, diğer SOS-cevap genlerinden çok daha dolaysız bir şekilde mutagenesisle ilgili olduğu düşünülen *umu* operonunun ifade edilme düzeyini saptamaya dayanır. *Umu* operonunun ifade edilme düzeyi *umuC-lacZ* füzyonu aracılığıyla oluşturulan  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin ölçülmesiyle saptanır (Oda ve ark., 1985).  $\beta$ -Galaktosidaz aktivitesinde kontrole göre en az 2 katlık bir artışın gözlenmesi, umu test sisteminde, kimyasalın mutajenite açısından pozitif olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Quillardet ve Hofnurng, 1985).

Bakteriyal testler, prokaryotik hücrelerdeki özgül mutasyonları belirleme özelliğine sahip olduğu için, geniş çaplı genetik hasarları ve DNA'sı kromozomlarda organize olmuş daha yüksek yapıları organizmalardaki genetik değişimleri belirlemede yetersiz olmaktadır. Aynı zamanda diploit ökaryotların

üreme hücrelerindeki kalıtsal genetik riskleri saptamada da güvenilir sayılmazlar. Bu nedenle genellikle memeli hücrelerinin kullanıldığı *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleri geliştirilmiştir.

### **1.5.2. Sitogenetik yöntemler**

Sitogenetik çalışmalar, çevresel olarak ya da çalışma ortamında klastojenlere ve radyasyona maruz kalan belirli populasyonlar için (Barquinero ve ark. 1993) bireysel olarak etkilenme dozunu saptamak için kullanılabilir (Fender ve Wolf, 1998). Bu testler *in vivo* olarak laboratuvar hayvanlarında *in vitro* olarak da insan kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücreleri ile çeşitli kültür hücrelerinde uygulanabilmektedir. Çoğunlukla da, farklı tipteki genetik hasarların gösterilmesinde sıklıkla tercih edilen, kısa zamanlı lenfosit kültüründe gerçekleştirilmektedir. Bunlardan en önemlileri;

#### **1.5.2.1. Yapısal kromozom bozulma analizi (Kromozom Aberasyon Testi= CA)**

Anöploidi ve poliploidi gibi sayısal kromozom bozulmaları ile kromozom tipi, kromatit tipi kopmalar ve anormal birleşme gibi yapısal bozulmalar çok yaygın olarak, bölünen hücrelerin metafazda olanlarını kolsemid ya da kolşisin gibi bir tübülün polimerizasyon inhibitörü kullanarak tutuklama ile saptanmaktadır.

#### **1.5.2.2. Mikronukleus testi (MN)**

Mitotik hücrelerdeki kromozom fragmentlerinden ya da anafazda geç kalarak her 2 kardeş çekirdeğe dahil olamayan kromozomlardan kaynaklanan genetik hasarların göstergesidir. Mikronukleusun içerdiği kromozomal fragmentler; öncelikli iğ ipliği kinetokor ya da diğer mitotik aparatların fonksiyon kaybından, kromozom alt birimlerinde oluşan hasarlardan, hücresel fizyolojideki değişimlerden ve mekanik parçalanmalardan kaynaklanmaktadır (Fenech, 2000). Mikronukleus içeren hücre sayısındaki artış, maruz kalınan klastojenik (DNA'yı hedefler, kromozom kırılmalarına sebep olur ) veya anöjenik (kromozom sayısının değişimine etkilidir, genellikle DNA'yı hedef almaz ) ajanların genotoksik etkilerini yansıtan bir biomarkerdir.

İnsan populasyon çalışmalarında MN sıklığı, çok yaygın olarak fitohemaglutinin (PHA) ile stimüle edilmiş periferal kan lenfositlerinde belirlenmektedir (Abou-Eisha ve ark., 1999). En sık kullanılan metot ise mitojenle stimüle edildikten sonra sitoplazma bölünmesi engellenen hücrelerin sayımının yapıldığı sitokinez-engelleme mikronukleus (CBMN) tekniğidir. Mikronukleus sıklığının belirlenmesinde her örnek için her 1000 hücredeki MN sayılarak hesaplama yapılmaktadır (Fenech ve ark., 2000).

### **1.5.2.3. Kardeş kromatid değişimi (KKD=SCE) Yöntemi**

Replike olan bir kromozomun iki kardeş kromatiti arasında, DNA'nın karşılıklı değişimi şeklinde oluşan mutasyonun saptanması prensibine dayanır. SCE'nin teşvik edilmesi DNA sentezinin başında maksimum iken, S fazının sonunda tamamen biter. Değişmeler homolog lokuslarda meydana gelir ve kromozom morfolojisinde bir farklılık oluşturmaz. SCE oluşumunda DNA ipliğinin kırılıp (kopup) tekrar birleştiği bilinmekle birlikte mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. DNA ile kovalent bağlanan ya da DNA metabolizmasına ve onarımına engel olan maddeler çok etkili şekilde SCE'yi teşvik etmektedirler (Albanesi ve ark., 1998). SCE testi toksik madde- DNA etkileşimini açığa çıkarmadaki duyarlılığı ve genotoksik kimyasalların kültüre edilmiş ya da muamele edilmiş hayvanlardan alınan hücre örneklerinde SCE sayısını önemli ölçüde arttırması sebebi ile bireysel olarak maruz kalınan genotoksik karsinojenlerin kan lenfositlerinde yarattığı DNA hasarını belirleyen bir indikatör olarak kullanılmaktadır (Albanesi ve ark., 1998).

### **1.5.3. DNA hasarı ya da gen mutasyonlarını saptayan yöntemler**

#### **1.5.3.1. Comet (Single Cell Gel Electrophoresis ) testi**

Bu yöntem, DNA iplik kırılmaları ve çapraz bağlanma gibi DNA hasarları ile DNA onarım bölgelerindeki hataları, bir mikrojel sistemi kullanarak belirleyebilmektedir (Ostling ve Lohanson, 1994; Singh ve ark., 1988). Uygulamada, kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücrelerindeki DNA hasarını belirlemek amacıyla in vivo ya da in vitro olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, özellikle endüstriyel ürünlerde de kullanımı hızla artan bir test

sistemidir. Hücreler erimiş agarozda süspanse edilerek lam yüzeyine yayılarak, yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltisi ve deterjan ile lizis edilmektedir. Serbest kalan DNA nötral ya da alkali koşullarda elektroforeze tabi tutulmaktadır. DNA'nın elektroforez ortamında anoda doğru olan göçü taşıdığı hasar ölçüsünde farklılık gösterir. DNA'daki hasar büyük ise, zerrecikler şeklinde yaygın bir göç sergiler. DNA'nın jel üzerindeki konumu uygun bir boyama yapılarak, flouresan ya da ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmekte ve oluşan DNA kuyruklarının ölçülmesi ile maruz kalınan ajanın genotoksik potansiyeli hakkında fikir edinilmektedir (Albertini ve ark., 2000).

#### **1.5.3.2. Mouse lymphoma testi**

Fare Lymphoma hücresi ileri mutasyon testinde, Timidin kinaz (TK) aktivitesine sahip, L5178Y (TK+/+ or TK+/-) hücreler test ajanları ile muamele edilirler. Hücrelerin kendini ifade ettiği seçici kültür ortamında, sadece mutant hücreler (TK-/-) seçici ortam koşullarında hayatta kalırlar ve test bileşeninin mutajenitesi, mutantların sayısındaki artış ile ortaya çıkar. Bu test, fare lenfoma hücrelerindeki, gen mutasyonlarını saptayabilen bir *in vitro* mutasyon yöntemidir(Oberly,1997).

#### **1.5.3.3. Muta mouse / Big blue yöntemi**

Test ajanına maruz bırakılan farelerden DNA izole edildikten sonra, bu DNA'lara, rekombinant bakteriyofajlar ile bakteri geni eklenir. Fare genomundaki, bakteri gen ürününün mutasyonel değişimi, mikrobiyolojik yöntemlerle tespit edilerek, oluşan gen mutasyonları saptanabilmektedir.Bu test, son yıllarda geliştirilmiş *in vivo* bir yöntemdir.

#### **1.5.3.4. HPRT gen mutasyon testi**

HPRT geni X kromozomu üzerinde bulunur ve pürin bazı biyosenteziyle ilgili enzimi kodlar. Bu gende meydana gelen mutasyon ile HPRT enzimi kaybı olmaktadır. Bu durumda hücreler ancak 6-tioguanin (6-TG) muamelesi ile hayatta kalabilmektedirler. HPRT yöntemi, somatik gen mutasyonlarının *in vivo* ya da *in vitro* ortamlarda farklı memeli kültür hücrelerinde, pozitif olarak seçilmesi

prensibine dayanır. DNA baz çifti değişimlerini, büyük ya da küçük çaptaki delesyonları, inversiyonları ve heterolog kromozom rekombinasyonları gibi genetik değişimleri büyük ölçüde yansıtmaya yeteneğine sahiptir. Çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Albertini ve ark., 2000; Cole ve Skopek, 1994).

Sözü edilen yöntemlerin tümü sözkonusu olası mutajenik etkileri saptamak amacıyla, bağımsız olarak ya da birkaçı birlikte karşılaştırmalı olarak kullanılmaktadır. Bir testte pozitif etkili olan bir madde, diğerinde pozitif ya da negatif etkili olabilir, çünkü testlerin saptadığı mutasyon tipleri farklıdır.

## **1.6. Genotoksisite çalışmalarında HPRT geni ve önemi**

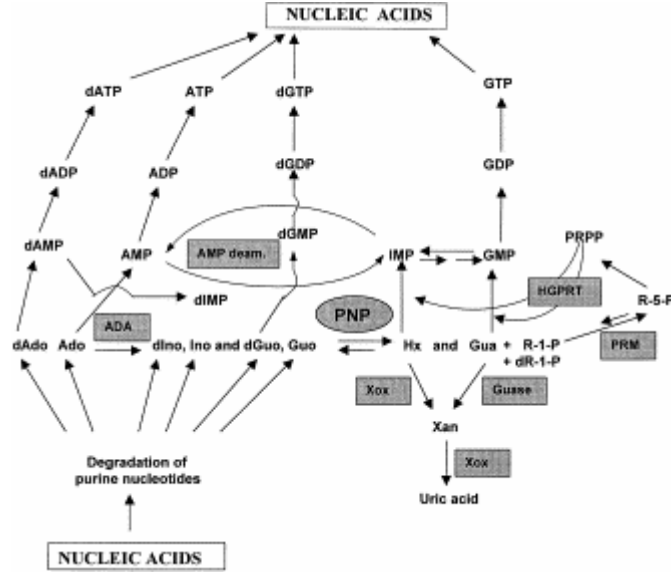
### **1.6.1. HPRT geni ve fonksiyonları**

HPRT geni X kromozomunun q kolunun q26-q27,2 bölgesinde bulunmaktadır. 654 nükleotitlik protein şifreleyen bu bölge, 9 ekson ve 7 intron içermektedir. Bütün gen, yaklaşık 44 kilo baz uzunluğundadır. Bu gen Hipoksantin Guaninin Fosforibozil Transferaz (HPRT) enzimini kodlamaktadır (Albertini, 2001). Ayrıca, 4 adet fonksiyonel olmayan HPRT pseudogenleri kromozom 5, 9 ve 11 üzerinde bulunmaktadır (Patel ve ark., 1986).

