

**İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE SIĞLA AĞACI
(*Liquidambar orientalis*) BALZAMININ GENOTOKSİK VE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Bülent KARADENİZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2011

İstanbul, Türkiye

ONAYLAMA SAYFASI

Bu tezin şekil ve içerik açısından Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Yrd. Doç. Dr. Sevim IŞIK
Anabilim Dalı Başkanı

Biyoloji Anabilim Dalı 50230819 numaralı öğrencisi Bülent KARADENİZ tarafından hazırlanan bu tezin Yüksek Lisans Tezinde bulunması gereken yeterliliğe, kapsama ve niteliğe sahip olduğunu onaylıyorum.

Yrd. Doç. Dr. Lokman ALPSOY
Tez Danışmanı

Tez Sınavı Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Lokman ALPSOY

Yrd. Doç. Dr. İffet İrem UZONUR

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Serdal SAKÇALI

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Doç.Dr. Nurullah ARSLAN
Müdür

Mayıs 2011

İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE SIĞLA AĞACI (*Liquidambar orientalis*) BALZAMININ GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Bülent KARADENİZ

Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Mayıs 2011

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Lokman ALPSOY

ÖZET

Bu çalışmanın amacı *Liquidambar orientalis* bitkisinden elde edilen bir çeşit zambk olan Sığla balzamının hücre canlılığı ve genotoksisite üzerine etkilerini *in vitro* insan lenfosit hücrelerinde araştırmaktır. Sığla balzam ekstraktlarının (SE) genotoksik etkileri kardeş kromatid değişimi (KKD) test sistemi kullanılarak araştırıldı. Aynı zamanda SE'nin sitotoksik ve hücre çoğalması üzerine inhibe edici etkileri laktat dehidrogenaz (LDH) yöntemi ve hücre proliferasyon (WST-1) yöntemi ile değerlendirildi. Hücreler 1.6 ve 4.0 µg/mL SE konsantrasyonları ile muamele edilince KKD frekansı önemli derecede arttı. Bununla birlikte hücreler aynı SE konsantrasyonu ile muamele edildiğinde 24 ve 48. saatlerde hücre sayısı önemli derecede azaldı ve LDH miktarı 48. saatte önemli derecede arttı. Sonuçlar gösterdi ki SE alternatif bir antibakterial ve antipatojenik madde olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Liquidambar orientalis*, Sığla Balzam, Genotoksisite, Sitotoksisite, LDH, WST-1, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)

DETERMINATION OF GENOTOXİCİYT AND CYTOTOXİCİYT EFFECTS OF STORAX BALSAM (*Liquidambar orientalis*) İN HUMAN LYMPHOCYT CULTURE

Bülent KARADENİZ

Department of Biology
M.S. Thesis
May 2011

Supervisor: Assist. Prof. Lokman ALPSOY

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the effects of the storax balsam which is a kind of sweet gum obtained from the *Liquidambar orientalis* trees, on cell viability and genotoxicity in human lymphocyte in vitro. We studied the genotoxic effects of the extract of storax balsam (SE) by using sister chromatid exchange (SCE) test system. Also the cytotoxic and inhibitory effects on cell proliferation of SE were evaluated by using lactate *dehydrogenase* (LDH) assay and cell proliferation (WST-1) assay. The SCE frequency was increased when cells were treated with 1.6 and 4.0µg/ml SE concentrations ($p<0.05$). Moreover treatment of the cells with the same concentrations significantly depleted the cell number at 24th and 48th hours and elevated the *LDH* levels ($p<0.05$) at 48th hour. These results suggest that SE could be used as an alternative anti-bacterial and anti-pathogenic compound.

Keywords: *Liquidambar orientalis*, Storax balsam, Sığla tree, Genotoxicity, Cytotoxicity, LDH, WST-1, Sister Chromatid Exchange (SCE).

İTHAF

Eşim ve çocuklarıma...

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarıyla hep yanımda olan değerli hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Lokman ALPSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sığla balzaminin temininde yardımcı olan Sayın Yrd.Doç.Dr. Mehmet Serdal SAKÇALI'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma, Fatih Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından P50031005_2 proje numarası ile desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Fatih Üniversitesi yönetimine teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım sırasında dikkat ve beceri gerektiren deneylerimi yapmamda yardımcı olan Zeynep ÜLKER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, sabır ve anlayışlarıyla bana her zaman destek olan değerli eşim Hülya, çocuklarım Damla ve Derya'ya tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR SAYFASI.....	vi
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
 BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	 1
1.1 AMAÇ VE KAPSAM.....	1
1.1.1 Sığla Ağacının (<i>Liquidambar orientalis</i> Mill.) Yayılımı.....	2
1.1.2 Habitatı ve Özellikleri.....	4
1.1.3 Balzamın Elde Edilişi ve Özellikleri.....	5
1.1.4 Balzamın Ekonomik Değeri ve Sanayide Kullanımı.....	8
1.1.5 Geleneksel Tedavide Kullanım Alanları ve Kullanım Şekilleri.....	8
1.1.6 Antimikrobiyal ve Antifungal Aktiviteleri.....	10
1.1.7 İçerik Analizi ve Başlıca Komponentleri.....	11
1.1.8 Stiren ve Sınnamil Alkolün Özellikleri ve Etkileri.....	12
1.1.8.1 Stiren.....	12
1.1.8.2 Sınnamil Alkol.....	14
 BÖLÜM 2 KURAMSAL TEMELLER.....	 16
2.1 KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ (KKD).....	16
2.1.1 KKD Yöntemini Etkileyen Faktörler.....	17
2.1.1.1 Kültür Koşulları İle İlgili Faktörler.....	17
2.1.1.2 Biyolojik Faktörler.....	20
2.1.2 KKD Oluşum Mekanizması.....	22
2.2 LDH TESTİ.....	27
2.3 WST-1 TESTİ.....	28

BÖLÜM 3	MATERYAL ve METOD	30
3.1	KULLANILAN KİTLER ve KİMYASAL MADDELER	30
3.2	KULLANILAN ALET ve CİHAZLAR	30
3.3	KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	31
3.3.1	KKD Analizi İçin Yapılan Hazırlıklar	31
3.3.2	Lenfosit Besi Yerlerinin Hazırlanması ve Saklanması	33
3.3.3	Donör Seçimi	33
3.3.4	Deney Düzenekinin Oluşturulması	33
3.3.5	Lenfosit Kültürü	34
3.3.6	Floresan Plus Giemsa Tekniği İle Boyama	34
3.3.7	KKD sayımı	35
3.4	SİTOTOKSİSİTE (LDH) TESTİ ve HÜCRE ÇOĞALMASININ BELİRLENMESİ (WST-1) TESTİ	35
3.4.1	Lenfosit İzolasyonu	35
3.4.2	Ekstraktların Eklenmesi	36
3.4.3	Sitotoksosite Testi (LDH)	36
3.4.4	Hücre Proliferasyon Testi (WST-1)	36
3.5	İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER	37
BÖLÜM 4	ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1	ÖN ÇALIŞMA SONUÇLARI	38
4.2	KKD SONUÇLARI	39
4.3	LDH SONUÇLARI	42
4.4	WST-1 SONUÇLARI	43
BÖLÜM 5	TARTIŞMA ve SONUÇ	44
	TARTIŞMA	44
	SONUÇ	48
	REFERANSLAR	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİL 1.1.1 <i>Liquidambar</i> 'ın dünya üzerindeki yayılışı.....	2
ŞEKİL 1.1.2 Sığla ağacının Türkiye'deki yayılışı.....	3
ŞEKİL 1.1.3 Sığla ağacının yaprak çiçek ve tohum yapısı.....	5
ŞEKİL 1.1.4 Stiren ve stiren 7.8-oksitin yapısı.....	14
ŞEKİL 1.1.5 Sinnamil alkolün moleküler yapısı.....	15
ŞEKİL 2.1.2.1 Timidin ve BrdU'in halkasal yapısı.....	22
ŞEKİL 2.1.2.2 Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması.....	24
ŞEKİL 2.1.2.3 Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması.....	25
ŞEKİL 2.1.2.4 Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması.....	26
ŞEKİL 2.2.1 Tetrazolyum tuzunun formazan tuzuna dönüşmesi.....	28
ŞEKİL 2.3.1 Formazan tuzunun formazona dönüşmesi.....	29
ŞEKİL 3.3.7.1 KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterler.....	35
ŞEKİL 4.1.1 Ön çalışma lenfosit hücre çekirdeklerinin mikroskop görüntüleri.....	38
ŞEKİL 4.2.1 KKD frekansı üzerine SE'lerinin etkileri.....	40
ŞEKİL 4.2.2 Donör 1'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki KKD değişimi.....	40
ŞEKİL 4.2.3 Donör 2'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki KKD değişimi.....	41
ŞEKİL 4.2.4 Donör 3'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki KKD değişimi.....	41
ŞEKİL 4.3.1 LDH seviyesi üzerine SE'lerinin etkileri.....	42
ŞEKİL 4.4.1 Hücre çoğalması üzerine SE'lerinin etkisi.....	43

TABLÖLAR LİSTESİ

TABLO 1.1.1 <i>L. orientalis</i> 'in bilimsel sınıflandırılması.....	4
TABLO 1.1.2 <i>L. orientalis</i> ve balzâmı için kullanılan adlandırmaları.....	5
TABLO 1.1.3 Balzâmın gaz kromatografisine göre kimyasal içerik analizleri.....	13
TABLO 4.2.1 KKD frekansı üzerine SE'lerinin etkileri.....	39
TABLO 4.3.1 LDH seviyesi üzerine SE'lerinin etkileri.....	42
TABLO 4.4.1 SE'lerinin hücre çoğalması üzerine etkileri.....	43

KISALTMALAR LİSTESİ

BrdU	5-Bromo-2 deoksiüridin
PHA	Fitohemaglutinin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükeik asit
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
kg	Kilogram
ppm	Parts Per Million
SE	Sıgla Ekstraktı
SO	Stiren Oksit
3HdTh	3H-deoksi-Timidin
FDA	Food and Drug Administiration
IARC	Uluslar Arası Kanser Araştırma Ajansı
DOİ	Devlet Orman İşletmeleri
LDH	Laktat Dehidrogenaz
WST-1	Hücre Proliferasyon Testi
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 AMAÇ VE KAPSAM

Sığla ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.) ülkemizin güneybatı'sında Muğla ve Fethiye yöresinde endemik olarak yetişen bir türdür. *Liquidambar* cinsine ait dünyada 6 farklı tür tespit edilmiştir. Sığla ağacının Amerika ve Türkiye'deki türlerinden elde edilen balzam parfüm sanayisinde, kozmetikte ve geleneksel tedavide kullanılmaktadır. Sığla balzamu Mart ve Temmuz ayları arasında Sığla ağacı gövdesinin suni olarak yaralanması sonucu bu yaralı yerde biriken balzamin kazınarak toplanmasıyla elde edilir. Toplanan bu balzam kaynatılarak preslendikten sonra geride kalan koyu renkli sıvı Sığla yağı (balzamu) olarak adlandırılır. Yöresel tedavide halk arasında Sığla balzamu birçok amaç için kullanılmaktadır. Bunlar başlıca, antiseptik, yara iyileştirici, parazitlere karşı koruyucu, balgam söktürücü olarak, romatizma ağrılarını yatıştırıcı olarak, deri hastalıklarında, mide rahatsızlıklarında iyileştirici olarak kullanılmaktadır.

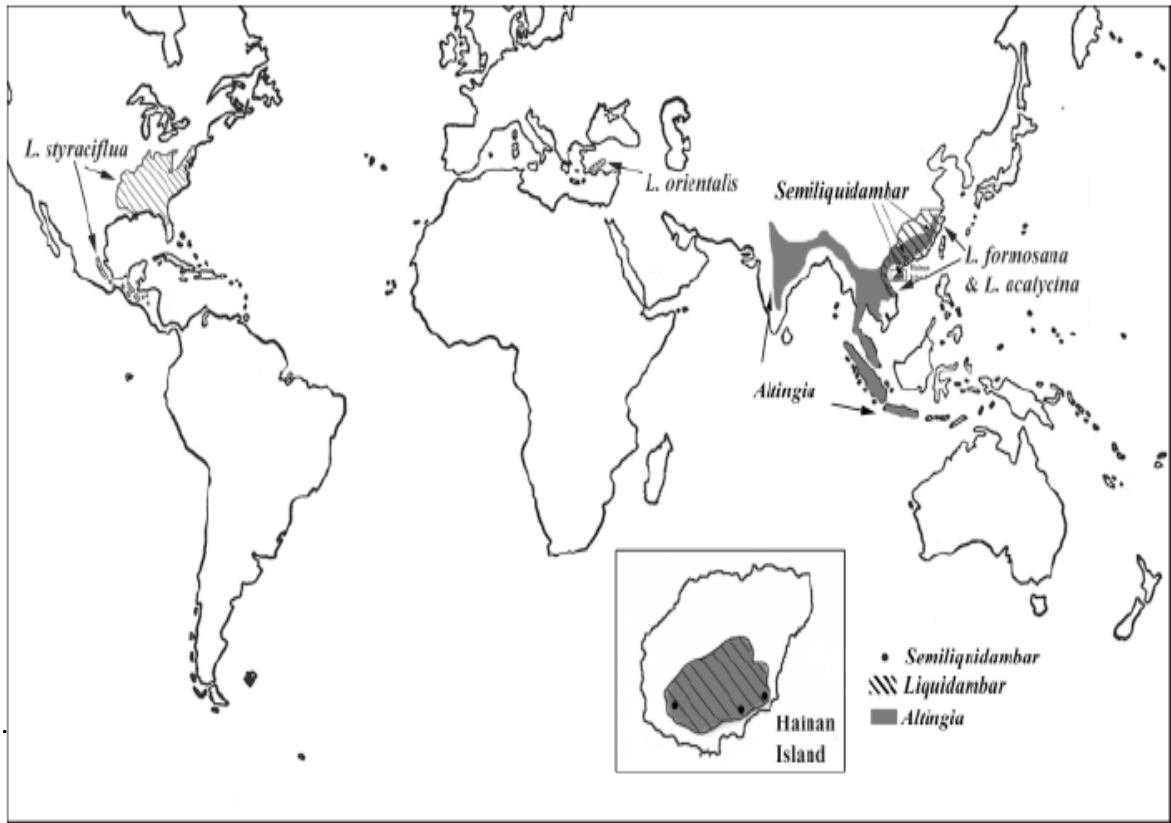
Sığla balzamu ile yapılan birçok çalışmada, balzamin antibiyotik, antifungal, antiparazit özelliği ile birlikte ana komponentlerinin toksik olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Literatürde, geleneksel tedavide, parfümeri ve kozmetik sanayisinde kullanılan Sığla balzaminin insan hücre kültürleri üzerinde etkilerinin araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada Sığla balzaminin insan lenfosit kültürleri üzerine genotoksik ve sitotoksik etkilerini Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve Hücre Proliferasyon (WST-1) Test yöntemlerini kullanarak araştırmayı amaçladık.