Hprt lokusu mutasyonel mekanizma çalışmalarında ilgi odağı olmuştur, çünkü; kültüre edilen hayvan hücrelerinde gen ifadesine karşı oluşan ürünün seçilmesine elverişlidir ve özellikle insanlarda bu lokusun yeni mutasyonları önceden bildirme özelliği vardır (Patel ve ark., 1986).

HPRT geni X gonozomunda yer aldığı için, bayanlarda homozigot ya da heterozigot durumda olabilir. Heterozigot bayanlarda genin bir alleli mutant olsa dahi sağlam ya da yabancı allel işlevsel olduğundan bayanlar sağlıklı olurlar. Erkeklerde ise normal veya mutant HPRT gen ürünleri bütün hücrelerde tamamen yansıtılır ve HPRT gen işlevine bağlı anomaliler görülebilir (Gregoria, L.De, ve ark., 2005).

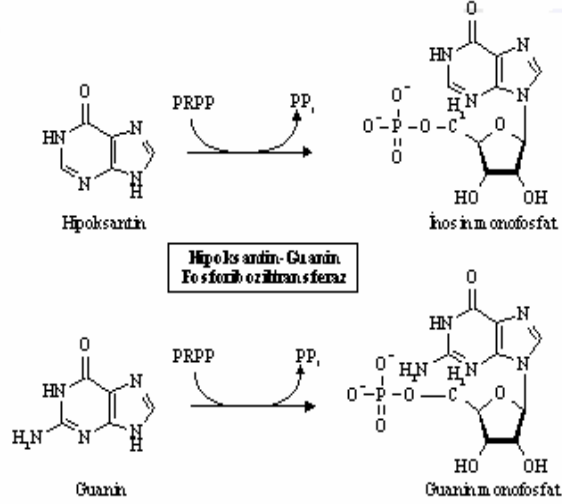
Hipoksantin Guaninin Fosforibozil Transferaz (HPRT) enzimi, guaninin ve hipoksantin fosforibozilasyonunu sağlar. Bu mekanizma, pürin bazları ve onların nükleozidlerini yıkımdan kurtarma işlevini yürütmektedir.



Şekil1.1 Pürin Metabolizması

HPRT enzimi, serbest pürin bazlarına fosforibozil grubu ekler, burada fosforibozil grubunu veren molekül ise, PRPP (5-fosforibozil pirofosfat)' dir. HPRT enzimi, hipoksantini fosforibozile ederse, İnosin monofosfat (IMP) guanini fosforibozile ettiğinde ise Guanin monofosfat (GMP) oluşmaktadır. Bu moleküller ya direkt olarak nukleotit yapısına katılırlar ya da purin nukleotit metabolizma döngüsü içinde dönüşüme uğrarlar (Micheli, 1999).





**Şekil 2** Pürin kurtarma yolları

Memeli hücrelerinde, HPRT enzim aktivitesindeki eksiklik sonucu, pürin bazı kurtarma metabolizması çalışmaz ve pürin artışı olur ve artan pürinlerin yıkımı ile kanda ürik asit birikimi gerçekleşir. Pürin metabolizmasının son ürünü olan ürik asitin fizyolojik olarak rolü yoktur. insanlarda ürik asiti suda daha çözünür hale getiren allantoin ve ürik asit birikimini önleyen ürikaz yoktur. Bu nedenle serumda ürik asitin artışı, ürik asitin aşırı üretimi, yetersiz atılım veya her iki mekanizmanın sonucu olarak ortaya çıkabilir. Ürik asitin yüksek düzeyleri toksiktir ve dokularda hasara sebep olur. Bu hasarın çeşitli dokularda görülmesi çok önemli patolojik durumlara sebep olmaktadır. Pürin nükleotit sentezi ve yıkımı tüm dokularda olmasına rağmen, ürik asit oluşumu primer olarak karaciğer ve ince barsaklar olmak üzere ksantin oksidaz içeren dokularda meydana gelir. Ürik asit üretimi diyet, pürin içeriği, pürin biyosentezi ve kurtarma yollar arasındaki bağıl oranla ilişkilidir (Yamamoto, 2005).

HPRT geni, bütün dokularda özellikle beyinde ifade edilmektedir (Micheli, 1999). Normal koşullarda beyindeki HPRT düzeyi diğer dokulardan

daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle beyin IMP ve GMP sentezi için kurtarma yollarına daha çok bağımlıdır.

Fare beyni çalışmalarında, HPRT aktivitesinin özellikle, insanlarda hafıza ve öğrenme merkezi olan hippocampus'ta yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Yeni doğan farelerde, beyindeki HGPRT aktivitesi günlere bağlı olarak aşamalı bir artış göstermiştir (Nakagawa ve ark. 1993)

HPRT geni farklı mutasyonlar tarafından fonksiyon kaybına uğrayabilir. Şimdiye kadar, bu gende 50 kadar mutasyon belirlenmiştir. Genellikle delesyonları içeren mutasyonların bazıları, çerçeve kayması ve transisyon tipindedir. Bu mutasyonlar HPRT proteininde tamamen veya bir kısım işlevsel hatalara neden olabilir. İnsanda HPRT yetersizliğinin bir tipi, GUT hastalığına neden olmaktadır.

HPRT enzim eksikliği ile ortaya çıkan en önemli hastalık, Lesh-Nyan sendromudur. X'e bağlı kalıtsal resesif bir hastalıktır. Bu sendromun, 400,000 çocuktan birinde görülme olasılığı vardır, nörolojik belirtilerle ortaya çıkar, zihinsel gelişmeyi yavaşlatır, saldırgan davranışlara, zeka geriliğine ve spastik kusurlara sebep olabilmektedir (Gregoria, 2005).

### **1.6.2. HPRT geni ve HPRT gen mutasyon testi**

HPRT geni, hayvan ve insanlar üzerinde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda, bir belirteç olarak kullanılır. HPRT geni mutasyona uğramış hücrelerde, pürin bazı kurtarma metabolizması işlev göremediği için pürin bazının nukleotit yapısına katılması engellenir. Bu tip hücreler ortamda bir pürin analogu olduğunda yaşama ve çoğalma şansı kazanırlar. Ancak, pürin baz analogları, sağlam hücreler için toksik etkiye sahiptir. HPRT geni sağlam olan hücreler, pürin baz analogunun bulunduğu ortamda hassasiyet gösterir, yaşama ve çoğalma özelliklerini kaybederler. Bu nedenle çalışmalar, hücrelerin pürin baz analogu bulunan ve bulunmayan ortamlardaki çoğalma potansiyellerini değerlendirme prensibine göre yürütülür (Albertini, 2001).

### 1.6.3. HPRT testi ile ilgili çalışmalar

İn vivo mutasyonel çalışmalar, kan lenfositleri üzerinde odaklanmıştır. Bu incelemelerde T hücrelerinde, moleküler mutasyon analizi ile çevresel faktörlerinin etkilediği mutasyonlara yönelik veriler ortaya konulmaya çalışılmıştır. HPRT analizi potansiyel mutajen ve karsinojen ajanları ortaya çıkarmak için T lenfositlerinde, CHO, V79 ve lenfoma L5178 hücrelerinde uygulanmaktadır.(Beland.,ve ark., 1999). İnsanlarda HPRT mutant frekansı artışı, iyonize radyasyon ve çeşitli kimyasal ajanlara maruz kalan lenfositlerde belirlenmiştir.( Albertini ve ark. 1993; Cole ve ark.,1994). Bunlara benzer analizler farelerde ve ratlarda da bulunmuştur ( Aidoo, A. ve ark., 1991).

Hackman ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan bir çalışmada sigara içen ve içmeyen akciğer kanserli hastaların mutasyonel değişimleri, T hücrelerinde HPRT testi ile araştırılmıştır. HPRT geninde yapılan moleküler genetik analizler sonucu, sigara içen ve içmeyen hastaların T hücresi HPRT mutantlarında ekson kayıpları olduğu görülmüştür. Karakterize edilen bölge mutasyonlarında ise sigara içmeyenlerin % 79 unda, sigara içenlerin ise % 90' nında nokta mutasyon olduğu saptanmıştır. Sigara içmeyen sağlıklı kişilerle, sigara içmeyen akciğer kanserli hastalarda hprt mutasyon sıklığı benzer değerde iken, sigara içen kontrollerle, sigara içen akciğer kanser hastaların hprt mutasyon sıklığı arasında anlamlı fark görülmüştür.

T lenfositleriyle yapılan HPRT testinde, sigara kullanan anneler ve sigara kullanmayan annelerin henüz doğmamış çocuklarının göbek bağından alınan lenfositlerde varyans frekansına bakılmıştır. İn vitroda yapılan çalışma sigara içmeyen annelerle, sonradan içmeyi bırakan anneler arasında çok önemli bir fark olmadığını göstermiştir. Buna karşın sigarayı bırakmayan annelerin T lenfositlerindeki HPRT geninin 2. ve 3. eksonunda uygunsuz değişimler gözlenmiştir ( Keohavong ve ark., 2005)

HPRT test yöntemiyle Horakiwa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2002) ise BD(1-3 butadien) in farelerde HPRT gen mutant frekansı yükselttiği bulunmuştur.

Folik asit yetersizliğinde in vivo ve in vitro da yapılan çalışmalarda HPRT lokusunda mutant frekansının (MF) ve DNA kırılmalarının arttığı görülmüştür (Branda ve ark., 1999).

Aidoo ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada ise, insanlar ve farelerde hprt mutasyon birikiminin yaşla arttığı doğrulanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada ise rat hprt lenfosit analizlerinde alkilleyici ajanların nitropolisiklik aromatik hidrokarbonların, 1,6dinitropyren, polisiklik aromatik hidrokarbon, 7-12 dimetilbenzen(alfa)antrasen ve aflotoksin B1 in hprt mutant frekansını artırdığı gözlenmiştir. Fakat buna ilaveten aromatik amino karsinojen olan 2,4 toluenodiaminin hprt mutant frekansını yükseltmediği belirlenmiştir (Beland, F. A., 1999).

Diaz-Llere tarafından yapılan (2000) bir çalışmada, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından insan T lenfositleri, hprt lokusunda meydana getirilen mutasyonlar üzerinde durulmuştur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin muamele olan hücrelerin azalmasına ve doza bağımlı olarak da hprt mutant frekansının artmasına sebep olduğu görülmüştür.

Kojik asit üzerinde yapılan bir çalışmada ise kojik asitin fare lenfoma L5178 ve V79 hücreleri, hprt geni üzerindeki etkilerini araştırılmıştır. Deney sonucunda her iki hücre tipinde de maddenin genotoksik aktivitesi olmadığı saptanmıştır (Nohynek ve ark., 2003).

## **1.7 Esansiyel Yağ ve Monoterpenler**

Yurdumuz, 10.000'den fazla bitki türünün doğal olarak yetiştiği zengin floraya sahip ender ülkelerdendir. Bu bitkilerle yapılan araştırmalar yeni maddelerin varlığını ortaya koymaktadır. Bu araştırmalarla yararlı ve tıbbi bitkilerin değeri anlaşılır. Tıbbi bitkiler ilaç ilkel maddeleri veren faydalı bitkilerdir. Bugün tıbbi bitki yetiştirmek, kaliteli drog elde etmek, drog ticareti yapmak, droglardan ekstre elde etmek, bunları farmasötik preparatlar şekline koymak çok geniş bir ekonomik değer kazanmıştır. Bitkilerin tedavi amacıyla kullanılması, ilk uygarlıklara kadar uzanır (Baytop, 1999).

Bitkilerden veya bitkisel droglardan elde edilen oda sıcaklığında sıvı halde olan bazen de donabilen, kuvvetli kokulu uçucu, yağimsı karışımlara uçucu yağlar-eterik yağlar-ya da esansiyel yağlar olarak adlandırılır. Esansiyel yağların

elde edilmesi: Buhar veya su distilasyonu, Soğukta sıkma, Çözücü ekstraksiyonu ya da Sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon şeklinde yapılabilmektedir.

Esansiyel yağların büyük çoğunluğu terpenik maddelerden oluşmuştur. Bunlar lipofilik bileşiklerdir böylelikle hücre membranından kolaylıkla geçebilir ve bu sayede de deride ve akciğerde kolayca absorbe edilebilirler. Esansiyel yağlar bitkilerin uçucu yağ kısmını kapsar. Bitkilerin karakteristik özelliklerine ve kokularına sahiptir. Monoterpenler ise esansiyel yağların büyük bileşikleridir ve 10 karbon atomu taşıyan izoprenoid gruba aittir. Esansiyel yağlar ve monoterpenler düşük konsantrasyonda güzel tada ve hoş kokuya sahiptir. Esansiyel yağlar ve monoterpenler tarih boyunca medikal ilaç olarak kullanılmıştır. Örneğin; merhemlerin, ağız yaralarında, göğüs ağrılarında ve üşütmelerde kullanılması gibi (Stammati, ve ark., 1999 Mühlbauer ve ark., 2003)

Esansiyel yağlarla ilgili Isman (2000)'nın yaptığı çalışmaya göre, koku ve tat olarak verici olarak parfüm ve gıda endüstrisinde kullanılan belirli esansiyel bitki yağları, uzun zamandır böcekleri püskürtmede de kullanılmaktadır. Son araştırmalar bir çok ülkede bazı bitki esansiyel yağların böcekleri püskürtme yanında, özel zararlarla böcek öldürücü ve bazı bitki patojenlerine karşı fungusidal etki gösterdiğini rapor etmektedir.

### **1.7.1. Çalışmada Kullanılan Esansiyel Yağlar**

#### **1.7.1.1. Kekik (*Origanum onites* L.) esansiyel yağı**

Kekik (*Origanum onites*), Türkiye'de 40 kadar türü bulunan ve daha çok Ege ve Akdeniz bölgelerinde yaygın olan, 40-50 cm boyunda çok yıllık bir bitkidir. Pembe veya beyaz çiçekli, küçük yapraklı, kuvvetli kokulu olan bu bitki kurak tepe ve sırtlarda kümeler halinde bulunur. Yapraklar, kekik adıyla baharat olarak kullanılır. Kekik yağı genellikle, çeşitli türlerin çiçekli dallarından su buharı dilisyonu ile elde edilir. *Origanum onites* L. (Kekik) bitkisinden buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağı, % 74.0 karvakrol, %7.2 linalool, %4.4 timol ve %3.0 p-simen içermektedir.

Kekik esansiyel yağı, antiseptik ve ekspektoral etkiye sahip olduğundan, bronşit ve nezle ve akne tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun yanında antiseptik, kurt düşürücü ve kan dolaşımını uyarıcı etkileri de vardır. Antimikrobiyal

antifungal ve antioksidant özelliklerinden dolayı gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Antioksidant aktivite özellikle gıdalardaki yağların oksidasyonunu önlemede koruyucu aktiviteye sahip olabilir.

Kekik esansiyel yağının yüksek antimitotik aktivitesi sayesinde, tarımsal ürünlerde koruyucu olarak kullanılma olanağı da bulunmaktadır. Kekik yağı, ayrıca sabun, parfüm, krem, diş macunu ağız temizlik ürünleri deterjan gibi pek çok preparasyonda kokuları baskılama kapasitesi nedeniyle kullanılmaktadır.

#### **1.7.1.2. Defne (*Laurus nobilis L.*) Esansiyel Yağı**

Defne (*Laurus nobilis L.*), *Lauraceae* familyasından, 3-10 m. yükseklikte, kışın yaprağını dökmeyen, sarı çiçekli, dioik bir ağaç veya ağaççıktır. Meyvalarından elde edilen sabit ve eterik yağ vardır, midevi ve anti-nörolojik olarak kullanılır. Presleme ile %25-30 oranında yağ elde edilmektedir. Bu bitkinin yapraklarında (hoş kokulu eterik yağ bulunmaktadır. Defne bitkisinden elde edilen esansiyel yağda sesquiterpen özellikte altı bileşen elde edilmiştir. Defne'nin ayrıca antifungal, antibakteriyal , antidiyabet ve inflammatuar etkili olduğu ve apoptosise neden olan bileşikler içerdiği bildirilmiştir (Fang, ve ark., 2005).

#### **1.7.1.3. Adaçayı (*Salvia fraticosa*) Esansiyel yağı**

Adaçayı (*Salvia L.*), *Labiatae* familyasının bir üyesidir. Tıpta ve parfümeri sanayisinde uçucu yağ kaynağı olarak kullanılan günümüzde botaniğin çeşitli kollarında bilimsel çalışmalara konu olmuştur. Yapraklarından drogu hazırlanır. Su buharı distilasyonu ile %1,5 kadar yağ elde edilir. Yapraklarından elde edilen uçucu yağ %15 kadar cineol taşır. Fakat bileşiminde bulunan thujon maddesi toksik olduğundan fazla dozda kullanılmamalıdır. Eterli uçucu yağı %30 Thujon, %15 Cineol, Linalol, Borneol, Salven, Pinen ve Kafur ayrıca tanenler, triterpenoitler, flavonlar ve östrojen benzeri maddeler içermektedir( Pinorasa, 2005; Lima, 2004)

## **1.7.2. Çalışmada Kullanılan Monoterpenler**

### **1.7.2.1. Karvakrol**

Labiatae familyasında *Origanum* türüne ait bir çok temel yağların bileşenini oluşturan ve son yıllarda geniş ölçeklerde besin ve kozmetik sanayinde kullanılan bir maddedir. Buna ek olarak kendisine ait kokusu, bir çok temel yağlar içermesi ve özellikle de antibakteriyal, antifungal, insektisit, ağrı kesici, antioksidant, antitümör ve antimitojen gibi pek çok biyolojik aktiviteleri olduğu bildirilmiştir. (Ultee ve ark., 1998, Aydın, ve ark., 1996, Zeytinoğlu, ve ark., 2003, İpek ve ark. 2003, ).

### **1.7.2.2. Timol**

Timol, kekik bitkisinden elde edilen doğal bir antiseptiktir. Tıpta, tarımda, kozmetikte ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Yanishlieva, 1999)

Timol, antimikrobiyal ajan olarak bilinir. Oral bakterilere karşı bakterisit aktivitesinden dolayı gargaranın bileşiminde kullanılmaktadır. Timolün önemli bir fungusit aktivitesinin de olduğu gösterilmiştir. Timolün kimyasal yapısının analizinden bu bileşiğin hidrofobik davranışa sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca timolün, membran reseptörleri ve membran proteinlerinin aktivitesinde dolayısıyla membran geçirgenliğinde etkili bir madde olduğu saptanmıştır (Valera, 2006)

Timol ve karvakrolün sıçanlarda yapılan metabolizma çalışmasında, metabolitlerin atımı 24 saat sonunda, hızlı ve küçük miktarlar halindedir. Karvakrol ve timolün büyük miktarlarının değişmeden atılmalarına karşın, metil ve izopropil grupların aşırı miktarda oksidasyonu görülür. Biyotransformasyon, benzil alkol ve 2-fenil propanolün türevi ve onlara karşılık gelen karboksilik asit türevleri oluşumu ile sonuçlanır.

### **1.7.2.3. (Cineol 1-8)**

Cineol, okaliptus, biberiye, defne ve adaçayı gibi birçok bitkiden elde edilen esansiyel yağ bileşiminde bulunmaktadır. Bu bileşik, geleneksel olarak bronşit hastalığı, soğuk algınlığı, sinüzitte kullanılmaktadır. Cineol 1-8'in biyokimyası diğer terpenler gibi izoprenlerden meydana gelen izoprenoiddir.

Cineol 1-8'in potansiyel anti-inflamatuar etkisi, siklooksijenaz yolunun inhibisyonu ile gösterilmiştir (Juergens, 2003).

Bu tez çalışmasında, genotoksik potansiyelleri hakkında yeterli bilgi ve veri bulunmayan, kendisi gıda, uçucu yağları ise çeşitli sektörlerde katkı maddesi ve bileşen olarak kullanılan bazı bitkilere ait uçucu yağ ve monoterpenlerin olası genotoksik aktivitesi, insan periferik lenfositlerinde HPRT gen mutasyon testi ile araştırılmıştır.