1.1.1 Sığla Ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) Yayılışı

Sığla ağacı (*L. orientalis*) Hamamelidaceae (Altingiaceae) familyasına ait Türkiye’de endemik bir türdür (Davis, 1982). Bu familyaya ait 6 farklı *Liquidambar* türü vardır. Bu türler; *Liquidambar orientalis* Türkiye’nin güney batısında, *Liquidambar styraciflua* Kuzey Amerika’nın doğu kısımlarında, *Liquidambar maccaphlla* Orta Amerika’da, *Liquidambar formosa* ve *Liquidambar rosthornii* Çin’de, *Liquidambar maximaviczii* Japonya’da yayılış gösterirler (Berkel, 1955).

Liquidambar cinsinin dünya üzerindeki yayılışı Şekil 1.1.1’de gösterilmiştir (Ickert-Bond et al., 2005).

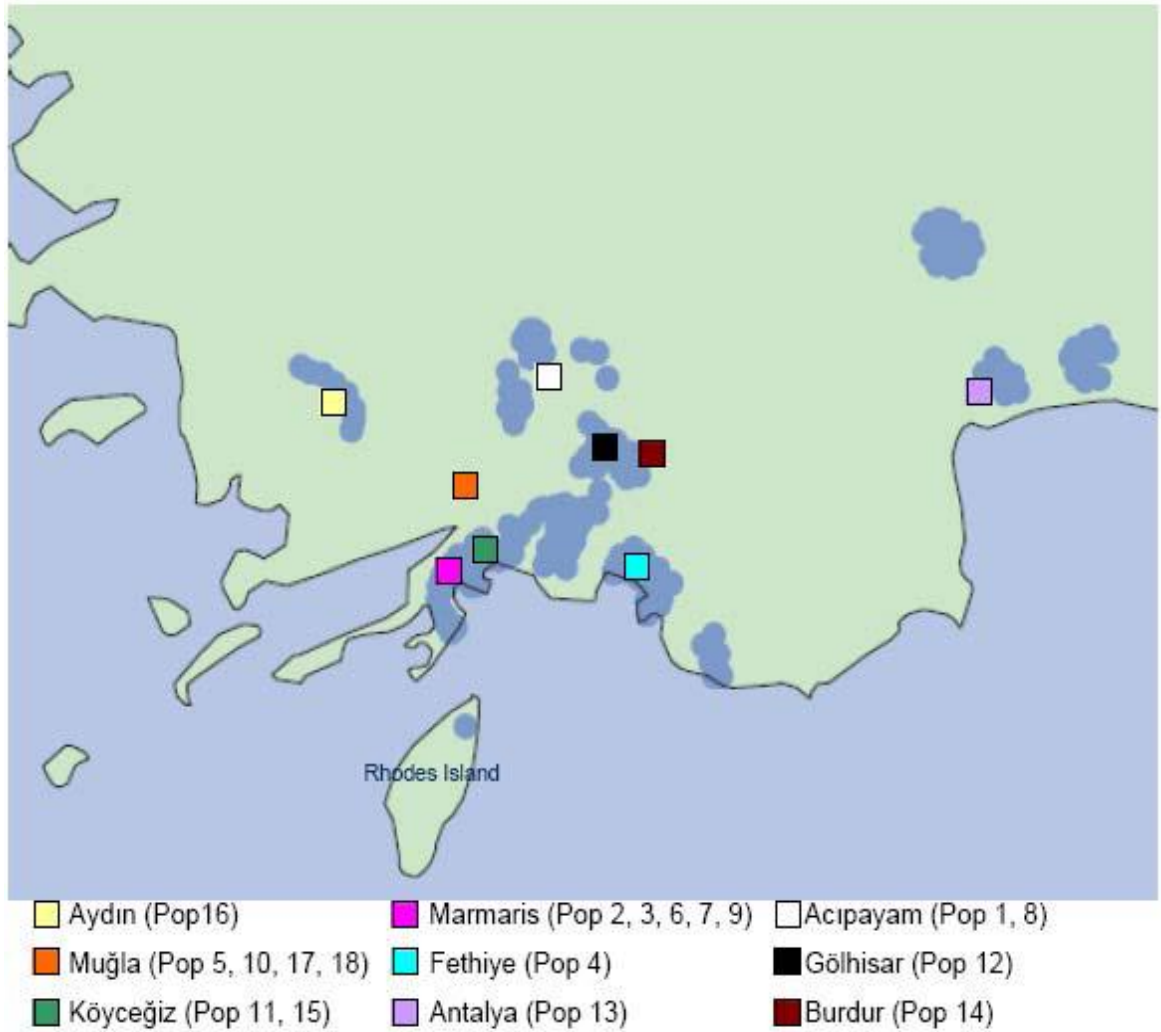


Şekil 1.1.1 *Liquidambar*’ın dünya üzerindeki yayılışı (Ickert-Bond et al., 2005)

L. orientalis, Günnük ağacı olarak da bilinir ve Türkiye’nin güneybatı kıyı bölgelerinde Antalya ve Isparta arasında uzanan Marmaris, Köyceğiz ve Çine-Bucak bölgesinde 100 ha alanı kaplayan lokal yayılıma sahiptir (Davis, 1982; Duru et al., 2002; Hill, 1952).

Tarım alanı açmak için Sığla ağaçlarının kesilmesi ve bilinçsiz işletmeler sebebi ile Muğla İli sınırları içerisindeki 20. yüzyılın başlarında 6321 hektarlık alanda yayılış gösteren Sığla ağacı popülasyonu, 1995 yılında 1337 hektara kadar gerilediği ifade edilmektedir (Akman, 1995).

Liquidambar ismi Latince Liquid (sıvı) ve Arapça amber (kokulu) sözcüklerinden türetilmiştir. Sığla ağacını Türkiye'deki yayılımı Şekil 1.1.2'de gösterilmiştir (Alan and Kaya, 2003). *L. orientalis*'in bilimsel sınıflandırılması Tablo 1.1.1'de gösterilmiştir (<http://www.eski.tubitak.gov.tr/tubives/index.php>, 2011). Türkiye'de *L. orientalis* türüne ait *L. orientalis* var. *orientalis*, *L. orientalis* var. *integribola* ve *L. orientalis* var. *suber* olmak üzere 3 farklı varyete mevcuttur (Efe, 1987).



Şekil 1.1.2 Sığla ağacının Türkiye'deki yayılışı (Alan, 2003).

Tablo 1.1.1 *L. orientalis*'in bilimsel sınıflandırılması

Bilimsel Sınıflandırma	
Alem	Plantae
Şube	Angiosperm
Sınıf	Eudicot
Takım	Saxifragales
Aile	Hamamelidaceae (Altingiaceae)
Cins	<i>Liquidambar</i>
Tür	<i>Liquidambar orientalis</i>

1.1.2 Habitatı ve Özellikleri

Sığla ağacının habitatı deniz seviyesindeki çok sulu dere kenarları ve taban suyunun yüksek olduğu ovalarda başlayıp 300-400 m yüksekliğe kadar yayılış göstermektedir. Çevresel şartlara bağlı olarak 20-35 m boya uzayabilen geniş yapraklı bir ağaçtır. 200-300 yıl yaşayabilmektedir. Çok nemli topraklarda ve bataklıklarda sık kök geliştirmekle birlikte kurak topraklarda ve yamaçlarda kazık kök geliştirmektedir (Berkel, 1955; Efe, 1986).

Sadece ülkemize özgü olan Sığla ağacının kabuk kısmı genç bireylerde çatlaksız, yaşlı bireylerde boyuna çatlaklıdır. Önceleri yeşilimsi olan genç sürgünler sonraları kırmızımsı-kahverengi olurlar. Yaprakları geniş yapraklı 5 loplu nadiren 3-7 loplu olabilmektedir. Loplar bazen yaprak ortasına kadar derin oyuntulu olabilmekte ve uçları küt ve sivri, kenarları kaba dişli olmaktadır. Yaprak üstü parlak yeşil, altı soluk mat renklidir. Yaprak sapları uzun ve hafiften oyukludur. İlkbaharda yaprakların açması ile birlikte yeşil renkli çiçekler oluşmaktadır. Erkek çiçek topuzları eksenin üst tarafında sık ve sapsız, alt tarafında ise seyrek ve saplı olarak yer alırlar. Dişi çiçekler ise uzun sapın ucunda topaç şeklinde aşağı sarkık konumludur. Meyveler ilk oluştuğunda yeşil renkli, olgun meyve kahve renklidir (Atay, 1985; Berkel, 1955; Efe, 1986; Köhler, 1887).



Şekil 1.1.3 Sığla ağacının yaprak çiçek ve tohum yapısı (Köhler, 1887).

1.1.3 Balzamın Elde Edilişi ve Özellikleri

Normal olarak Sığla ağacının odununda veya kabuğunda balzam kanallarına rastlanılmaz. Fakat ağacın gövdesi herhangi bir aletle veya doğal olarak yaralanması sonucunda yara çevresindeki yeni gelişen diri odun kısımlarında çok miktarda balzam kanalları oluşur. Bu kanalların etrafında salgı görevi yapan basit epitelyum hücreleri yer almaktadır. Salgılanan bu balzam ağacın gövdesinde oluşan yaranın iyileşmesinde rol oynar.

Balzamın elde ediliş süreci bahar mevsiminde yaprakların oluşması ile başlar, yaprak dökümüne kadar devam eder. Balzam üretimi sırasındaki işlemler aşağıdaki gibi sıralanır. Bitki ve balzamı için kullanılan diğer adları Tablo 1.1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.1.2 *L. orientalis* ve Balzamı İçin Kullanılan Adlandırmaları (Gül, 1986).

Bilimsel Adı	Bitki Adı	Balzam Adı	Kullanılan Kısım
<i>Liquidambar orientalis</i>	Sığla Ağacı Günnük Ağacı Buhur Ağacı Akamber Ağacı Asya Sığla Ağacı	Günnük Balzamu Sytrax Storax Sytrax liquids Oriental sweet gum Levant sytrax	Balzam

Ağaç seçimi: Üretim işlemi ilk önce ağaç seçimi ile başlar. Üretimin devam etmesi ve ağaçların zarar görmemesi için seçme işi dikkatli yapılır. Seçilen ağaçların gövdelerinin düz, çaplarının 10 cm'den küçük olmamasına dikkat edilir. Ayrıca bir defa yağ çıkarılma işlemi uygulanan ağaçlar 3-4 yıl dinlendirilir.

Kabuk sıyırma: Mart ayının son haftası seçilen ağaçların kabuk kısımları soyulur ve Nisan ayı boyunca bu şekilde beklenir.

Yaraların açılması: Mayıs ayı içinde ağaçlara gövdelerinden suni yaralar açılır. Bu işlem Mayıs ayı boyunca devam eder. Açılan yaraların uzunlukları, genişlikleri ve sayısı ağacın gövde çapına göre değişir.

Sur: Bu işlem yara açılmasından bir hafta sonra yaraların yüzeyinin kaşıkla sıyrılmasıdır.

Sur arkası: Sur işleminden sonra 15 gün beklenir ve yağ alma işlemi başlar. Bu ilk yağ alma işlemine sur arkası denir.

Sefer: Sur arkası işleminden sonra iki hafta sonra asıl yağ alma işlemi başlar ve bu işlem Temmuz ayı ortalarında başlayıp Ekim ayının sonuna kadar devam eder. Bu işleme sefer denir.

Karakap: Yaralardan sızan fazla balzam ağaç dibine kadar ilerler, hava koşullarının etkisiyle katılaşır, rengi çok değişir. Karakap bu balzamin Kasım ayı sonunda son ürün olarak toplanmasıdır.

Kapçıkların taşınması, depolanması: Damarlardan sızan yağlar kaşıklar yardımıyla yaralardan kazınarak toplanır, kazıma sonucu oluşan parçalar kapçık olarak ifade edilir ve kıl torbalara doldurulur, oradan da çuvallara boşaltılır. Bu çuvallar aynı gün pres yerine (döğen) götürülür. Sıkma işlemi iki gün uygulanır.

Kaynatma: Pres yerine getirilen balzam kabuk ve balzamin birbirinden ayrılması için kaynatılır. Bu işlemde su kullanılır, balzam suda 15 dakika kaynatılır.

Presleme (Sıkma): Bu işlem balzamın kambiyum dokusundan ve kabuklarından ayrılması için yapılan işlemlerin tümüne denir. Pres ünitesi 6 kısımdan oluşmaktadır. En son balzam havuz kısmında birirmektedir. Geriye kalan odunsu kısma ‘buhur’ denmektedir.

Dinlendirme: Bir ton kapasiteli havuz kısmında biriken balzam dinlendirilir. Burada yoğunluk farkından dolayı balzam ve su ayrılır. Su balzamdaki uzaklaştırılır.

Kaplara doldurma: Saflaşan balzam galvanizli kaplara doldurularak satışa sunulur.

Sığla balzamu üretim ve satışı Orman İşletmeleri ve özel işletmeler tarafından yapılmaktadır. Özel işletmelerin üretim yaptıkları miktar kesin olarak bilinmemektedir (Acar and İktüeren, 1987; Atay, 1985; Berkel, 1955; Hafizoğlu, 1982).

Sığla balzamının kendisine has bir kokusu ve acı bir tadı vardır (Baytop, 1984; Duru et al., 2002; Tyler et al., 1981). Yarı sıvı olan yağ yapışkandır, taze halde iken gri renklidir ve Sığla balzamının zamanla üst yüzeyi esmerleşir koyulaşır, saydam değildir, %2 oranında su içerir, içerisinde bir miktar küçük kabuk ve odun kıymı bulunur, sinamik asit miktarı %20’den az olmamalıdır ve sabunlaşma sayısı ise 160-200 arasında olmalıdır (TSE 85, 1963).

Sığla balzamu oda sıcaklığında hezanda çözünmez, suda ise çok az çözünür. İyi balzam fazla su içermemeli ve %60 etanolde çözünmelidir. Etanolde çözünmesinden sonra az miktarda çözünmeyen madde kalabilmektedir. Aseton ve eterde alkolden daha iyi çözünmektedir (Baytop, 1950; İstek, 1994).

Ticari olarak Sığla balzamu üretilen iki tip Sığla ağacı vardır; Asya Sığla ağacı *L.orientalis* ve Amerikan Sığla ağacı *L.styraciflua*. Bu iki türün yağlarının kimyasal içeriği benzerdir. Bununla birlikte ana bileşenlerinde önemli derecede farklılıklar vardır. Stiren yağların ikisinde de ana bileşendir ancak Asya Sığla’sında (%70.4) Amerikan Sığla’sından (%30.9) daha yüksektir. Diğer taraftan Amerikan Sığla’sında karyofilin daha fazladır. Sonuç olarak Asya Sığla’sını Amerikan Sığla’sından fazla miktardaki stiren ve az miktarda karyofilin bulundurması ile ayırt edebiliriz (Fernandez, 2005).

1.1.4 Balsamın Ekonomik Değeri ve Sanayide Kullanımı

Genel olarak Asya Sığla ağacı (*L.orientalis*) ve Amerikan Sığla ağacı (*L.styraciflua*)’ndan elde edilen balzam ticari olarak kullanılmaktadır (Fernandez, 2005). Sığla balzamu ülkemizin tekelinde bulunan ve doğal olarak sadece ülkemizde yetişen Sığla ağacı balzamından elde edilen bir üründür (İstek, 1994). Türkiye bu balzamu 1980’lere kadar Fransa, Almanya, İngiltere, ABD, Rusya, Belçika, Lüksemburg, İsviçre, İtalya, Polonya, Hollanda, Pakistan, Lübnan, Hindistan ve Kanada’ya ihraç ederken Sığla ağacı ormanlarının azalmasından dolayı 1987’den sonra sadece Almanya, Fransa, İngiltere, İsviçre, Belçika ve Lüksemburg’a ihraç edebilmiştir (İstek, 1994).

Devlet Orman İşletmeleri (D.O.İ.) tarafından yapılan bir çalışmada sadece D.O.İ. tarafından 1979-1990 yıllarına ait yaklaşık olarak toplam 120 ton Sığla balzamının üretildiği belirtilmiştir. Türkiye genelinde 1987-1992 yıllarına ait Sığla balzamu ihracatı yaklaşık 200 ton’un üzerinde olurken, bunun maddi değeri ise 2 milyon dolar’ın üzerinde olduğu belirtilmiştir (İstek, 1994).

Kozmetikte yaygın kullanıma sahip olan Sığla balzamu, parfümlerin hızlı buharlaşmasını engellemek için fiksatif olarak kullanılır (Duru et al., 2002; Hafizoğlu, 1982). Balsamın kullanım alanları arasında mikroskopi tekniğinde sabit preparat azırlanırken kullanılan sinnamik asit ve sinnamil alkol gibi kimyasal maddelerin elde edilmesi vardır (Guenther, 1952). Ayrıca Sığla balzamu sabunların sakız ve tütünlerin kokulandırılmasında kullanılmaktadır (Gül, 1986).

1.1.5 Geleneksel Tedavideki Kullanım Alanları ve Kullanım Şekli

Türkiye zengin bir bitki florasına sahiptir. Medikal bitkiler floranın önemli bir kısmını oluştururlar. Yaklaşık 10,000’ni bulan bu doğal medikal bitki türleri ülkemizin coğrafik yapısı ve iklim tipinden dolayı farklı dağılım gösterirler (Ates and Erdoğan, 2003; Baytop, 1999). Bu açıdan bakıldığında ülkemizdeki medikal bitkilerin yöresel olarak halk arasında çok farklı kullanım alanlarının ve kullanım şekillerinin olduğunu görmekteyiz. Sığla balzamında yöre halkı tarafından çok eski zamanlardan günümüze

kadar ve günümüzde de tıbbi tedavi başta olmak üzere değişik amaçlar için kullanıldığı bilinmektedir.

Sığla balzamu alındıktan sonra kalan odunsu kısım buhur olarak adlandırılır ve buhur eski çağlarda kiliselerde ve mabedlerde dini ayinlerde tütsü elde etmek için yakılmıştır. Bununla birlikte günümüzde insektisit ve parazit kovucu özeliğinden dolayı kiliselerde ortamdaki sinekleri uzaklaştırmak için buhur yakıldığı gözlenmiştir. Batık Fenike gemilerinden çıkan içinde Sığla balzamu bulunan amorflardan dolayı eskiden Akdeniz’de ticaretinin yapıldığı düşünülmektedir. Eski Mısırlılar mumyalama işleminde bu balzamu kullanmış hatta Kraliçe Kleopatra bu yağdan elde edilen maddeyi parfüm olarak kullanmıştır. Ayrıca Hipokrat döneminde iyileştirici etkisinden dolayı eski çağ hekimleri tarafından ilaç olarak kullanılmıştır (Top et al., 2007).

Halk arasında Sığla balzamu, balgam söktürücü ve astım, bronşit ve akciğer hastalıklarında kullanılmaktadır (Fıçıcıoğlu, 1988; Guenther, 1952). Sığla balzaminin yatıştırıcı ve analjezik özelliği olduğuna inanıldığından özellikle romatizma ağrılarını azaltmakta kullanılmıştır. Yine parazit kovucu özelliğinden dolayı mantar, uyuz gibi deri hastalıklarının tedavisinde de kullanılmıştır. Antibakteriyel ve skatrizan etkisi varsayılarak antiseptik ve yaraların iyileşmesinde pomat olarak kullanılmış, sünnet operasyonundan sonra, yaranın çabuk iyileşmesi için Sığla balzamu ve bal karışımı emdirilmiş bir bezi sünnet yarası üzerine sarmışlardır ayrıca dişetlerini güçlendirmek amacıyla ağızda çiğnenmiş, mide ülseri başta olmak üzere, mide hastalıklarında şekerle yada balla karıştırılarak kullanılmıştır (Aureli et al., 1992; Baytop, 1980; Bozkurt and Göker, 1986; Fıçıcıoğlu, 1988; Guenther, 1952).

Sığla balzamu anyon-kasyon içeriğinin zengin olmasından dolayı hemoroid tedavisinde kullanılabilmektedir (Gulec et al., 2009). Beyazıt (2009), tarafından yapılan ayrı bir çalışmada Sığla balzaminin tavşanlarda beyin felç parametreleri üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmış, bunun için Sığla ağacının %10’luk balzamından felçli hale getirilen tavşanlara 0.01, 0.03, 0.07 ve 0.90 mL’lik konsantrasyonlarda verilmiş ve gelişmeler 9 hafta boyunca takip edilmiştir. Felce neden olan hemorajik ve enbolik pıhtıların azaltılmasında balzamin önemli derecede etkili olduğu bulunmuştur (Beyazıt, 2009).

1.1.6 Antimikrobiyal ve Antifungal Aktiviteleri

Sığla balzamının farklı konsantrasyonlarının bazı bakteri türleri üzerinde kuvvetli antibakteriyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Balzamın antibakteriyal aktivitesinin çalışıldığı en kapsamlı çalışmalardan birinde; balzamın 10%’luk derişiminin *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı, %1’lik derişiminin *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* bakterilerine karşı, %0.4’lük derişiminin *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* bakterilerine karşı %0.2’lik derişiminin *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* bakterilerine karşı antibakteriyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanında %0.1’lik derişiminin ise bakterilerin üremesini engellemediği gösterilmiştir (Sağdıç et al., 2005).

Türkiye’de ki Sığla ağacı türünü de kapsayan 19 farklı bitki türü ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada 200 mg/mL’lık bitki ekstraktlarının nalidisik asit, penisilin G, novobiyoisin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklere direnç gösteren Gram + ve Gram – 14 bakteri türü ve 1 maya mantarının gelişimleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *Eucalyptus camuldulensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Ecballium elaterium*, *Liquidambar orientalis*, *Cornus sanguinea*, *Vitis vinifera*, *Inula viscosa*, *Hypericum perforatum* ve *Punica granatum* bitki ekstratlarının güçlü antibakteriyel etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. *L. orientalis* ekstraktı *Bacillus cereus* bakterisi ve *Candida albicans* maya mantarı dışındaki *Staphylococcus aureus*, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloaceae*, *Enterobacter aerogenes* gibi bakterilerinin gelişimlerini inhibe ettiği, Sığla balzamu geniş spekturumda antibakteriyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Oskay and Sarı, 2007).

Deri endüstirisinde antimikrobiyal olarak kullanılan %50 organa sülfür bileşikleri ile karşılaştırıldığında %1, %2 ve %5 Sığla balzaminin deriler üzerinde benzer antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Bayramoğlu, 2010).

L. orientalis balzaminin 28×10^{-3} mg/mL hava konsantrasyonun *Phytophthora cactorum*, *Cryphonectria parasitica* ve *Fusarium circinatum* bitkisel patojenlerine karşı antifungal etki gösterdiği, 17×10^{-3} mg/mL hava konsantrasyonun ise *P.cactorum* ve *F.circinatum* patojenlerine karşı etkili olduğu, 7×10^{-3} mg/mL, $3,5 \times 10^{-3}$ mg/mL hava konsantrasyonlarının ise sadece *P.cactorum* patojenine karşı etki gösterdiği belirlenmiştir (Lee et al., 2009).

Bir çeşit ağaç nematodu olan *Bursaphelenchus xylophilus* türüne karşı 28 bitkinin esansiyel yağları ile yapılan testler sonucunda coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) ve valerian (*Valeriana wallichii*) yağları 2 mg/mL konsantrasyonda %100 nematidisial aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Kim and Seo, 2008).

1.1.7 İçerik Analizleri ve Başlıca Komponentleri

Hafizoğlu ve arkadaşları tarafından gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi kullanılarak yapılan analiz sonucunda *L.orientalis*'in esansiyel yağ içeriğinde birçok bileşik belirlenmesine rağmen en fazla terpinen-4-ol, α -terpinol, sabinene ve γ -terpinene bulundu (Duru et al., 2002; Hafizoğlu et al., 1996).

İstek tarafından yapılan Sığla balzaminin uçucu gaz kromatografisi analiz çalışmaları sonucunda ise ana bileşenlerin stiren (%89.5), α -pinen (%7.2), kamfenen (%0.3), β -pinen (%1.1), sinnamil alkol (%0.3), limonen (%0.3), asetofenon (%0.2), p-etilfenol (%0.2), 3-fenil propanol (%0.2) olarak belirtilmiştir (İstek, 1994).

Diğer yandan Fernandez tarafından *L.orientalis* ve *L.styraciflua* balzaminini karşılaştırmak için yapılan başka bir çalışmada ise *L.orientalis* balzaminin kimyasal içerik analizinde ana bileşik maddesini stiren olarak belirtilirken, Kim ve arkadaşları yaptıkları kimyasal içerik analizinde ana bileşik maddesinin hidrosinnamil alkol ve

trans-sinamil alkol olduğunu belirtmişlerdir (Fernandez, 2005; Kim and Seo, 2008). İçerik analizleri Tablo 1.1.3'te gösterilmiştir.

1.1.8 Stiren ve Sinamil Alkolün Özellikleri ve Etkileri

1.1.8.1 Stiren

Stiren ilk kez 1827 yılında Bonastre tarafından Sığla balzaminin alkolik ekstraktlarının hazırlanması sırasında keşfedilmiştir (Tossavainen and Scand, 1978). Stirenin başlıca kullanım alanlarının arasında polistiren üretimi, bütadien-stiren lastik sanayisi ve sıkıştırılmış plastik sanayisi vardır (WHO, 1983). Başlıca stiren kaynakları etilbenzenin dehidrojenasyonu ile endüstriyel sentezidir. Bununla birlikte stiren çilek, buğday, fındık gibi birçok bitkide de bulunur. İnsanların stirene maruziyeti solunum ve temas yolu ile olur. Bununla birlikte paketlenme sırasında besinlere geçen stiren besinlerde bulunanla birlikte beslenme ile insanlara geçebilir. Ancak en fazla maruziyetin soluma ile olduğu belirlenmiştir. Soluma ile alınan stirenin %60-70 civarında olduğu belirlenmiştir (IARC, 1994).

Stiren hücrelere alındıktan sonra hücrelerde sitokrom P450 (CYP2E1) sistemi tarafından metabolize edilir (Şekil 1.1.4). Metabolize edildikten sonra oluşan stiren 7,8 –oksit (SO) elektrofilik özelliğinden dolayı makromoleküllere bağlanabilir ve DNA da tek zincir kırıklarına neden olur. Stirenin genotoksik etkisi elektrofilik ara ürün olan SO'dan kaynaklanmaktadır (Nakajima et al., 1994).