## **2.MATERYAL VE METOD**

### **2.1.Materyal**

#### **2.1.1.Kimyasal maddeler**

Kromozom Medyum B (Biochrom' dan), 6 thioguanin (Sigma)'dan, EMS (Etil Methane Sulfanat), MMS (Metil Methano Sulfanat), sitokalsin B(6µg/ml) (Sigma)'dan Giemsa (Fluka)'dan temin edilmiştir.

#### **2.1.2. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı**

Bu çalışmada kekik, adaçayı, defne, esansiyel yağları ile karvakrol, timol, cineol 1-8 monoterpenlerinin genotoksik etkileri HPRT test yöntemiyle araştırılmıştır.

Test maddeleri, BİBAM (Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi)'dan sağlanmıştır. Maddeler DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözülerek seyreltme ile 6'şar doz şeklinde hazırlanmıştır. Adaçayı, defne, timol, ve karvakrolün dozları sırasıyla 0.05µl/ml, 0.025µl/ml, 0.0125µl/ml, 0.00625µl/ml, 0.003125 µl/ml ve 0.00156 µl/ml dir. Kekik yağının ise 0.005µl/ml, 0.0025µl/ml, 0.00125µl/ml, 0.000625µl/ml, 0.0003125 µl/ml ve 0.000156 µl/ml dir Cineol test maddesinin deney 1 deki doz oranları 0.5µl/ml, 0.25µl/ml, 0.12µl/ml, 0.06µl/ml, 0.03µl/ml iken diğer deneylerdeki dozları adaçayı, defne, karvakrol ve cineol ile aynı dozlarda kullanılmıştır.

## **2.2. Metod**

### **2.2.1. Lenfosit kültürü**

22-30 yaşları arasında sigara içmeyen, ilaç kullanmayan sağlıklı bireylerden steril şartlarda alınan kan, 2,5 ml Kromozom Medyum-B bulunan tüplere, 6'şar damla (0,2 ml).ilave edilerek ve steril koşullara sahip, % 5 lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C de, toplam 72 saat inkübe edilmiştir.

### **2.2.2 Test Maddelerinin Uygulanması**

#### **2.2.2.1 .Deney 1 ( 24 saatlik uygulama )**

Periferel kan, herbir doz için iki adet olmak üzere, Kromozom Medyum-B içeren tüplere ilave edilmiştir. Ardından herbir test maddesi 2 adet tüpe olmak üzere ortama eklenmiş ve 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 24. saatte

tüpler, 1200 rpm de 15 dk santrifüj edilerek, test maddeleri kültür ortamından uzaklaştırılmış ve yerine yeni medyum konulmuştur. Tüpler, iki gruba ayrılıp, sadece bir gruba 6-TG (10µl/ml) eklenmiştir. Kültür tüpleri inkübasyonun devamı için etüve alınmış ve 32. saatte tümüne Cyt-B (Sitokalsin B, 6µl/ml) ilave edilerek, 72 saatlik inkübasyon tamamlanmıştır.

#### **2.2.2.2. Deney 2 ( 16 saatlik uygulama)**

Kan hücreleri medyum içersinde, 37 °C'de 8 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 8. saatte her bir test maddesinden iki tüpe olmak üzere test maddeleri ilave edilerek, 16 saatlik muamele yapılmıştır. 16. saatte tüpler 1200 rpm de 15 dk santrifüj edilerek, test maddeleri uzaklaştırılmış ve yerine yeni medyum konulmuştur. Tüpler, iki gruba ayrılıp, sadece bir gruba 6-TG (5µl/ml) eklenmiştir. Kültür tüpleri inkübasyonun devamı için etüve alınmış ve 32. saatte tümüne Cyt-B(6µl/ml) ilave edilerek, 72 saatlik inkübasyon tamamlanmıştır.

#### **2.2.3. Lenfositlerin İzolasyonu**

Kültür süresi olan 72 saatin bitiminde her bir tüp 1200 rpm'de 15 dk santrifüj edilip ve süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri içeren 0,7-1 ml lik sıvı iyice karıştırılarak homojen hale getirilip, 37 °C' lik hipotonik solüsyon (KCL) ile muamele edilmiştir. 1200 rpm'de 15 dk'lık santrifüj sonrasında hücreler, soğuk metanol-glasiyel asetik asit (3:1) karışımıyla fikse edilmiştir. Santrifüjleme ve fiksasyon işlemleri 3 kez tekrarlandıktan sonra, süpernatant atılarak hücreleri içeren 0,5-0,7 ml sıvı pipetajla homojenize edilmiştir.

#### **2.2.4. Preparatın Hazırlanması**

Pasteur pipetine çekilen hücre süspansiyonu, özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturularak, temiz, ıslak ve soğuk lamlar üzerine belli bir yükseklikten, damlatılmıştır. Preparatlar 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek kurutulmuştur.

### **2.2.5. Preparatların Boyanması ve Hücre Sayımı**

Lamlar, Söransan tampon içinde hazırlanan %5 lik Giemsa ile 12 dak. boyanmıştır. Boyadan çıkarılarak distile sudan geçirilen preperatlar dik olarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamların üzeri entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

Mikroskopik inceleme ve sayımlar Olympos marka mikroskopta, 20X objektifte yapılmıştır. Her bir doz ve uygulama için toplam 1000 adet hücre ve 1000 hücre içinde bölünen (2, 3 ve 4 çekirdekli hücre) ve bölünmeyen hücre sayıları tesbit edilmiştir.

### **2.2.6. Varyans hesaplanması**

Varyans frekansı değerleri; 6-TG ile muamele edilmiş hücre popülasyonunda, toplam 1000 hücre içinde bölünen (2, 3, ve 4 çekirdekli hücreler) hücre sayısının, 6-TG'ye maruz kalmamış hücre popülasyonunda, toplam 1000 hücre içinde bölünen hücre sayısına oranı ile hesaplanmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Deney I Bulguları

Deney I'den elde edilen verilere göre;

Kekik esansiyel yağı, uygulanan tüm dozlarda (0.005µl/ml, 0.0025µl/ml, 0.00125µl/ml, 0.000625µl/ml, 0.0003125 µl/ml ve 0.000156 µl/ml) adaçayı esansiyel yağı ve cineol ise uygulanan ilk iki dozda (0.05µl/ml, 0.0125µl/ml) varyans frekansı değerlerini, çözücü kontrol değerlerine göre oldukça yükseltmişlerdir.

Buna karşın defne esansiyel yağı ilk dozları (0.025µl/ml, 0.0125µl/ml) karvakrol ise tüm dozlarında (0.05µl/ml, 0.025µl/ml, 0.0125µl/ml, 0.00625µl/ml), varyans frekansı değerlerinin, çözücü kontrol değerlerine göre yükselişi daha düşük düzeyde olmuştur.

Diğer bir test maddesi olan timol'e ait sonuçlar, uygulanan tüm dozlarda (0.05µl/ml, 0.025µl/ml, 0.0125µl/ml, 0.00625µl/ml) varyans frekansı değerlerinin, çözücü kontrol değerlerine göre artmayıp yaklaşık değerlerde olduğunu göstermektedir.

**Çizelge1-** HPRT Deney 1- Kekik test maddesi uygulama sonuçları

Test maddesi ve dozları (µl/ml)	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Kekik 1 (0.05µl/ml)	256	319	0.80250
Kekik 2 (0.025µl/ml)	246	239	1.02928
Kekik 3 (0.0125 µl/ml)	241	159	1.51572
Kekik 4 (0.00625 µl/ml)	225	204	1.10294
Kekik 5 (0.00312 µl/ml)	220	195	1.12820
Kekik 6 (0.00156 µl/ml)	219	189	1.15873

**Çizelge 2-** HPRT Deney 1- adaçayı test maddesi uygulama sonuçları

Test maddesi ve dozları (µl/ml)	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Adaçayı 1(0.05µl/ml)	110	120	0.91666
Adaçayı 2 (0.025µl/ml)	112	123	0.91056
Adaçayı 3 (0.0125µl/ml)	75	148	0.50667
Adaçayı 4 (0.00625µl/ml)	58	145	0.40000
Adaçayı 5 (0.00312 µl/ml)	45	130	0.34615

**Çizelge 3-** HPRT Deney 1- defne test maddesi uygulama sonuçları

Test maddesi ve dozları (µl/ml)	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Defne 1 (0.05µl/ml)	*(hücre sayılamad)	213	
Defne 2 (0.025µl/ml)	224	320	0.70000
Defne 3 (0.0125µl/ml)	141	207	0.68115
Defne 4 (0.00625µl/ml)	133	240	0.55416

**Çizelge 4-** HPRT Deney 1- karvakrol test maddesi uygulama sonuçları

Test maddesi ve dozları (µl/ml)	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Karvakrol 1 (0.05µl/ml)	197	260	0,75769
Karvakrol 2 (0.025µl/ml)	227	300	0.75666
Karvakrol 3 (0.0125µl/ml)	216	290	0.744822
Karvakrol4(0.00625µl/ml)	189	258	0.73255

**Çizelge 5-** HPRT Deney 1- cineol test maddesi uygulama sonuçları

Test maddesi ve dozları (µl/ml)	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Cineol 1 (0.5µl/ml)	197,5	127,4	1.55023
Cineol 2 (0.25µl/ml)	185	193,6	0.95555
Cineol 3 (0.12µl/ml)	170	267	0.63670
Cineol 4 (0.06µl/ml)	167	252	0.66269

**Çizelge 6-** HPRT Deney 1- timol test maddesi uygulama sonuçları

Test maddesi ve dozları ( $\mu\text{l/ml}$ )	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Timol 1 (0.05 $\mu\text{l/ml}$ )	178	347	0.51296
Timol 2 (0.025 $\mu\text{l/ml}$ )	165	348	0.47441
Timol 3 (0.0125 $\mu\text{l/ml}$ )	159	345	0.46086
Timol 4 (0.00625 $\mu\text{l/ml}$ )	140	348	0.40229

**Çizelge 7-** HPRT Deney 1- kontrol grubu sonuçları

Test maddesi ve dozları ( $\mu\text{l/ml}$ )	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Spontan1	62	165	0.37575
DMSO (Dimetil sülfat)	69	143	0.48252
MMS (0,02 $\mu\text{l/ml}$ ) (Methanesülfonat)	174	120	1,45000

### 3.2. Deney II Bulguları

Deney II'den elde edilen verilere göre;