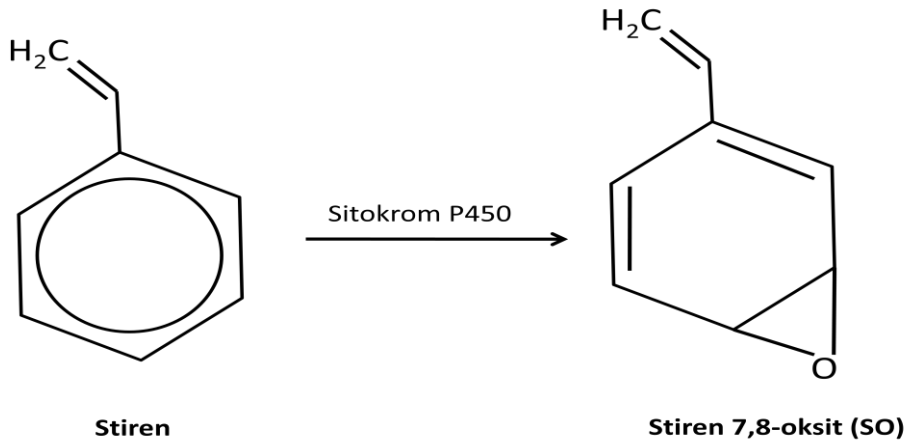
Uluslararası kanser araştırmaları ajansı (IARC) stireni deney hayvanları üzerindeki kanserojenik etkileri ile ilgili sınırlı sayıda veri olması ve insanlarda kanser oluşumunu sağladığı ile ilgili veri bulunmamasından dolayı 2B grubu kanserojen olarak sınıflandırmıştır (IARC 1994). Ancak SO'nin deney hayvanları üzerinde kanserojenik etkilere sahip olduğunu gösteren yeterli çalışma bulunduğundan dolayı 2A grubu kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. Yapılan çalışmalarda da stirenin DNA da kırıklara neden olduğu gösterilmiştir (IARC, 1994; Norppa and Sorsa, 1993).

İş yerlerinde stirene maruziyete bağlı olarak DNA kırıklarının bir göstergesi

Tablo1.1.3 Balzamin gaz kromatografisine göre kimyasal içerik analizleri *(Kim and Seo, 2008).** (Fernandez, 2005).

Numara	Madde *	Oran(%)	Numara	Madde **	Oran(%)
1	Styrene	70.4	1	Styrene	1.56
2	α - pinene	19	2	α - pinene	1.02
3	β - pinene	4.3	3	Benzaldehyde	0.47
4	Ethyl benzene	0.5	4	β - pinene	0.15
5	Camphene	0.7	5	Benzyl alcohol	1.22
6	Thuja-2,4(10)-diene	0.1	6	Acetophenone	0.19
7	Myrcene	0.4	7	1-phenyl-1-ethanol	0.17
8	α -Phellandrene	0.1	8	Hydrocinnamyl alcohol	41.13
9	β -Methylstyrene	0.2	9	Trans-cinnamyl aldehyde	0.24
10	<i>p</i> -Cymene	0.1	10	Trans-cinnamyl alcohol	45.07
11	Limonene	1.2	11	β - caryophyllene	3.6
12	Acetophenone	0.2			
13	γ -Terpinene	0.1			
14	Terpinolene	0.1			
15	3-Phenylpropanal	0.1			
16	<i>p</i> -Ethylphenol	0.2			
17	Terpinene-4-ol	0.1			
18	α -Terpineol	0.2			
19	Phenylpropylic alcohol	0.2			
20	Allyl phenol (chavicol)	0.1			
21	Cinnamic alcohol	0.3			
22	α -Longipinene	0.1			
23	Longifolene	0.1			
24	β -Caryophyllene	0.2			
25	α -Humulene	0.1			
26	Cadinene	0.1			
27	3-Phenylpropyl cinnamate	0.2			
28	Cinnamyl cinnamate	0.4			

olan kardeş kromatid değişiminin arttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Yager et al., 1993). Camurri ve arkadaşlarının (1982) yaptığı çalışmada 60 ppm'lik stirene maruz kalan işçilerde KKD üçkat artmıştır (Camurri 1982). Stiren ve SO'nun DNA zincirlerinde kırılmalara neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Somorovska ve arkadaşlarının (1999) 44 işçi üzerinde yaptığı çalışmalarda stirene maruziyet ile tek zincir DNA kırıkları arasında kuvvetli bir korelasyon olduğu belirtilmiştir (Somorovska 1999).



Şekil 1.1.4 Stiren ve stiren 7,8-oksitin yapısı

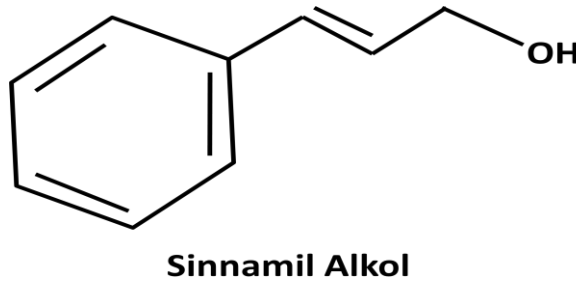
1.1.8.2 Sinnamil Alkol

Sinnamik asit ve sinnamil alkol (Şekil 1.1.5) güzel koku vericisi olarak kullanılmaktadırlar. USA da FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan 21, FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association) tarafından onaylanan 20 koku verici maddelerde sinnamil alkol, sinnamil asit maddeleri bulunmuştur. Bu koku verici maddelere tüketiciler kullanımlarına bağlı olarak maruz kalırlar (Belsito et al., 2007).

21 farklı sinnamil materyali ile yapılan toksite çalışmalarında bu maddelerin toksik etkileri değerlendirilmiştir. Bu maddelerden 20 tanesinde LD₅₀ değeri 5000 mg/kg'dan fazla olduğu, benzil sinnamat için ise 3000 mg/kg'ın toksik olmadığı

belirlenmiştir (Draize et al., 1948; Jenner et al., 1964; Powers et al., 1961; Zaitsev and Rakhmanina, 1974).

Chinese hamster ovary hücreleri üzerine KKD yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda sinnamil asetatın 1.00-100 μM 'lık dozunun, etil sinnamatın 3.3-10 μM 'lık dozunun ve metil sinnamatın 3.3, 10 ve 33.3 μM 'lık dozunun KKD frekansını artırmadığı belirlenmiştir (Sasaki et al., 1989). Ayrıca yapılan çalışmalarda sinnamil materyalinin kanserojenik etkilerine rastlanmamıştır (Belsito et al., 2007).



Şekil 1.1.5 Sinnamil alkolün molküler yapısı

BÖLÜM 2

KURAMSAL TEMELLER

2.1 KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ (KKD)

Canlılarda genotoksik değişimleri gösterebilmek ve bunları analiz edebilmek için birçok test sistemi geliştirilmiştir. Bu testler yardımıyla mutajenlerin canlı genom materyali üzerinde oluşturduğu hasarın oranı ve etkileri tespit edilebilmektedir. KKD bu test sistemlerinden en sık kullanılanlarından biridir. KKD DNA'nın replikasyonu sırasında metafaz kromozomlarında kromozomun morfolojisini değiştirmeden kardeş kromatidler arasında meydana gelen değişimdir. KKD testi çabuk sonuç alınabilen, güvenilir sonuç elde edilebilen basit ve duyarlı bir testtir.

İlk olarak Taylor, 1957 yılında, bitki (*Vicia faba* ve *Bellenalia romana*) mitotik kromozomlarında yaptığı otoradyografik çalışmalarda KKD'ni gözlemeyi başarmıştır. Kromozomların radyoaktif timidin (3 HdTh= 3H-deoksi-Timidin) varlığında birinci mitozda replikasyonuna izin verilmiş, ikinci replikasyon izotopsuz ortamda gerçekleştirilmiştir. DNA'nın semikonservatif replikasyonuna bağlı olarak otoradyografik yöntemle her kromozomun bir kromatidi işaretlenerek, kromozomların uzunlukları boyunca radyoaktif işaretlerin yer değiştirdikleri gözlenmiş ve Taylor bunları 'kardeş kromatid değişimi' olarak adlandırmıştır. Taylor ve arkadaşları tarafından geliştirilen KKD testi, kısa zamanda karsinogenite ve mutajenite testleri arasında duyarlılığı yüksek ve çok kabul gören bir test olmuştur (Taylor, 1958; Taylor et al., 1957). Mutajen ve karsinogen maddelerin KKD'yi arttırdığının belirlenmesinden sonra KKD uygulamaları geniş bir alanda kullanılmaya başlamıştır (Perry and Evans, 1975). KKD sitogenetikte oldukça yaygın kullanım sahasına sahip bir testtir (Öztürk, 1995).

KKD testi ile mutajenlerin toksik dozlarının altındaki dozlarda oluşan genetik hasarın kısa sürede hassas ve nicel olarak KKD analizi ile olabileceği anlaşılmıştır. Bunun yanında araştırmacılar bir madde mutajen etkisine sahipse kromozomlardaki

KKD'nin uyarılması arasında doğrusal bir ilişki olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bir madde mutajen değilse KKD'ni uyarmaması ile anlaşılabilir (Carrano et al., 1978).

KKD yöntemi ile çok düşük konsantrasyonlarda zayıf mutajenik etki gösteren kimyasalların etkileri kromozom düzeyinde incelenebilmektedir. KKD'nin gözlemlenebilmesi için hücrelerin mutlaka iki replikasyon zamanı geçirmesi gerekmektedir (Perry and Evans, 1975).

DNA ile kovalent bağlantılar yapan veya DNA tamir mekanizmalarını etkileyen maddeler genellikle KKD sıklığını arttırmaktadır. Bu maddeler DNA'ya kovalent bağlarla bağlanmakta veya DNA replikasyonunu etkilemektedirler. KKD, hasarlı DNA'nın replikasyonunun gerçekleştiği S fazında meydana gelmektedir (Latt and Schreck, 1980).

KKD'nin uyarılması sonucu ortaya çıkan artışlar uzun süre sonra yapılan kontrollerde KKD'deki artışın normale indiği tespit edilmiştir (İkbal et al., 2003).

2.1.1 KKD Yöntemini Etkileyen Faktörler

Fiziksel ve biyolojik faktörler olmak üzere iki bölümde incelenebilir (Das and Natarajan, 1988).

2.1.1.1 Kültür koşulları ile ilgili faktörler:

İn vitro koşullarda lenfositlerin büyümesi ile birlikte olan kültür faktörleridir ve bu faktörleri kontrol altına almak mümkündür (Erdem, 1997).

Besiyeri: Farklı besiyerlerinde üretilen insan lenfositlerinde farklı KKD sıklığı gözlenmiştir (Erdem, 1997).

Serum: Besiyerine eklenen serumun konsantrasyonu KKD oluşumunu etkiler (Erdem, 1997).

Mitoz uyarıcı: *In vitro* koşullarda mitotik ajanlar kullanılarak mitoz artırılabilir. Günümüzde kullanılan mitotik ajanlar; TPP (tüberkülin pürifiye protein), tetanoz ekstresi, konkanavalin A, PWM (Pokeweed mitojen) ve PHA (Fitohemaglutinin) olup en çok kullanılan PHA transformasyonunun gerçek işleyişi bilinmemekte ve indüksiyon süresinin sadece ilk 24 saatinde gereklidir. PHA, barbunya fasulyesi (*Phaseolus vulgaris*) ekstraktı olan bir mukopolisakkarittir. Kültürde 24 saatlik bir aradan sonra RNA sentezini artırır. İkinci 24 saat boyunca çekirdek genişlemekte ve DNA sentezi başlamaktadır. İlk mitoz 48. saatte gözlenir (Ceylaner, 1997).

Antibiyotik: Kültür ortamında antibiyotik bulunmaması KKD oranını azaltır. Kültür medyumundaki antibiyotik miktarının KKD oranını arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Das and Sharma, 1983; Erdem, 1997).

BrdU Konsantrasyonu: BrdU, toksik sınırlar dışında yüksek dozda hücre kültürüne eklenirse, mitotik indekste azalmalara ve KKD frekansında beklenenden daha fazla artışlara neden olmaktadır. BrdU konsantrasyonu %10 arttırıldığında KKD frekansının %50 kadar arttığı gösterilmiştir (Erdem, 1997). BrdU'in konsantrasyonu önemlidir. BrdU'in kendisi değişimleri başlatabilir, bu nedenle konsantrasyonunun sonuçları değiştirmeyecek düzeyde olması gerekir. Ancak, KKD tekniği için kromatitleri ayırt edilebilir hale getirecek kadar yüksek olması gereklidir (Barch, 1991).

Kültür ortamının sıcaklığı: En ideal ısı 37°C olup 36-38°C aralığına tahammül edilir. 39°C nin üzerindeki ısılarda kültürdeki hücreler ölür. Sıcaklığın geçici düşmesi hücreleri öldürmez ise de kültürleri duraklatarak hasat zamanında yeterli mitotik indeks eldesini önler ve preperatların kalitesini düşürür. Optimum sıcaklık 37°C olup bu sıcaklık 36-38°C aralığında da olabilmektedir. Sıcaklık 39°C' nin üzerine çıktığı zaman kültürdeki canlı hücre sayısı giderek azalmaktadır (Ceylaner, 1997; Pandita, 1983).