Defne esansiyel yağı ve Cineol'ün uygulanan ilk dozlarında (0.05  $\mu\text{l/ml}$ ) varyans frekansı değerleri, çözücü kontrol değerlerine göre belirgin bir yükselme gösterirken, bu maddelerin diğer dozları ile, karvakrolün tüm dozlarında (0.05 $\mu\text{l/ml}$ , 0.025 $\mu\text{l/ml}$ , 0.0125 $\mu\text{l/ml}$ , 0.00625 $\mu\text{l/ml}$ ) ise, varyans frekansı değerlerinin, çözücü kontrol değerlerine göre artmayıp yaklaşık değerlerde olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 8-** HPRT Deney 2- karvakrol test maddesi uygulama sonuçları

Test maddesi ve dozları (µl/ml)	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Karvakrol 1(0.05µl/ml)	73,2	97,9	0.74770
Karvakrol 2 (0.025µl/ml)	95,9	129	0.74341
Karvakrol 3 (0.0125µl/ml)	84,9	143	0.59370
Karvakrol 4(0.006µl/ml)	77,1	163	0.47300

**Çizelge 9-** HPRT Deney 2- cineol test maddesi uygulama sonuçları

Test maddesi ve dozları (µl/ml)	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Cineol 1 (0.05µl/ml)	124	136	0.91176
Cineol 2 (0.025µl/ml)	93,7	153	0.61241
Cineol 3 (0.0125µl/ml)	82,3	149	0.55234
Cineol 4 (0.006µl/ml)	77,9	159	0.48993

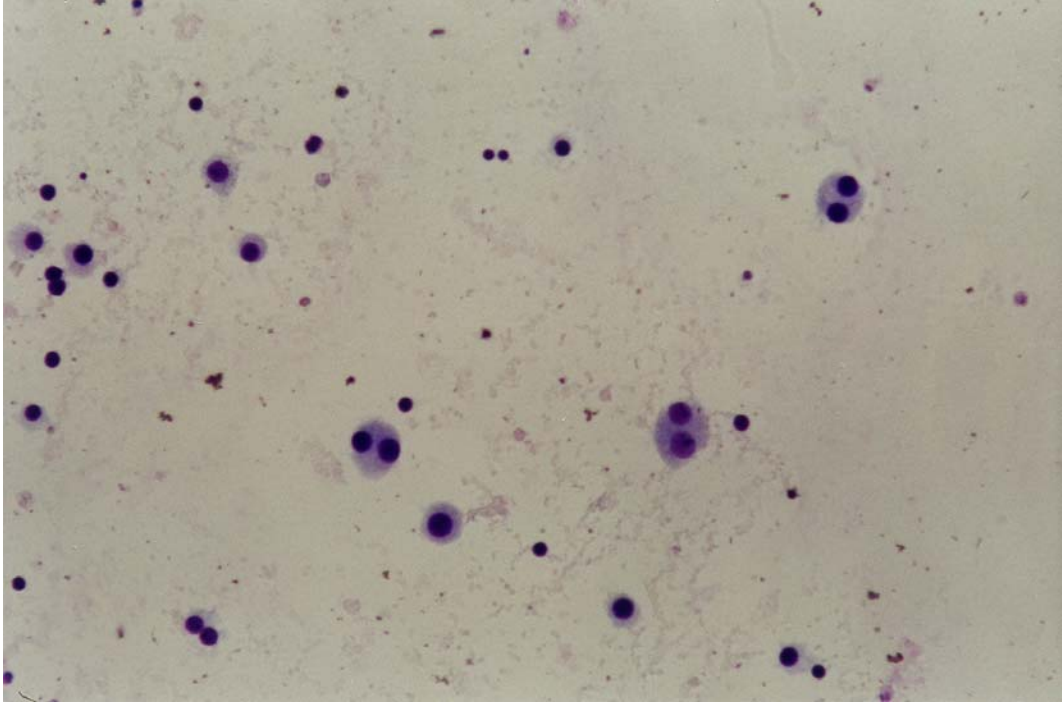


**Çizelge 10-** HPRT Deney 2- defne test maddesi uygulama sonuçları

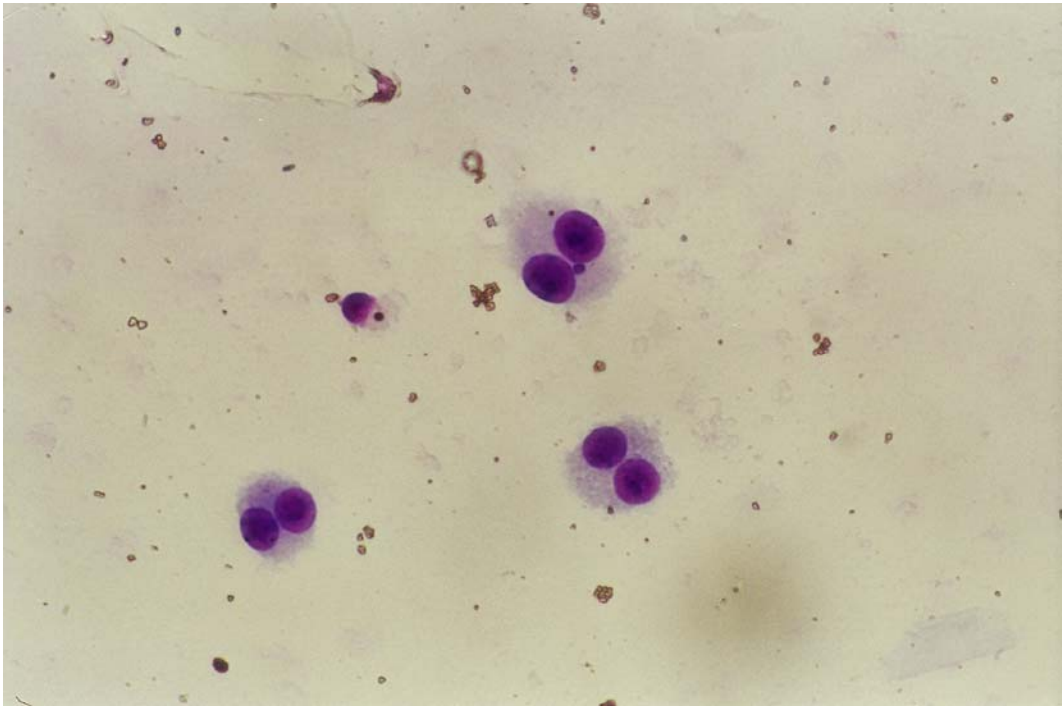
Test maddesi ve dozları (µl/ml)	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
Defne 1 (0.05µl/ml)	178	151	1.17880
Defne 2 (0.025µl/ml)	95,4	136	0.70147
Defne 3 (0.0125µl/ml)	94,7	140	0.67642
Defne 4 (0.006µl/ml)	105	144	0.72916

**Çizelge 11-** HPRT Deney 2- kontrol grubu uygulama sonuçları

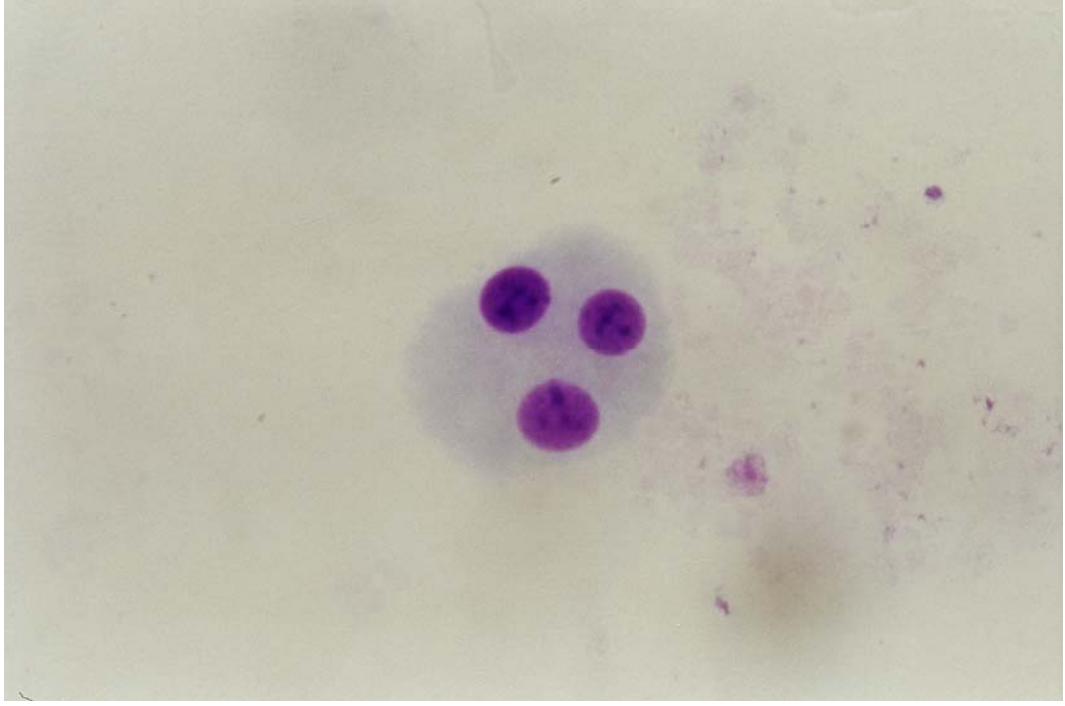
Test maddesi ve dozları (µl/ml)	(+) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	(-) 6-TG 1000 hücrede polinükleotit sayısı	Varyans frekansı değerleri
DMSO (Dimetilsülfat)	127	184	0.6902
EMS (Etil Methane- Sülfanat) 60µl/ml	184	167	1.10179
EMS (Etil Methane- Sülfanat) 30µl/ml	153	142	1.07746
Spontan	116	196	0.59183