Karanlık ortam: Hücrelerin kültüre edildiği sürece florasan ışığa maruz kalmaları BrdU içeren DNA'nın fotolizine neden olarak hareketli alkali grupların oluşumuna neden olur. Bu oluşum Guanin ile reaksiyona girerek DNA'nın depurine olmasına ve bu da tek sarmalda kırılmalara neden olarak KKD oluşumunu indükler. Bu nedenle KKD analizi için kullanılacak kültürlerin ışıktan korunması gerekmektedir (Başaran, 1998). Görünür ışık BrdU içeren DNA'nın fotolizine neden olmaktadır bu

nedenle tüpler karanlıkta saklanmalıdır. S fazında görünür ışığa maruz kalındığı durumlarda ışığın yoğunluğuna ve maruz kalınma süresine bağlı olarak KKD oranında aşırı bir artış gözlenir, G2 fazında maruz kalınırsa bu KKD üzerinde etkisiz olur (Arnaudeau et al., 2001).

Kültür süresi: İlk mitoz 48. saatte gözlenir. Her 24 saatte bir mitoz dalgası gözlenir. Bu nedenle hasat 72. saatte veya 96. saatte yapılır. Rutin amaçlı, senkronize olmayan kültürlerde önerilen kültür süresi 72 saattir (Ceylaner, 1997).

Kolşisin konsantrasyonu: Senkronize olmayan kültürlerde 2 metafaz arasında bir blok oluşturmak için mitotik mekik inhibitörlerinin kullanılması gerekir, bunlar mekik liflerinin oluşmasını engeller. Bu mekik liflerinin görevi mitoz bölünmesinden önce sentromerleri aracılığı ile kendilerine bağlanan kromozomların kromatidlerini birbirinden ayırmaktır. Kolşisin mekik inhibitörlerinden biridir ve 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanır. Kolşisinde bırakma süresi ile metafaz indeksinin sayısı birbiri ile orantılıdır. Fakat uzun süre bırakmalarda kromozom boylarında kısalma gözlenir. Bu nedenle süre iyi ayarlanmalıdır (Ceylaner, 1997).

Hipotonik çözelti: Hipotonik çözeltilerde tuz yoğunluğu sitoplazmik tuz yoğunluğundan daha düşük olduğundan çözelti içindeki su hücre zarını aşır hücreye girer, hücreyi şişirir ve eritrositlerin çoğunu patlatır. Hipotonik uygulanması kritik bir zamanlama gerektirir. Kolşisinin etkisini sonlandırıp kromozomların dağılmasını sağlar. Hipotonik çözelti olarak; %1 sodyum sitrat veya 0.075 M KCl kullanılabilir. Kromozomlarda en az hasar yaptığından en çok kullanılan hipotonik çözelti KCl'dür (Ceylaner, 1997).

Fiksasyon: Kromozom preparatlarında fiksasyon amacı ile taze hazırlanmış 3:1 oranında alkol ve glacial asetik asit kullanılır. Oranın değişmesi kromozom morfolojisini olumsuz yönde etkiler. Asetik asitin bu orandan fazla olması erken hücre zarı yırtılmasına neden olur. Bu da kromozom kayıplarına yol açar. Tam kan kültürlerini ilk fiksasyon sırasında sürekli karıştırmak gerekir. İlk fiksasyonla ortamda geriye kalan eritrositler hemoliz olur. Kırmızı renkli hemoglobin koyu kahve renkli hematine döner. Yeterli karıştırma yapılmamışsa, koyukahve renkli çökeltiler gözlenirken mitotik indeks düşer ve kalitesiz preparatlar elde edilir (Ceylaner, 1997).

Kanın çalışma zamanı: Alınan kanların 24 saat içerisinde çalışılması önerilmiştir (Helleday, 2003).

2.1.1.2 Biyolojik Faktörler:

Sağlıklı insanlarda da belirli düzeyde KKD frekansı görülmektedir. KKD'nin insan lenfositlerinde görülme sıklığı kişiden kişiye, bireyin yaşına, cinsiyetine, sigara kullanma durumuna, yaşam biçimine, çalıştığı meslek durumuna bağlı olarak yükseldiği gösterilmiştir (Latt and Schreck, 1980). Bireylerin genotipleriyle birlikte, genel sağlık durumları veya yaşam tarzı ile ilgili olup genellikle hafifletilemez. Çalışmanın sonunda istatistiksel analizlerde belirtilmelidir (Erdem, 1997).

Sigara kullanımı: KKD sıklığını büyük oranda etkiler. Sigara içenlerde KKD sıklığının arttığı kanıtlanmıştır. Barale ve arkadaşlarının (1998), 1650 kişi üzerinde yaptığı çalışmada, sigaranın KKD üzerindeki etkisinin günde içilen sigara sayısı ile doğru orantılı olduğu ve günde içilen en az 1-10 sigara ile KKD'nin %7.3 arttığı bulunmuştur. Hiç sigara içmeyenlerin KKD oranı 7.54 iken, daha önce içip bırakanların ki 8.09, sürekli içenlerinki ise 8.45'dir. Daha önce içip bırakanların ortalama KKD değerleri sigarayı bırakma zamanları ile doğru orantılı olarak azalır ve 8 sene içinde hiç sigara içmemişlerin ortalama değerlerine ulaşır. KKD'nin düşüş zamanı daha önce içtiği sigara sayısı ile ters orantılıdır (Barale et al., 1998).

Sigara içenlere göre içmeyenlerde KKD frekansının daha yüksek olduğunu belirleyerek sigaranın geneotoksik etkisini ortaya çıkarmışlardır (Akbas et al., 2001). Kronik alkoliklerde lipid peroksidasyonu ve serbest radikal artışına bağlı olarak KKD sıklığında artış bildirilmiştir (Popp et al., 1994).

Cinsiyet: Cinsiyete göre KKD frekansının değiştiği konusunda genelde araştırmacılar aynı görüşte olup dişilerde daha yüksek olduğunu gözlediler. Özellikle 10-14 yaşlarında dişilerde gözlenen KKD frekansındaki fazlalığın o dönemde salgılanan hormonlardan kaynaklanabileceğini bildirdiler. Spontan KKD oranı kızlarda 3.8-10.33, erkeklerde 3.7-8.7 arasında olduğu saptanmıştır. Ayrıca kadınlarda KKD'nin menstrasyon sonunda maksimuma ulaştığı, ovulasyon süresince en aza indiği

gözlenmiştir (Tanrıverdi, 1991). Biyoretim ve hormonal faktörler nedeniyle bayanlarda ve erkeklerde farklı KKD oranları görülmektedir (Hill and Wolff, 1982).

Yaş: KKD sıklığında yaşın bir etkisi olmadığı şeklinde çalışmalar (Atmaca et al., 2004) yanında, çocuklarda KKD sıklığının yetişkinlere göre daha az olduğunu gösteren yayınlarda vardır (Barale et al., 1998).

Genetik faktörler: İnsanlar arasındaki farklılıkların genetik faktörlere bağlı olup olmadığını belirlemek için birçok araştırmacı tek yumurta ve çift yumurta ikizlerden lenfosit kültürlerinde KKD düzeylerini araştırmışlardır. Pedersen ve arkadaşlarının (1979), yaptıkları bir çalışmada 11 tek yumurta ve 9 çift yumurta ikiz bireylerden aldıkları kan örneklerinden KKD çalışmışlar ve genetik faktörlerin KKD sıklığı ve kromozomlara dağılımı üzerine önemli rol oynamadığını göstermişlerdir (Pedersen et al., 1979). Tek yumurta ve çift yumurta ikiz bireylerde KKD çalışılmış ve genetik faktörlerin KKD sıklığı ve kromozomlara dağılımı üzerine önemli rol oynamadığını gösterilmiştir (Arnaudeau et al., 2001).

Diyet: Kronik alkoliklerde KKD sıklığında artış bildirilmiştir (Erdem, 1997).

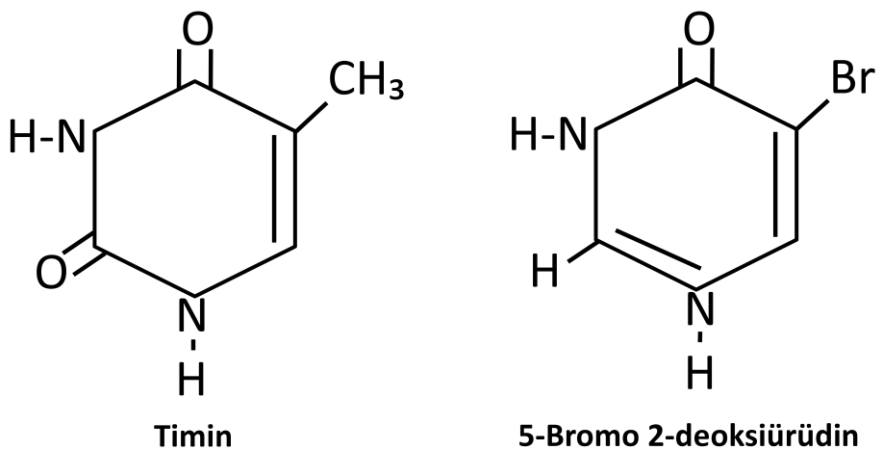
İlaç kullanımı: Adrinamisinin KKD'yi önemli oranda artırdığı Down sendromlu hastalarda yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır (Gadhia et al., 1991). Oral kontraseptifler dahil pek çok ilacın KKD sıklığını tetiklediği bilinmektedir (Erdem, 1997). Hamilelik sırasında klastojenik ajan olan siklofosfamide maruz kalınması durumunda uterus ve anne kemik iliğinde KKD sıklığında artış tespit edilmiştir (Latt and Schreck, 1980). Tıpta sıklıkla kullanılmakta olan; 2-Benzilbenzimidazolhidroklorid, difenhidramin, kafein, sodyum benzoat, magnezyum sülfat ve prosain kullanımında KKD sıklığı artmaktadır (Debova, 1981).

Hastalık: Enfeksiyon, radyasyon, kimyasallar ve virüsler de neden olabilmektedir (Garret et al., 1986). Çocuklarda şiddetli protein kalori eksikliği varlığında KKD sıklığının arttığı gösterilmiştir (Erdem, 1997). Ayrıca, Cockayne sendromu (Zanzoni et al., 1979), Werner sendromu, Duchenne ve Becker Musküler Distrofi, Kronik myeloid lösemi (Stoll et al., 1982) ve Down sendromlu hastalarda KKD sıklığının anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (Shubber et al., 1991).

Diğer: Tarım alanında çalışıp pestisite maruz kalan insanlarla, maruz kalmayan insanlara göre KKD freknsasının daha yüksek olduğunu yapılan çalışmalar göstermiştir (De Ferrari et al., 1991).

2.1.2 Kardeş Kromatid Değişimi Oluşum Mekanizması

KKD'nin oluş mekanizması tam olarak bilinmemesinin yanında değişik modeller öne sürülmüştür. Loveday ve Latt'ın öne sürdüğü modele göre her bir DNA'da tek zincir kırığı oluşmakta ve çiftlerden birindeki bir zincir ile karşı DNA'nın tamamlayıcı zinciri arasında meydana gelmektedir. Kalıp DNA'dan timidin yerine 5-bromodeoksiüridine (BrdU) alınarak komplementer DNA zinciri sentezlenmektedir (Sekil 2.1.2.2).



Şekil 2.1.2.1 Timidin ve BrdU'in halkasal yapısı

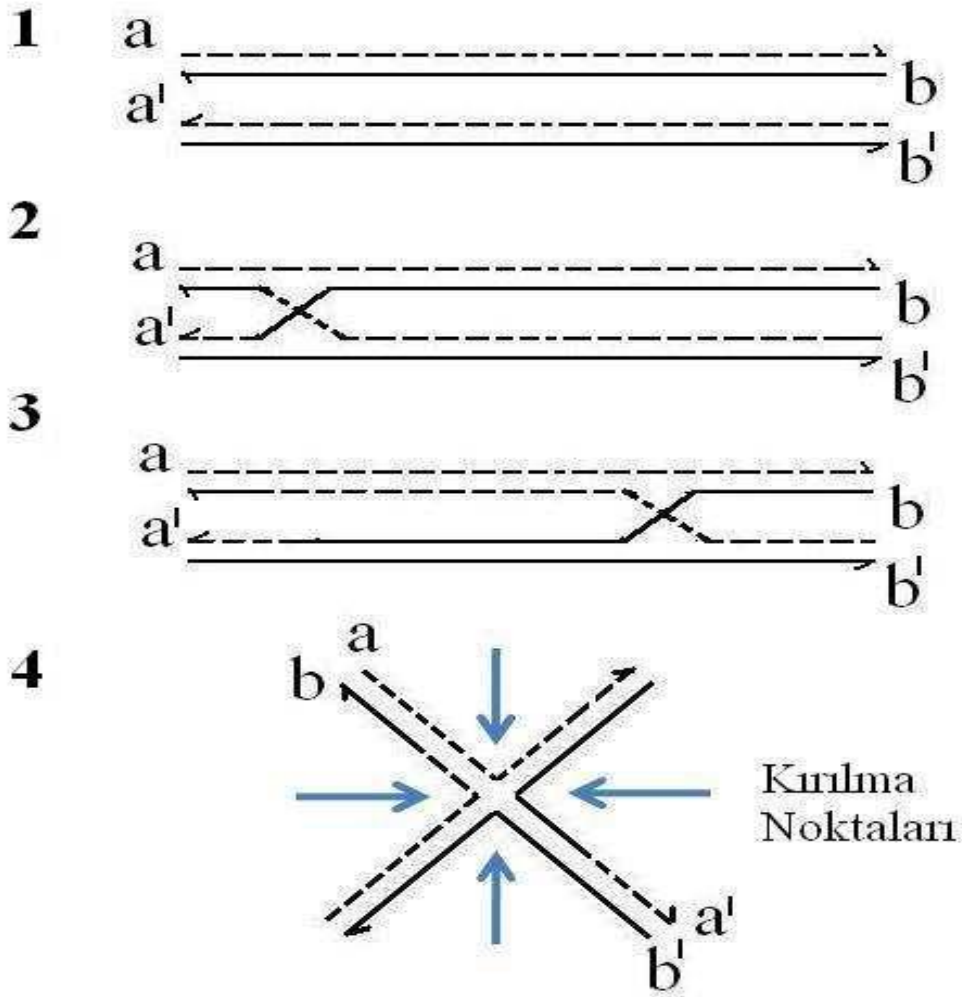
BrdU'nin yeni sentez edilen DNA'ya girmesi, takip eden ilk S fazı sırasında olmaktadır. *In vitro* ortamda BrdU varlığında hücre bölünme safhalarına göre BrdU ile değişik bağlanma şekilleri gösterir (Sinha et al., 1985). Replikasyon sırasında timin yerine BrdU'ni alan zincir, diğer DNA sentezi sırasında replike olur (Rodriguez-Reyes and Morales-Ramirez, 2003). Timidin analogu olan BrdU, replikasyon sırasında DNA'ya girer ve timidin'deki metil grubunun yerini Brom atomunun almasıyla DNA molekülünde oluşan bir seri fizikokimyasal değişiklikler sonucu, ikincil yapıların şekillenmesinde güçlükler neden olur.