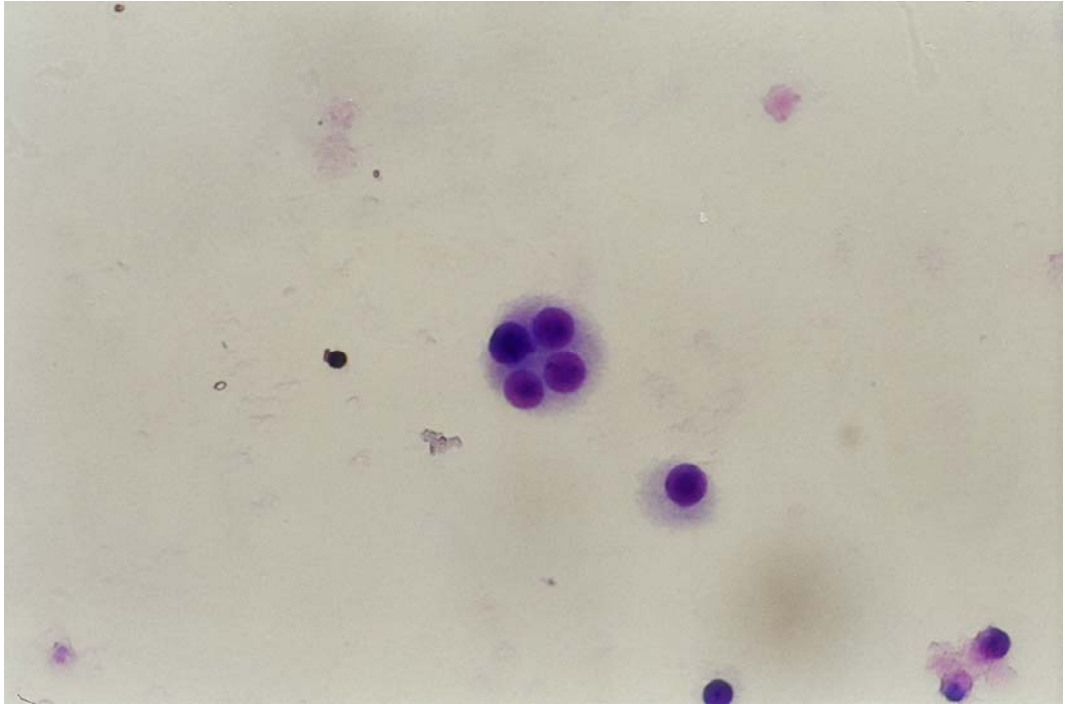
**Şekil 2.1.** İnsan lenfositlerinde tek ve iki çekirdekli hücre



**Şekil 2.2** insan lenfositlerinde iki çekirdekli hücre



**Şekil 2.3** insan lenfositlerinde üç çekirdekli hücre



**Şekil 2.4** insan lenfositlerinde dört çekirdekli hücre

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli bitkilerden ekstrakte edilen esansiyel yağlar ve bu yağlardan izole edilen terpenoid bileşikler; farklı biyolojik aktivitelerinden dolayı, aromaterapide, kozmetikte, gıda üretiminde, ilaç sanayisinde ve ev ürünleri (deterjanlar, sabunlar, böcek ilaçları) yapımında oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu maddelerin söz konusu biyolojik aktiviteleri arasında antibakteriyal, antifungal ve antioksidan ( Milos ve ark. 2000).etkiler ilk sırada yer alırlar. Tüketimi çoğu kez kontrolsüz ve bilinçsiz yapılabilen bu bileşiklerin özellikle insan üzerinde yapabileceği akut toksik ve daha ileri boyuttaki genotoksik etkiler çok iyi bilinmemektedir.

Ancak sayıları az da olsa, esansiyel yağ ve terpenoid maddelerin mutajenik etkilerini araştıran çalışmalar, bize bu bileşiklerin çeşitli mekanizmalarla genotoksik ya da antigenotoksik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.

1982’de Sekizawa ve Shibamoto beş esansiyel yağ ( anason yağı, cassia yağı, tarçın kabuğu yağı, karanfil yağı ve rezene yağı) üzerinde , üç mikrobiyal genotoksisite testi (Ames *Salmonella* reversion assay, *Bacillus subtilis rec<sup>-</sup>* assay, *Escherichia coli* WP2 *uvr A* reversion test ) uygulamışlardır. Esansiyel yağlar *Salmonella* ve *uvr A* reversion testlerinde negatifken DNA-onarım testinde pozitif sonuç vermiştir.

1994’te Muller ve arkadaşları memeli hücrelerinde fesleğen esansiyel yağının genotoksik etkisini göstermişlerdir.

Kekik yağının temel bileşenlerinden karvakrol ve timol toksik olmayan dozlarda Ames testiyle denenmiş ve metabolik aktivasyona bağlı olmaksızın revertant sayılarını 1.5-1.7 kat arttırdıkları bulunmuştur. Aynı bileşikler SOS-kromatest yöntemiyle denendiğinde, toksik olmayan dozlarda DNA hasarına yol açmadığı saptanmıştır (Stammati ve ark.,1999). Ames’le yapılan başka bir çalışmada timol, TA97, TA98 ve TA100 suşları üzerinde mutajenik etki göstermemiştir (Azizan ve Blevins, 1995).

Bir çalışmada, 6 monoterpinoit bileşiğin mutajenik etkisi, TA 97, TA 98, TA 100, TA 102 suşlarında, *Salmonella*/ mikrozom testi ile araştırılmıştır. Bunlar citral, citronellal, (±) camphor, 1,8 – cineole, terpinol ve (-) mentholdür. Elde

edilen sonuçlara göre, citral, citronellal, ( $\pm$ ) camphor, 1,8 – cineole ve (-) menthol mutajenik etki göstermezken, terpinol TA 102 suşunda revertant oluşumunu arttırarak mutajen etkili olmuştur (Gomes-Carneiro, ve ark. 1998).

Lazutka ve arkadaşları (2001), *Drosophila melanogaster* ve insan lenfositinde *Anethum graveolens* L., *Mentha  $\times$  piperita* L. (nane), *Pinus sylvestris* (çam) esansiyel yağlarının genotoksitesi araştırmışlardır. Bu çalışmada esansiyel yağların genotoksik etkileri, SCE (kardeş kromatit değişimi) ve kromozom Aberasyon (CA) testleri ile sınanmıştır. Sonuç olarak esansiyel yağların sitotoksik ve çeşitli genotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, karvakrolün, insan lenfosit kromozomlarında, pozitif bir mutajenle indüklenmiş kardeş kromatit değişimini önemli ölçüde azaltarak, antimutajenik aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir (İpek ve ark., 2003).

Laboratuvarımızda yapılan bir başka çalışmada ise, *Origanum onites* L. (Kekik) yağının mutajenik ve antimutajenik etkileri TA98 ve TA100 suşları ile Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi kullanılarak hem S9'lu hem de S9'suz ortamda araştırılmıştır. Sonuçlara göre kullanılan dozların hiçbirinde S9'suz ortamda mutajenik etkiyle karşılaşılmamıştır. S9'lu ortamda ise sadece bir tek dozda mutajenik etki gözlenmiştir. Diğer yandan, kekik yağının, pozitif mutajenle indüklenen mutasyon oranını önemli ölçüde düşürerek, bu suşların taşıdığı gen mutasyonları açısından antimutajenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (İpek ve ark., 2005).

Yapılan yeni bir çalışmada kekik yağının bileşenlerinden olan timol ve karvakrol ve  $\gamma$ -terpinenin genetik potansiyeli insan lenfosit hücrelerinde, tek hücreli jel elektroforez (Comet testi) yöntemi ile araştırılmıştır. Aynı zamanda timol karvakrol ve  $\gamma$ -terpinenin, DNA hasarlarını indükleyen 2-amino-3-methylimidazo (IQ) ve Mitomycin C (MMC) gibi mutajenlere karşı, bu aktiviteyi engelleme potansiyelleri, diğer bir deyişle antimutajenik etkileri test edilmiştir. Timol ve  $\gamma$ -terpinenin 0.1 mM'den düşük konsantrasyonlarında IQ ve MMC'ye karşı antigenotoksik etkili olduğu, fakat 0.2 mM'den yüksek konsantrasyonlarında ise kendisinin DNA kırıkları şeklinde genetik hasara sebep olduğu saptanmıştır. Diğer yandan doza bağlı antigenotoksik ve genotoksik etki mekanizmasının

karvakrol için de geçerli olduğu belirlenmiş, ancak etkili dozların timole göre daha düşük konsantrasyonlar olduğu sonucuna varılmıştır (Aydın ve ark., 2005). Bu çalışma, karvakrol ve timolün DNA ile olan etkileşiminin doza bağlı olarak değiştiğini göstermesi açısından son derece yararlı veriler sağlamış ve çalışmalarımıza da ışık tutmuştur.

Bu çalışma, bazı esansiyel yağ ve terpenoid maddelerin, gen mutasyonlarına yol açabilecek düzeydeki genotoksik etkilerini HPRT gen mutasyon testi ile araştırmayı hedeflemiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, kekik yağının uygulanan tüm dozlarda varyans frekansı değerini önemli ölçüde yükseltmesi, HPRT gen mutasyonu açısından etkin bir aktiviteye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan, kekik yağı bileşenlerinden olan karvakrolün bu aktiviteyi çok düşük düzeyde gösterdiği, Timol'ün de negatif bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan diğer test maddeleri olan defne ve adaçayı esansiyel yağı ile cineol-1,8'in ise yüksek olan ilk dozlarda, varyans frekansı değerini çözücü kontrole göre yükselterek, doza bağlı olarak HPRT gen mutasyonuna sebep olabileceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- [1] JAGETIA, G.C., JAYAKRISHNAN, A., FERNANDES, D. ve VIDYASAGAR, M.S., *Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment*, Mutat. Res., **491**, 9-16 (2001).
- [2] PAI, C.A., *Foundation of genetics. Ascience for society*, Kefford Press, Singapur (1985).
- [3] LELIE, D., REGNIERS, L., BORREMANS, B., PROVOOST, A. ve VERSCHAEVE, L., *The VITOTOX test, an SOS bioluminescence Salmonella typhimurium test to measure genotoxicity kinetics*, Mutat., Res., **389**, 279-290 (1997).
- [4] GOMEZ-ARROYO, S., DIAZ-SANCHEZ, Y., MENESES-PEREZ, M.A., VILLALOBOS-PIETRINI, R. ve LEON-RODRIGUEZ, J., *Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides*, Mutat. Res., **466**, 117-124 (2000).
- [5] MONARCA, S., FERETTI, D., ZANARDINI, A., MORETTI, M., VILLARINI, M., SPIEGELHALDER, B., ZERBINI, I., GELATTI, U. ve LEBBOLO, E., *Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses*, Mutat. Res., **490**, 159-169 (2001).
- [6] LAFFON, B., PASARO, E. ve MENDEZ, J., *Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei*, Mutat. Res., **491**, 163-172 (2001).
- [7] GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R.C. ve GELBART, W.M., *An introduction to genetic analysis*, W.H. Freeman and Company, New York, USA (1996)
- [8] ALBERTINI, R.J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T., NORPPA, H., SHUKER, D.E.G., TICE, R., WATERS, M.D., AITIO, A., *IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans*, Mutat. Res., **463**, 111-172, (2000)
- [9] LAZUKA, J.R., LEKEVICIUS, R., DEDONYTE, V., MACIULEVICIUTE-GERVERS, L., MIERAUSKIENE, J., RUDAITIENE, S. ve SLAPSYTE, G., *Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Lithuanian populations: effects of occupational and environmental exposures*, Mutat. Res., **445**, 225-239 (1999).