Bu durum BrdU'nin çift sarmal DNA yapısına girmesinin kromozom spirilizasyonunu geciktirdiğini ve çok küçük morfolojik değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir. Zakharov ve Egolina'nın 'Spirilizasyon gecikmesi' olarak tanımladıkları bu olayda, spirilizasyondaki bu gecikmenin, BrdU varlığına ve yoğunluğuna, bu ajanın hangi fazda kromozom yapısına girdiğine ve mitozlar arasındaki zaman süresine bağlı olduğunu bildirmektedir (Zakharov and Egolina, 1972). Kromatidlerdeki bu uzunluk farkı, protein ile BrdU içeren DNA arasındaki etkileşimin farklı olması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Proteinler, kromozomların kondensasyonunda ve spirilizasyonunda etkili olmaktadır. Proteinler BrdU içeren DNA'ya, BrdU içermeyen DNA'dan daha sıkı bağlanmakta ve kromozomların spirilizasyonunu ve yoğunlaşmasını zorlaştırmaktadır. Bazı araştırmacılar, BrdU'nin kromozomlardaki esas etkisinin paketlenme esnasında olabileceğini açıklamıştır (Başaran, 1998). Kromozom morfolojisindeki bu farklılıklar DNA replikasyonunda farklılığa ve belki de genetik aktivitede değişikliklere neden olabilir (Zakharov and Egolina, 1972).

Oluşan rekombinant heterodubleks uçlar, sentezin ilerlemesiyle uzamaktadır. DNA molekülünün kırılma ve tekrar tamir edilme noktası etrafındaki rotasyonu ile X formasyonu meydana gelmektedir. Bu yapıdaki çentiklerin oluşması ve bunların ligazla birleştirilmesi sonucu her iki zincirde BrdU ve her iki zincirde timin içeren iki rekombinant yapı oluşmaktadır (Şekil 2.1.2.2 ve Şekil 2.1.2.3). Bu yapılar farklı boyanarak KKD'lerin görünür hale gelmesini sağlar (Latt and Schreck 1980).

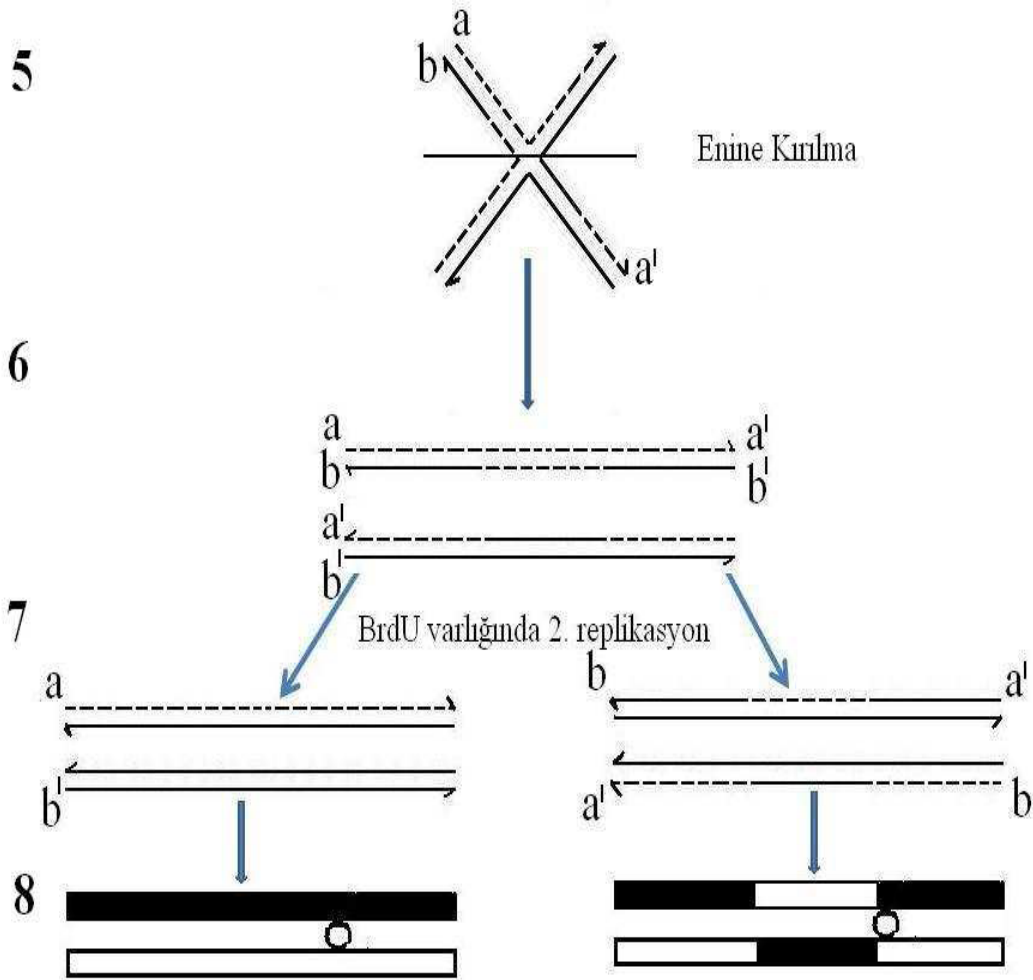
Kısaca bu yöntemde timidin bazının analogu olan BrdU replikasyonu aksatmadan DNA'nın yapısına girer. BrdU mevcudiyetinde, replikasyonun ilk siklusunda iki kardeş kromatidden yalnızca birisi BrdU içerir, diğeri içermez. BrdU'nin timinin yerine girdiği kromatidde boya bağlama kapasitesi azalmıştır. Giemsa ile boyanınca ayrı fiziko-kimyasal özellikler taşıyan BrdU ve timidin içeren DNA bölgeleri farklı affinite gösterdiğinden, iki kardeş kromatidden BrdU içeren DNA bölgeleri daha az ve daha açık tonda boyanmasıyla kardeş kromatidlerin ayrılması mümkün olmaktadır (Zakharov *et al*, 1974). Latt floresan bir boya olan Hoechst-33258 ile insan kromozomlarında kardeş kromatidlerin farklı tonlarda boyandığını göstermiştir (Allen and Latt 1976).

Sonuçta BrdU'li kromatid Giemsa ile açık boyanırken, kardeş kromatidi koyu boyanmış olarak görülecektir.



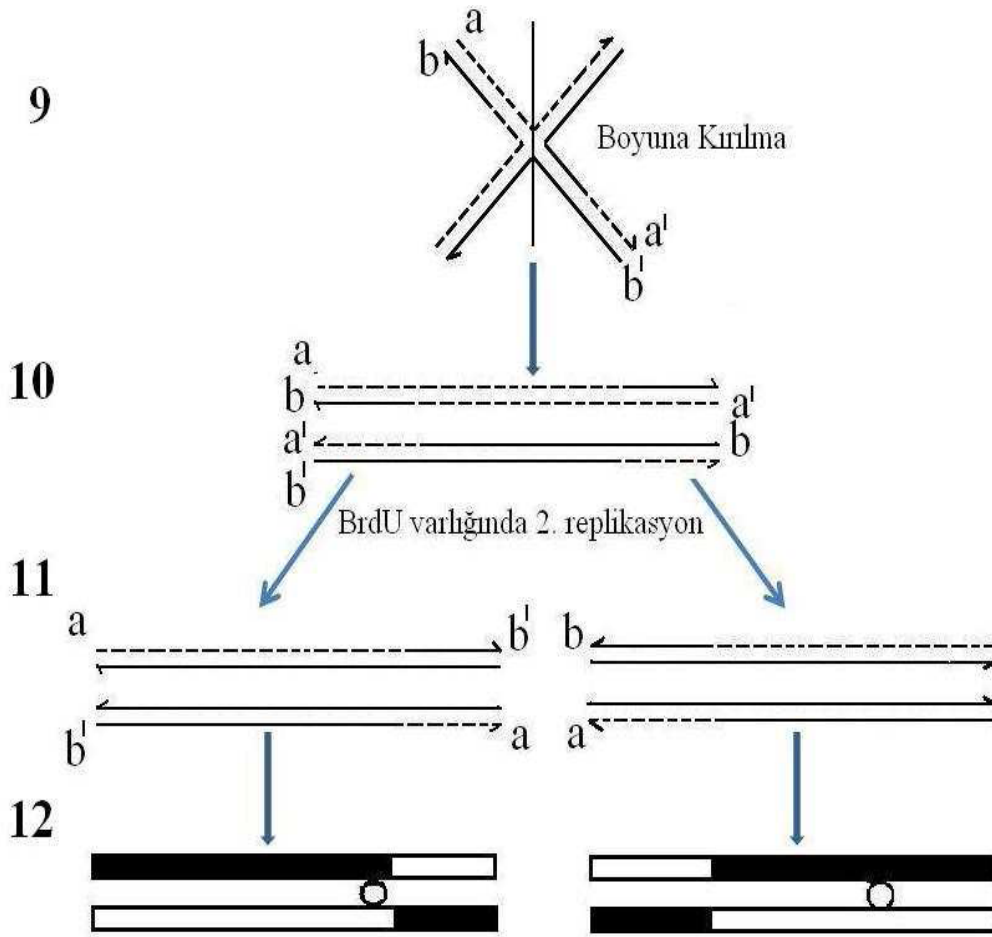
Şekil 2.1.2.2 Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizma

- 1- Timin içeren kalıp DNA Timin yerine BrdU alınarak sentezlenen koplementer DNA,
- 2- Her bir dublekste tek zincir kırığı oluşması ve zincirlerin krosing-over sonucu kardeş DNA dubleksinin zinciri ile birleşmesi,
- 3- Sentezin ilerlemesi ile timin ve BrdU içeren heterodubleks zincirlerin oluşması,
- 4- Molekölün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile X formunun meydana gelmesi,



Şekil 2.1.2.3 Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması

- 5- Molekülün Krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile oluşan X formunda enine kırılma meydana gelmesi,
- 6- Krosing-over noktasında kırılmalarla oluşan kırık parçaların birbirleri ile değil de kardeşlerinin parçaları ile birleştirilmesi sonucu aynı dubleks üzerinde timin, diğerinde BrdU içeren bölgelerin oluşması,
- 7- Ortamda BrdU mevcutken 2. replikasyonun geçirilmesi ve sadece BrdU içeren komplementer zincirlerin sentezlenmesi,
- 8- Her iki zincirinde BrdU içeren bölgelerin soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğerinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması sonucu KKD gözlenmesi bu mekanizmanın esasını oluşturmaktadır.



Şekil 2.1.2.4 Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması

- 9- Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile oluşan X formunda boyuna kırılma meydana gelmesi,
- 10- Krosing-over noktasında kırılmalarla oluşan kırık parçaların birbirleri ile değil de kardeşlerinin parçaları ile birleştirilmesi sonucu aynı dubleks üzerinde timin, diğerinde BrdU içeren bölgelerin oluşması,
- 11- Ortamda BrdU mevcutken 2. replikasyonun geçirilmesi ve sadece BrdU içeren komplementer zincirlerin sentezlenmesi,
- 12- Her iki zincirinde BrdU içeren bölgelerin soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğerinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması sonucu KKD gözlenmesi bu mekanizmanın esasını oluşturmaktadır.

KKD oluşum yerleri aktif replikon veya replikon kümeleri (cluster) ile ilişkilidir. KKD, tahminen aynı kromatid üzerindeki homolog yerde bulunan DNA replikon ürünlerinin intrakromozomal alışverişidir. KKD'ni oluşturan replikon kümeleri 10-100'er adetlik DNA replikasyon ünitelerinden (replikonlardan) oluşur. Bu

replikonların her biri 100 kilobaz (1 kilobaz=1.000 bazlık DNA segmenti) uzunluğundadır (İkbal *et al.* 2003). Böylece bir clusterin büyüklüğü 1–10 megabaz (1 megabaz=1.000.000 baz) olarak hesaplanabilir, bu da yaklaşık olarak yüksek rezolusyonlu bir kromozom bandındaki DNA miktarına eşittir. Bu durumda clusterler ışık mikroskobu ile görülebilecek büyüklüğe ulaşmış olurlar (İkbal *et al.* 2003). Boya replikasyon kümeleri arasındaki birleşme çizgileri, KKD formasyonuna eğilimli kararsız yerler olduğunu belirtmektedir. DNA hasarları replikon kümelerindeki replikasyon çatalında bir engel oluşturarak o segmentte replikasyonu durdurabilir. Replikasyonun iki yöne doğru ilerlediği düşünülürse yeni sentezlenmiş bir segmentle eski bir segment uç uca gelebilir ve KKD gerçekleşebilir. Bu tür bileşimlere DNA'daki çift zincir kırıkları da neden olabilir, bunlar da KKD oluşumuna yol açar (İkbal *et al.* 2003).