- [10] VIJAYALAXAMI, R.R. ve TICE, G.H.S., *Assesment of radiotion-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique*, *Mutat. Res.*, **271**, 243-252 (1992).
- [11] OTOSHI, E., YAGI, T., MORI, T., MATSUNAYA, T., NIKAIDO, O., KIM, S.T., HITOMI, K., IKENAGA, M. ve TODO, T., *Respective roles of cyclobutane pyrimidine dimers, (6-4) photoproducts and minor photoproducts in ultraviolet mutagenesis of repair-deficient xeroderma pigmentosum A cells*, *Cancer Res.*, **60**, 1729-1735 (2000).
- [12] LAWLEY, P.D., *Mutagens as carcinogens: development of current concepts*, *Mutat. Res.*, **213**, 3-25 (1989).
- [13] GOLLAPUDI, B. B., JACKSON, K. M. ve STOTT, W. T., *Hepatic lac I and cII mutation in transgenic (lambdaLIZ) rats treated with dimethylnitrosamine*, *Mutat. Res.*, **419**, 131-135 (1998).
- [14] ROBERTS, J.J., *The repair of DNA modified by cytotoxic mutagenic and carcinogenic chemicals*, *Adu. Radiat. Biol.*, **7**, 211-435 (1978).
- [15] LOEB, L.A. ve PRESTON, B.D., *Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites*, *Annu. Rev.Genet.*, **20**,201-230 (1986).
- [16] FRAM, R.J., *Cisplatin and platinum analogues: recent advances*, *Curr. Opin. Oncol.*, **4**, 1073-1079 (1992).
- [17] GASPORRO, F.P. ve FRESCO, J.R., *Ultraviolet-induced 8,8-adenine dehydroidimers in oligo-and polynucleotides*, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4239-4251 (1986).
- [18] AVERBECK, D., *Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism*, *Photochem. Photobiol.* , **50**,859-882 (1989).
- [19] SAGE, E., *Distribution and repair of photolesions in DNA genetic consequences and the role of sequence context*, *Photochem. Photobiol.*, **57**,163-174 (1993).
- [20] TOPAL, M., D., *DNA repair, oncogenes and carcinogenesis*, *Carcinogenesis*, **9**, 691-696 (1988).
- [21] FRIEDBERG, E.C., WALKER, G.C. ve SIEDE, W., *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C.,USA (1995).
- [22] SOWERS, L.C., SHAW, B.R., VEIGL. M.L. ve SEDWICK, W.D., *DNA base modification: ionized base pairs and mutagenesis*, *Mutat. Res.*, **177**, 201-218 (1987).



- [23] EMERIT, I., KHAN, S.H. ve CERUTTI, P., *Treatment of lymphocyte cultures with hypoxanthine-xanthine oxidase system induces the formation of transferable clastogenic material*, Free Radical Biol. Med., **1**, 51-57 (1985).
- [24] PORTER, T.D. ve COON, M.J., *Cytochrome P.450. Multiplicity of soforms, Substrates and catalytic and regulatory mechanisms*, J.Biol. Chem, **266**, 13469-13472 (1991).
- [25] SIVIKOVA, K. ve DIANOVSKY, J., *Genotoxic activity of the commercial herbicide containing bifeno in bovine peripheral lymphocytes*, Mutation research, Gen. Tox. Environ. Mut., **439**, 129-135 (1999).
- [26] ANDERS, M.W. ve DEKANT, W., *Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds*, Adv. Pharmacol. **27**, 511-519 (1994).
- [27] MILLER, J.A. ve SURH, Y.J., *Historical perspectives on conjugation dependent bioactivation of foreign compounds*, Adv. Pharmacol., **27**, 1-16 (1994).
- [28] HALL, M. ve GROVER, P.L., *Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation and tumour initiation, Chemical carcinogenesis and mutagenesis I (Ed: Cooper, C.S., Grover, P.L.)*, Springer-Verlag, KG, Berlin (1990).
- [29] GROOPMAN, J.D. ve CAIN, L.G., *Interactions of plant toxins with DNA: aflatoxins, sterigmacystin, safrole, cycasin and pyrrolizidine alkaloids, Chemical carcinogenesis and mutagenesis I (Ed: Cooper, C.S., Grover, P.L.)*, Springer-Verlag, KG, Berlin (1990).
- [30] GATEHOUSE, D.G., ROWLAND, I.R., WILCOX, P., CALLANDER, R.D. ve FOSTER, R., *Bacterial mutation assay, Basic mutagenicity Ukems recommended procedures (Ed: Kirkland, D.J.)*, The Bath Press, Avon, Great Britain, UK (1990).
- [31] KADLUBAR, F. F., HAMMONS, G.J., *The role of cytochrome P-450 in the metabolism of chemical carcinogens, Mammalian Cytochroms P-450, (Ed: Guengerich, F.P)*, CRC Press, Boca Raton, **2**, 81-130 (1987).
- [32] GUVEN, K., *Biyokimyasal ve moleküler toksikoloji*, Dicle üniversitesi basımevi, Diyarbakır (1999).
- [33] PLUTH, M.J., RAMSEY, M.J ve TUCKER, J.D., *Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies*, Mutat. Res., **465**, 101-111 (2000)

- [34] BERNARDINI, S., PELIN, K., PELTONEN, K., JARVENTAUS, H., HIRVONEN, A., NEAGU, C., SORSA, M. ve NORPPA, H., *Induction of sister chromatid exchange by 3,4-epoxybutane-1,2-diol in cultured human lymphocytes of different GSTT1 and GSTM1 genotypes*, Mutat. Res., **361**, 121-127 (1996).
- [35] GUENGERICH, F.P., *Metabolism and genotoxicity of dihaloalkenes, Cojugation- dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds (Ed: Ander, M.V., Dekant, W.)*, Academic Press, Inc., San Diego, California (1994).
- [36] TOROUS, D.K., DERTINGER, S.D., HALL, N.E. ve TOMETSKO, C.R., *An automated method for discriminating aneugen- vs. clastogen-induced micronuclei*, Environ. Mol. Mutagen., **31**, 340-344 (1998).
- [37] ]MIGLIORE, L., COCCHI, L., ROBERTO, S. ve SBRANA, I., *Induction of aneuploidy by antineoplastic drug estramustine in human lymphocytes*, Mutat. Res., **412**, 33-40 (1998).
- [38] RUSSELL, P.J., *Genetics*, The Benjamin-Cummings publishing company, inc., Canada, USA (1998).
- [39] SOBTI, R.C., BHARDWAJ, D.K. ve GRUPTA, B.D., *Spontaneous chromosomal aberrations in the peripheral blood lymphocytes of patients with cancer*, Med. Sci. Res., **19**, 23-25 (1991).
- [40] BOLZAN, A.D. ve BIANCHI, M.S., *Genotoxicity of streptonigrin: a review*, Mutat. Res., **488**, 25-37 (2000).
- [41] BOLSOVER, R.S., HYAMS, J.S., STEVE, J., SHEPHARD, E.A. ve WHITE, H.A., *From genes to cells*, Willey-Liss, Inc., New York, USA (1997).
- [42] SIMPSON, A.J., *The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis*, Adv. Cancer Res., **71**, 209-240 (1997).
- [43] ECKERT, K.A. ve OPRESKA, P.L., *DNA polymerase mutagenic bypass and proofreading of endogenous DNA lesions*, Mutat. Res., **424**, 221-236 (1999).
- [44] LEE, C. C., LIU, I. Y., LIN, J. K., CHU, J. S., SHEW, J. Y., *p53 point mutation enhanced by hepatic regeneration in aflatoxin B1-induced rat liver tumors and preneoplastic lesions*, Cancer lett., **125**, 1-7 (1998).
- [45] PERLOW, R.A. ve BROYDE, S., *Evading the proofreading machinery of a replicative DNA polymerase induction of a mutation by an enviromental carcinogen*, J. Mol. Biol., **309**, 519-536 (2001).

- [46] HANNA, M.G., NELSON, I.P., RAHMAN, S., LANE, R.J., LAND, J., HEALES, S., COOPER M., SCHAPIRA, A.H., MORGAN- HUGLES, J.A., WOOD, N.W., *Cytochrome c oxidase deficiency associated with the first stop-codon point mutation in human mtDNA*, Am.J.Hum.Genet., 63, 29-36(1998)
- [47] THOMA, F., *Light and dark in cromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair*, EMBO J., 18, 6585-6598 (1999).
- [48] CALLEJA, F., JANSEN, J.G., VRIELING, H., LAVAL, F. ve VANZEELAND, A. A., *Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of the rat N-alkylpurine-DNA glycosylase*, Mutat. Res. 425, 185-194 (1999).
- [49] THEIS, K., SKORVAGA, M., MACHIUS, M., NAKAGAWA, N., VANHOUTEN, B. ve KISKER, C., *The nucleotid excision repair protein UvrB, a helicase-like enzyme with a catch*, Mutat. Res., 460, 277-300 (2000).
- [50] MOL, C.D., HOSFIELD, D.J. ve TAINER, J.A., *Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means*, Mutat. Res., 460, 211-229 (2000).
- [51] GRZESIUK, E., GOZDEK, A. ve TUDEK, B., *Contribution of E. Coli AlkA, TagA glycosylases and UvrABC-excinuclease in MMS mutagenesis*, Mutat. Res., 480-481 (1-2), 77-84 (2001).
- [52] HOOGERVOST, E.M., and ed., *Nucleotide excision Repair and p53 deficient Mouse Models in Cancer Research*, Mut. Reser., 374, 3-21 (2005)
- [53] BRYANT, E.P., *Repair and Chromosomal Damage*, Radioterapy and Oncology,72, 251-256 (2004)
- [54] WEINERT, B.T., MIN, B., RIO, D.C., *P Element Exccision and Rapair by Non Homologous end Joining Occurs in Both G1 and G2 of the Cells Cycle*, DNA repair, 4, 171- 181 (2005)
- [55] GOETZ, J.D.M., *Reduced repair of DNA double-strand Breaks by Homologous Recombination In a DNA Ligase*, DNA repair, 4, 649-654 (2005)
- [56] ANDREW, S.E., BAROSS-FRANCIS, A., NARAYANAN, L., MILHAUSEN, K., LISKAY, R.M., JIRIK, F.R. ve GLAZER, P.M., *Mutagenesis in PMS2-and MSH2-deficient mice indicates differential*