Günümüzde kardeş kromatidleri ayırt etmek için bu araştırmacılar tarafından geliştirilen Floresans Plus Giemsa(FPG) yöntemi tercih edilmektedir (Rodriguez-Reyes and Morales-Ramirez, 2003).

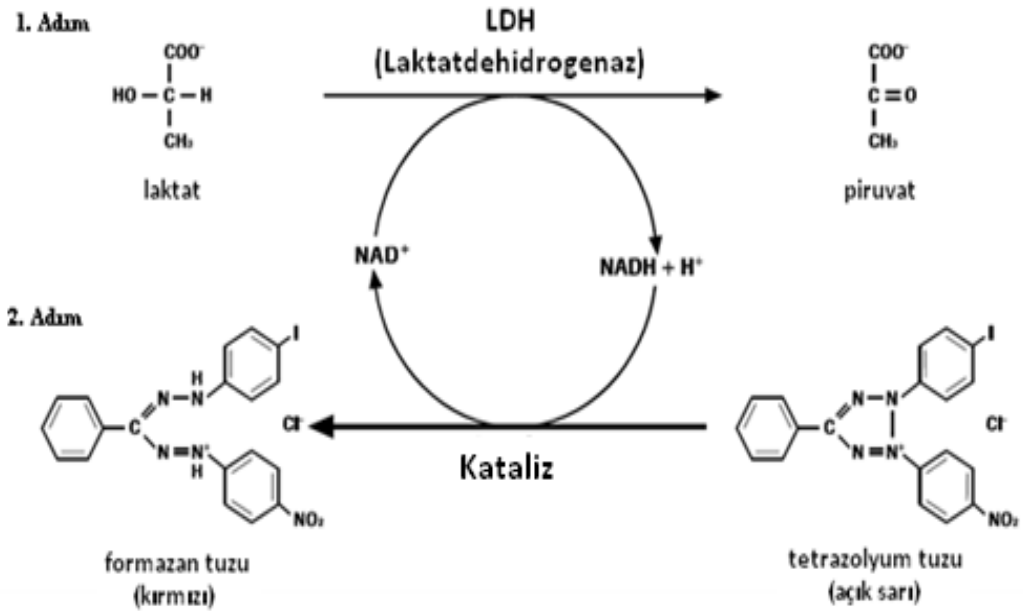
2.2 LDH TESTİ

Bu testte hücre ölümü klasik olarak hücre zarının hasarı olarak değerlendirilir. Hücre canlılığını değerlendiren birçok test vardır. Bu testlerin hassasiyeti uygulanabilirliği güvenilirliği birbirinden farklıdır. LDH sitotoksitesite testi kolay uygulanabilen ve güvenilirliği olan bir testtir.

Laktat dehidrojenaz enzimi bütün hücrelerde sitoplazmalarda bulunan bir enzimdir. Piruvatı laktik aside, laktik asiti piruvata katalizleyen enzimdir. Normal şartlarda bu enzim hücre dışına çıkamaz. Hücre zarında bir hasar olduğu zaman enzim hızlıca hücre dışına sızar. Hücre kültürü süpernatantlarında LDH miktarı ölçümüne bağlı olarak hücrenin ne kadar hasar gördüğü belirlenebilir.

Birinci basamakta NAD^+ LDH enzimi yardımıyla indirgenir açığa çıkan NADH ikinci basamakta tetrazolyum tuzunun indirgenmesini sağlayarak kırmızı renkli formazan tuzunun oluşumunu sağlar. Oluşan bu renk 490 nm'de absorbans verir. Bu

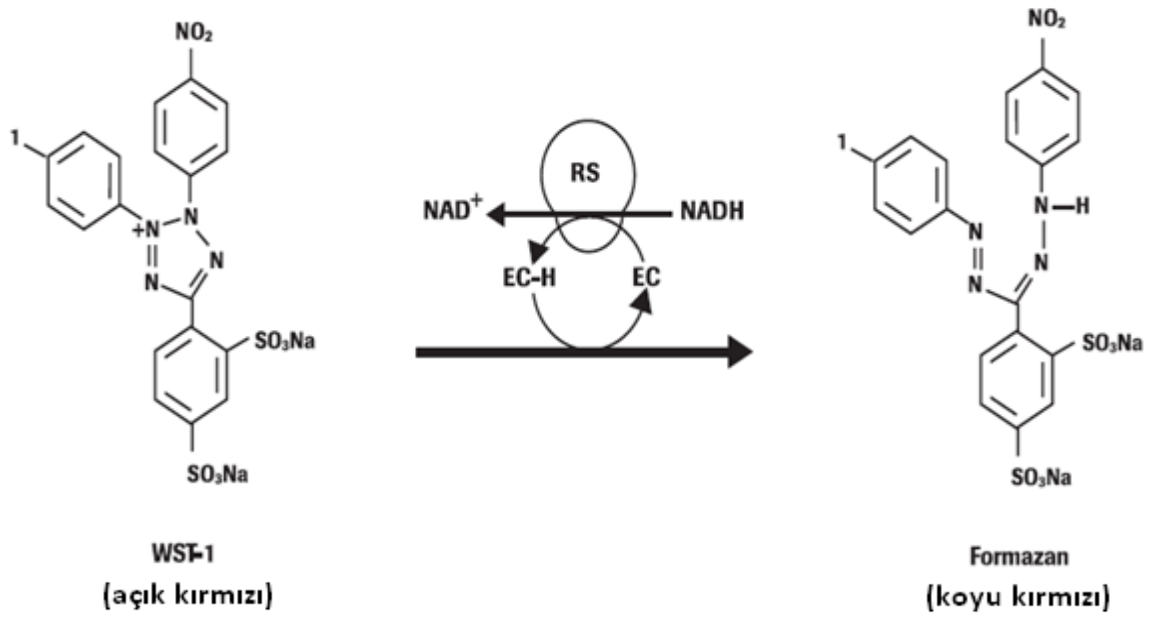
absorbansın Elisa Reader'da okunmasıyla kültür ortamındaki LDH miktarı kantitatif olarak belirlenmiş olur.



Şekil 2.2.1 Birinci adım hücreden LDH enzimi salınımı, laktatın piruvata oksidasyonu ve NAD^+ nin $\text{NADH} + \text{H}^+$ ’ye redüklenmesi. İkinci adım katalizör yardımıyla tetrazolyum tuzu (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride)’nun $\text{NADH} + \text{H}^+$ ’den 2H alması ve formazan tuzuna dönüşmesi.

2.3 WST-1 TESTİ

Hücre çoğalmasının belirlenmesi kültür ortamına eklenen tetrazolyum tuzlarının yıkılması ile analiz edilebilir. Tetrazolyum tuzları mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından formazana dönüştürülür (Şekil 2.3.1). Formazon miktarının artması kültür ortamında metabolik olarak aktif olan canlı hücre sayısı doğrudan ilişkilidir. Formazan miktarının spektrofotometrik olarak 450 nm’de Elisa Reader’da absorbansının ölçülmesi ile canlı hücre sayısı hakkında bilgi elde edilir.



Şekil 2.3.1 Formazan tuzunun formazana dönüştürülmesi. WST-1(Formazan tuzu), EC(electron coupling reagent), RS(mitochondrial succinate-tetrazolium reductase system).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 KULLANILAN KİTLER ve KİMYASAL MADDELER

- Roche Cytotoxicity Detection (LDH) Kit
- Roche Cell Proliferation Reagent (WST-1) Kit
- RPMI-1640 (Biochrom AG)
- Fitohemaglutinin (FHA) (Biochrom AG)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom AG)
- FBS (Biochrom AG)
- PBS (Biochrom AG)
- Fikol (Biochrom AG)
- L-Glutamine (Biochrom AG)
- Penisilin-Streptomisin (PS) (Biochrom AG)
- Kolşemid solüsyonu (Biological Industries)
- KCl (MERCK)
- KH_2PO_4 (MERCK)
- Na_2HPO_4 (MERCK)
- Giemsa boyası (MERCK)
- Asetik asit (MERCK)
- Methanol (MERCK)
- 5-Bromo-2-deoksiüridin (BrdU) (Sigma)
- Hoechst 33258 (Sigma)
- DMSO (Dimetil sulfoxide)

3.2 KULLANILAN ALET ve CİHAZLAR

- Elektronik terazi (Acculab Atilon)
- pH metre (Jenway 3010)

- Santrifüj (Nüve CN180, NF048)
- Mikroskop (Nikon eclipse 50i)
- Kromozom Görüntüleme (Nikon eclipse 50i)
- UV kaynağı modelini yaz
- Vortex (IKA Labotechnik)
- Çeker Kabin (Esco,Kotterman)
- CO₂ inkubatör (Thermo,Sanko)
- Elisa Reader (BioTek-PowerWaveXS)
- Etüv (WTC-binder)
- Su banyosu (Nüve BM402)
- Cam erlen mayer
- Cam mezür
- Cam şale
- Plastik pastör pipeti
- Kültür tüpleri
- Lam ve Lameller
- Filtre (Minipor)

3.3 KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1 KKD Analizi İçin Yapılan Hazırlıklar

a. Balzamın elde edilişi, stok solüsyonun hazırlanması ve çalışma konsantrasyonlarının belirlenmesi

Balzam lokal marketten satın alındı. 0.5 gr Sığla balzamı 1 mL etanol içinde çözüldü. Sonra 0.2 µm'lik süzgeçten geçirildi. Oluşan süzüntüye 4 mL DMSO eklendi. Daha sonra 5 mL çözelti 195 mL distile suya ilave edilerek toplam 200 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu sığla ekstraktı (SE) stok olarak kullanıldı.

b. Tespit solüsyonunun hazırlanması

1/3 asetik asit metanol çözeltisi hazırlandı.

c. Hipotonik solüsyonun hazırlanması

0.560 gr KCl 100 mL distile suda çözülerek 0.0075M KCl çözeltisi hazırlandı.

d. Hoechst 33258 stok çözeltisi hazırlanması

25 mg'lık Hoechst 33258 (Sigma) şişesi 5 mL distile su ile sulandırıldı. Karanlık ortamda -20 °C'de saklandı.

e. Hoechst 33258 çalışma çözeltisi hazırlanması

1 mL Hoechst 33258 stok çözeltisi ile 99 mL PBS çözeltisi taze hazırlanarak kullanıldı.

f. 5-Bromo–2-Deoksiüridin çözeltisinin hazırlanması

5-Bromo–2-deoksiüridin(BrdU) 0.0030 gr tartıldı ve 10 mL RPMI 1640 ile sulandırıldı. Alüminyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda +4 °C'de saklandı. Kültürde son konsantrasyon 10^{-2} M idi.

g. 2XSSC çözeltisinin hazırlanması

100 mL 20XSSC solüsyonuna 850 mL distile su eklendi. pH NaOH ile 7.0'ye ayarlandı. Toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

h. PBS çözeltisinin hazırlanması

0.2 gr KCl,+0.2 gr KH_2PO_4 ,+8 gr NaCl ve 1.15 gr (anhidro) Na_2HPO_4 1 litre distile suda çözüldü (pH 7.0).

i. Giemsa boya solüsyonunun hazırlanması

9.08 gr/L KH_2PO_4 , 14.8 gr/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hazırlandı. 30 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alınıp üzerine 40 mL KH_2PO_4 solüsyonu eklenerek pH 6.8'e ayarlandı.

3.3.2 Lenfosit Besi Yerlerinin Hazırlanması ve Saklanması

100 mL RPMI-1640, 20 mL FBS, 5 mL FHA, 2 mL L-Glutamine,- 1 mL PS Hazırlanan solüsyon 6 mL olacak şekilde steril hücre kültür tüplerine paylaştırıldı. Kullanım zamanına kadar -20°C 'de saklandı.

3.3.3 Donör Seçimi

Sağlıklı 25 ile 35 yaş arasında 3 erkek oluşan gönüllü olarak deneye katılmak isteyen toplam 3 donör seçildi. Donörler sigara kullanmayanlar arasından seçildi (pasif içicide olmadıkları belirlenerek). Son 6 ay içerisinde her hangi bir nedenle antibiyotik, X-Ray almadıkları, bilinen veya tanımlanan akut veya kronik bir rahatsızlıklarının olmadığı sözlü beyanları ile kabul edildi. Donörlerden deneye başlanacağı saatte kan alındı.

3.3.4 Deney Düzeneginin Oluşturulması

Daha önce hazırlanan besi yerleri -20°C 'den çıkarılarak oda ısısına gelmesi sağlandı. Oda ısısına gelen besi yerine 500 μL kan, 200 μL BrdU ve aşağıda belirtilen kimyasallar steril şartlarda eklendi. Bu deney düzeneği toplam 3 donör için tekrarlandı.

Kültür 1: Besi yeri (Kontrol)

Kültür 2: Besi yeri + 5.0 μM CCl_4

Kültür 3: Besi yeri + 0.4 $\mu\text{g/mL}$ Sığla Ekstrakt (SE-1)

Kültür 4: Besi yeri + 0.8 $\mu\text{g/mL}$ Sığla Ekstrakt (SE-2)

Kültür 5: Besi yeri + 1.6 $\mu\text{g/mL}$ Sığla Ekstrakt (SE-3)

Kültür 6: Besi yeri + 4.0 $\mu\text{g/mL}$ Sığla Ekstrakt (SE-4)

3.3.5 Lenfosit Kültürü

- 1- Donörlerden alınan periferik kan örneği ve ilgili kimyasallar ile hazırlanan 6 mL'lik hücre kültür tüpüne eklenerek 72 saat 37 °C'de kapalı hücre kültürüne alındı. Kültür tüpleri alüminyum folya ile sarılarak karanlık ortam sağlandı.
- 2- Kültürün 71. saatinde her kültür tüpüne 5 damla kolşisin solüsyonu eklendi.
- 3- 72. saatte kültüre edilen tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı.
- 4- Pellet üzerine hipotonik solüsyonu (0.075 M KCl) eklendi ve tüpler 25 dakika 37°C'lik etüvde bekletildi.
- 5- 1000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1/3 oranında soğuk asetik asit metanol karışımı eklenerek tespit işlemi gerçekleştirildi.
- 6- Tespit işlemi toplam üç kez tekrarlandı. Tespit işlemi sonunda süpernatanın 1–1.5 mL'lik alt kısmı hariç diğer bölümü atıldı.
- 7- Dipte kalan pellet çalkalanarak resüspanse edildikten sonra soğuk tespit içinde bekleyen lamaların her birine 5–6 damla bu süspansiyondan damlatılarak 5 lam hazırlandı.
- 8- Hazırlanan preparatlar üç gün oda sıcaklığında bekletilerek yaşlandırıldı.
- 9- Bu süre sonunda her bir preparat floresan plus giemsa tekniği ile boyandı.