- protection from transversions and frameshifts*, Carcinogenesis, **21**, 1291-1295 (2000).
- [57] MCKENZIE, G.J., HARRIS, R.S., LEE, P. L. ve ROSENBERG, S. M., *The SOS response regulates adaptive mutation*, Proc. Natl. Acad. Sci., **97**, 6646-6651 (2000).
- [58] FRIEDBERG, E.C. ve HANAWALT, P.C., *DNA repair: A laboratory manual of research procedures*, Markel Dekker, Inc., New York, USA (1988).
- [59] QUILLARDET, P. ve HOFNUNG, M., *The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assayfor genotoxins:procedures*, Mutat. Res., **147**, 65-78 (1985).
- [60] ODA, Y., NAKAMURA, S., OKI, I., KATO, T. ve SHINAGAUSA, H., *Evaluation of the new system (umu test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens*, Mut. Res., **147**, 219-229 (1985).
- [61] BARQUINERO, J.F., BARRIOS, L., CABALLIN, M.R., MIRO, R. ve RIBAS, A., *Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation*, Mutat. Res., **286**, 275-279 (1993).
- [62] FENDER, H. ve WOLF, G., *Cytogenetic investigations in employees from waste disposal sites*, Toxicology Letters, **96**, 149-154 (1998).
- [63] FENECH, M., *the in vitro micronucleus technique*, Mutation Research, Fund. Mol. Mec. Mut., **455**, 81-95 (2000).
- [64] ABOU-EISHA, A., CREUS, A. ve MARCOS, R., *Genetic evalvation of the antimicrobial drug, trimethoprim in cultured human lymphocytes*, Mutation Research, Gen. Tox. Environ. Mut., **440**, 157-162 (1999).
- [65] ALBANESI, T., POLANI, S., COZZI, R. ve PERTICONE, P., *DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells in vitro*, Mutat. Res., **429**, 239-248 (1998).
- [66] OSTLING, O. ve JOHANSON, K. J., *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **123**, 291-298 (1984).
- [67] OBERLY T, YOUNT D, GARRIOTT M: *A comparison of the soft agar and microtitre methodologies for the L5178Y TK+/- mouse lymphona assay;Mutation Resaerch 3888:59-66(1997)*

- [68] SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. ve SCHNEIDER, E.L., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Experimental Cell research, **175**, 184-191 (1988).
- [69] COLE, J. ve SKOPEK, T. R., *International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens, working paper 3, somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo*, Mut. Res. **304**, 33-106 (1994).
- [70] ALBERTINI, R.J., *HPRT mutation in humans: biomarkers for mechanistic studies*, Mut. Res., 489, pp1-16(2001)
- [71] PATEL, P.I., FRAMSON, P.E., C.T. CASKAY and A.C. CHINAULT, *Cell Biol.* **6** pp. 393–403(1986),.
- [72] GREGORIA, L.DE, JINNAH, H.A., HARRIS, J.C., NYHAN, W.L., SCHRETLEN, D.J., TROMLEY, M.L., O'NEILL, J.P., *Lesh- a female with a clinically normal monozygotic twin* Moleküler Genetics and Metabolism, 85, pp70-77(2005)
- [73] MICHELI, V., SETSINI, S., ROCCHIGANI, M., JACOMELLI, G., MANZONI, L.F., et *Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase deficiency and erythrocyte synthesis of pyridine coenzymes*, life Sciences, 64(26), pp2479-2487(1999)
- [74] NAKAGAWA, S., et al *Postnatal expression of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in the Mouse brain*, Enzyme Protein, 47(2), pp65-67(1993)
- [75] BELAND, A.F., FULLERTON, N.F., SMITH, B.A., *hprt lymphocyte mutant frequency in relation to DNA adduct formation in rats fed the hepatocarcinogen 2-acetylaminofluorene*, cancer let. 143 pp. 249-255(1999),
- [76] ALBERTINI, R.J., NICKLAS, J.A, FUSCOE, J.A., SKOPEK, T.R., BRANDA R.F, and J.P. O'Neill, *In vivo mutations in human blood cells: biomarkers for molecular epidemiology*. Environ. Health Perspect. **99** pp. 135–141(1993),
- [77] AIDOO, A., LYN-COOK, L.E., HEFLISH, R.H, MITTLSTAEDT R.A., and CASCIANO, D.A., *Induction of 6-thioguanine-resistant lymphocytes rats following in vivo exposure by N-ethyl-N-nitrosourea and cyclophosphamide*. Environ. Mol. Mutagen. **17**, pp. 141(1991)
- [78] HACKMAN, P., HOU, S., *Mutational spectra at the HPRT locus in T-lymphocytes of non smoking and smoking lung cancer patients*, Mutat. Res. 468 45-61(2000)

- [79] KEOHAVANG,P.,Xi, L.,DAY, R.D.,ZHANG, L., GRANT, S.G., DAY, B.W., NESS,R.B.,BİGBEE, W.L.,*HPRT gene alterations in umbilical cord blood T-lymphocytes in newborns of mothers exposed to tobacco smoke during pregnancy Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 572, pp 156-166(2005)*
- [80] HORİKAWA, K., *Frequent deection of T cells with mutations of the hypoxanthineguanine phosphoribosyl transferase gene in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Blood, 99, pp24-29 (2002)*
- [81] BRANDA,F.R., *Th effect of folate deficiency on the hprt mutational spectrum in Chinese hamster ovary cells treated with monofunctional alkylating agents, Mutat. Res.427 pp79-87 (1999),*
- [82] AIDOO,A., MİTTELSTAEDT,R.A., BİSHOP,M.E., *Effect of Caloric Restriction on hprt lymphocyte mutation in aging rats, Mutat. Res.527pp57-66(2003),*
- [83] DIAZ-LLERE, S., *Hydrogen peroxide induced mutations at the hprt locus in primary human T-lymphocytes, Mutat. Res., 469 (2000),pp51-61*
- [84] NOHYNEK, J.G., *An assment of the genotoxitiy and humanhealtj risk of topical use of kojic acid, Food and Chemical Toxicology,42,pp93-105 (2004)*
- [85] BAYTOP, T., *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İlaveli ikinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, (1999).*
- [86] STAMMATİ, A., BONSI, P.,*Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays, Food and chemical Toxicology,37,pp813-823 (1999).*
- [87] MÜHLBAUER, R.C, *Common herb, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism,Bone32,pp372-380(2003)*
- [88] ISMAN, B.M., *Plant Essantial Oils for Pest and Disease Management, 19, 603-608, (2000)*
- [89] FANG, F., SANG, S., *İsolation and identification of cytotoxic compounds from Bayleaf(laurus nobilis), Food Chemistry, 93, 497-501 (2005)*
- [90] PİNAROSA, A., FORTUNUTA, I.M., RUTA, C., *Glandular hairs and essential oils in micropro pageted plants of Salvia officinelis, Plant cience,169,29-36 (2005)*
- [91] LİMA, C.F., *Evaluation of toxic/protective effects of tje essential oil of Salvia officinalis on fresh isolated rat hepatocytes, Tokikoloji in vitro,18, pp457 (2004),*

- [92] ULTEE, A., GORRIS, L.M.G. AND SMİD, E.J., *Bakteridal activity of carvacrol towards the food- born pathojen Bacillus cereus. J. Appl. Microbiol*, 85, 211-218 (1998)
- [93] AYDIN, S., ÖZTÜRK, Y., BESİSİ, R, ve BASER, K.H.C., *Investigation of origanum onites, Sideritis congesta and saturaje cuneifolia oils for analgesic activity*, *Phytother. Res.* 10, 342-344(1996)
- [94] İPEK, E., TÜYLÜ, B.A., and ZEYTİNOĞLU, H., *Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures*, *Cytotechnology*, 43, 145-148 (2003)
- [95] ZEYTİNOĞLU, H., İNCESU, Z., and BASER, K.H.C., *The İnhibition of DNA synthesisi by carvacrol in fouse myoblast bearing a human N-res oncogene*, *Phytomedicine*, 10- 292-299 (2003)
- [96] YANİSHLREVA, N.V., MARİNOVA, E.M., GORDON, M.H., RANEVA, G.V., *Antioxidant and carvakrol in two lipid sytems*, *Food Chemistry*, 64,59-66 (1999)
- [97] JURGENS, V.R, DETHLEFSEN, U., STEİNKAMP, G., GİLLİSSEN, A., REBGES, R., VETER, H., *Antiinflamatory Activity of 1-8 cineol (eucalyptol) in Bronhial Asthmol a Double Blind Placebo Contralled Trial*, *Respiratory Medicine*, 97, 250-256 (2003)
- [98] VALERO, M., FRANCES, E., *Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit Bacillus cereus in carrot broth*,23(1), 68-73 (2006)
- [99] CAO J., YONG, L., *Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy*, *Mutat. Res.*50485-90(2002)
- [100] MİLOS, M., MASTELİC, J., *Chemical Composition and Antioxidant Effect of Glycosidically Band Volatile Compounds from Organo*, *Food Chemistry*, 71. 79-83 (2000)
- [101] SEKİZAWA, J., SHİBAMOTO, T., *Genotoxicity of safrole related chemicals in microbial test systems*, *Mutation Research*, 14, 405-408 (1982)
- [102] MÜLLER, L., KASPER, P., MÜLLER-TEGETHOLLF, K., PETR, T., *The genotoxic potential in vitro and in vivo of the allyl benzene etheric oils estagole, basil oil and trans-anethole*, *Mutation Research*, 325, 129-136 (1994)

- [103] AZİZAN, A., BLEVİNS, R.D., *Mutagenity and Antimutagenety Testing of 6 Chemicals Associated with the Pungent Propperties of Specific as Revealed by the Ames/salmonella/Microsomal Assay*, *Archieve of Environmental Contamination and Toxicology*, 28, 248-258 (1995)
- [104] GOMES-CARNEIRO, M.N, *Mutagenicity testing ofcampor, 1-8 cineole, citral, citronellal, menthol and terpinol with the salmpnelle/microsome assay*, *Mutat. Res.*416(),pp129-136 (1998)
- [105] LAZUTKA, J.R., *Replication Index in cultured human lymhocytes; metods for the statistical analysis and possible role in genetic toxicology*, *Environmental and Moleculer Mutagenesis*, 17, 188-185 (1991)
- [106] İPEK, E., ZEYTİNOĞLU, H., OKAY, S., TÜYLÜ, B.A., KURKCOĞLU, M., BASER, H.C., *Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oils ve carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test*, *Food Chemistry*, 93, 551-556 (2005)
- [107] AYDIN, S., BAŞARAN, A.A., BAŞARAN, N., *The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by heterocyclic amine IQ ve mitomycin C*, *Mutation Research*, 581, 43-53 (2005)