3.3.6 Floresan Plus Giemsa Tekniği İle Boyama

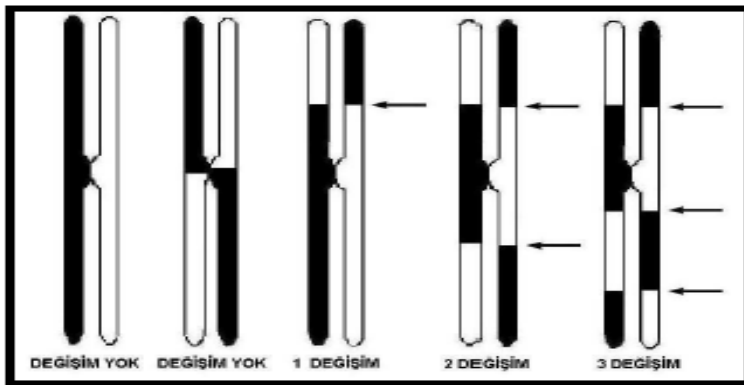
Bu işlem sırası ile şu şekilde tatbik edildi;

1. Üç gün oda ısısında kurutulan preparatlar 100 mL PBS tampon çözeltisi bulunan alüminyum folyoya sarılı temiz bir şalede 5 dakika oda ısısında bekletildi.
2. Süre sonunda şaleden çıkarılan preparatlar 0.5 µg/mL konsantrasyondaki stok Hoechst 33258 solüsyonundan 1/100 oranında PBS tampon çözeltisi içerisinde hazırlanarak bu solüsyonda 10 dakika karanlık ortamda bekletildi.
3. 1–2 saniye PBS'te yıkanan preparatlar bir kaba horizontal olarak dizilip üzerlerine lamel kapatıldı.
4. Hazırlanan preparatlar 13 cm yükseklikte bulunan UV lambasının altında 25 dakika bekletildi.

5. Preparatlardan lameller kaldırılarak 65 °C'deki 2xSSC solüsyonu içinde 15 dakika bekletildi.
6. 2XSSC solüsyonundan çıkartılan preparatlar distile su ile yıkandı.
7. Preparatlar 5 dakika Giemsa boyasında tutularak boyandı ve incelemeye alındı.

3.3.7 KKD sayımı

Her bir donör için en az 20 metafaz mikroskopta (Nikon eclipse 50i 100x büyütmede) değerlendirildi. Her kromozomda koyu boyalı KKD bölgelerinin bir kromatitten diğerine atladığı bölgeler bir adet değişim olarak kabul edildi. Aynı kromozom üzerinde 1'den fazla geçiş görüldüğü durumlarda bunların her biri ayrı ayrı sayıldı. Sentromerden geçiş gösteren bölgeler değerlendirmeye alınmadı (Sekil 3.3.7.1). Planlanan deney düzeneğine uygun olarak her bir donörden alınan kan örnekleri ve uygulanan kimyasalların farklı konsantrasyonları için ayrı ayrı olmak üzere ortalama KKD sıklığı belirlendi.



Şekil 3.3.7.1 KKD' lerin sayılmasında esas alınan kriterler (Lüleci et al., 1990).

3.4 SİTOTOKSİSİTE (LDH) TESTİ ve HÜCRE ÇOĞALMASININ BELİRLENMESİ (WST-1) TESTİ

3.4.1 Lenfosit İzolasyonu

Lenfositler Fikol Dansite Santrifüjleme Yöntemiyle heparize kandan izole edildi. İlk olarak periferik kan heparinize tüp içine alındı. Bir santrifüj tüpü kullanılarak PBS ile eşit miktarda kan seyreltilti. Ayrı bir tüpe kullanılan kan miktarının yarısı kadar kadar fikol konuldu. Kan yavaşça fikolün üzerine tüpün kenarından dikkatlice

bırakılarak üzerinde tabaka ayrı bir faz oluşturacak şekilde eklendi. Tüpler 2500 rpm’de 25 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüjden sonra dört farklı katman oluştuğu gözlemlendi. En üstteki serum tabakası uzaklaştırıldı. Daha sonra bir alttaki bulutumsu görünümde olan tabaka dikkatli şekilde boş falkon tüpüne alındı ve 10 mL PBS ile karıştırıldı. Tüpler 1700 rpm’de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün altında kalan hücre pelleti tüpün alt kısmına sertçe vurularak tekrar çözüldü. En son yıkamada tüp tekrar RPMI-1640 medium ile dolduruldu. 1700 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti önceki gibi resüspanse edildi. Toplam hacim RPMI ve %10’luk FBS ile 5mL’ye tamamlandı. Tüp yavaşça karıştırıldı. Steril pipet kullanılarak 10 µL örnek bir tüpe alındı. Bu tüpe 20 µL Tripan Blue solüsyonu eklendi ve hemositometreye yüklenerek hücre sayısı hesaplandı. Hücre süspansiyonu 1.5×10^6 hücre/mL eşit olacak şekilde ayarlandı.

3.4.2 Ekstraktların Eklenmesi

Her bir kuyucuğa 1.5×10^6 hücre/mL olacak şekilde hücre ile birlikte kuyucuktaki son derişimi 0.4, 0.8, 1.6 ve 4 µg/mL SE ilave edilerek 37 °C’de %5’lik CO₂’li ortamda 3 gün inkübe edildi.

3.4.3 Sitotoksosite Testi (LDH)

SE’ları kültür ortamına ilave edildikten 24 ve 48 saat sonra iki farklı ölçüm yapıldı. Öncelikle hücre medyum ortamı ile birlikte ependorf tüplere alındı ve 250 G’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan her kuyucuğa 100 µL transfer edildi. Her kuyucuğa 100 µL reaksiyon karışımı ilave edilerek oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Numunelerin absorbanslarının değeri 490 nm’de Elisa Reader kullanılarak ölçüldü. Her bir numune için ölçüm üç kez kekrarlandı.

3.4.4 Hücre Proliferasyon Testi (WST-1)

Hücrelerin inkübe edildiği kuyucuklara 24. ve 48. Saat 10 µL/kuyucuk Cell Proliferation Reagent(WST-1) eklendi. Hücreler 48 saat 37°C %5’lik CO₂’de inkübe edildi. Numunelerin absorbansı 450 nm’de Elisa Reader kullnılarak ölçüldü. Her numune için ölçüm üç kez tekrarlandı.

3.5 İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER

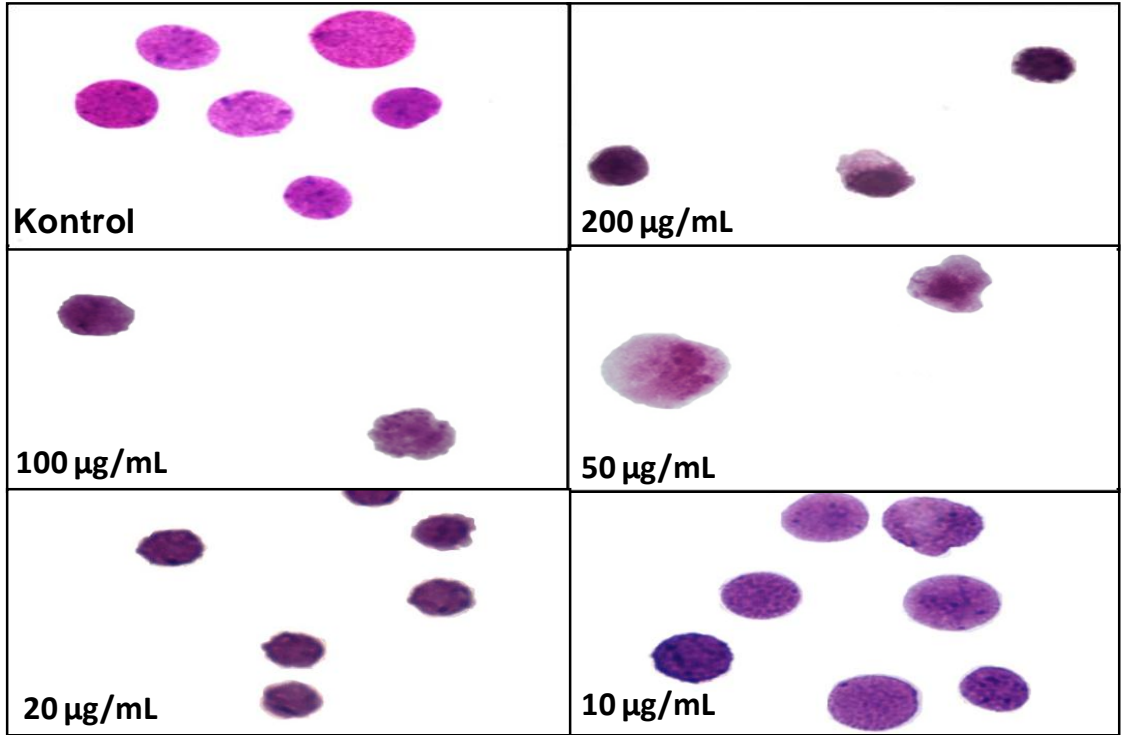
KKD, LDH ve WST-1 sonuçlarının istatistiksel analizi SPSS 15.0 programı ile birlikte Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 ÖN ÇALIŞMA SONUÇLARI

Yapılan ön çalışmalarda 10, 20, 50, 100 ve 200 µg/mL’lik konsantrasyonların bölünmeyi inhibe ettiği ve çekirdek morfolojilerini bozduğu gözlemlendi. Hiç metafaz alanı görülemedi. Buda uygulanan konsantrasyonların toksik olduğunu göstermektedir. Bu sebeple çalışmamızda kullandığımız konsantrasyonlarımızı bu yüksek konsantrasyonlardan daha düşük olan 0.4, 0.8, 1.6, 4 µg/mL konsantrasyonlarla çalışılmasına karar verdik.



Şekil 4.1.1 Ön çalışma lenfosit hücre çekirdeklerinin mikroskop görüntüleri (100X).

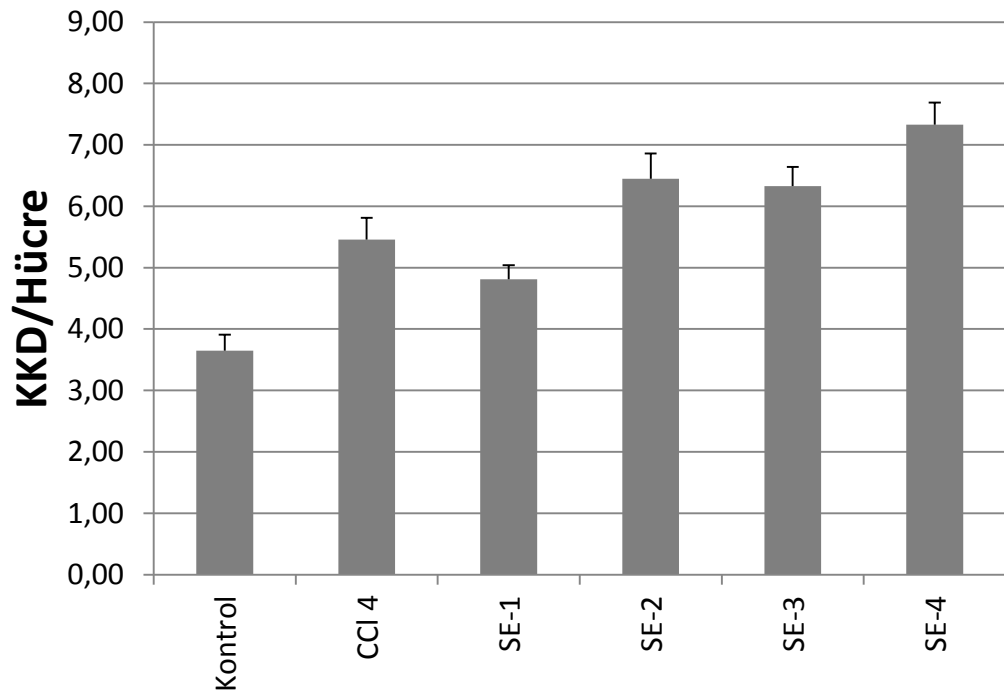
4.2 KKD SONUÇLARI

Balzamdan elde edilen ekstraktlar ve CCl₄'ün KKD frekansı üzerine etkileri Tablo 4.2.1'de gösterilmiştir. CCl₄ verilen gruplarda KKD frekansı önemli derecede artmıştır (p<0.001). SE'leri KKD frekansını konsantrasyonların artmasına bağlı olarak istatistiksel olarak önemli derecede artırmıştır (p<0.001 ve p<0.05). KKD frekansı artışı üzerinde en etkili doz SE-4 (4 µg/mL) olmuştur (Tablo 4.2.1 ve Şekil 4.2.1).

Tablo 4.2.1 KKD frekansı üzerine SE'lerinin etkileri.

Gruplar	Metafaz Sayısı	KKD Range	KKD/Hücre
Kontrol	20	1-8	3.65±0.26
CCl ₄	20	2-16	5.46±0.35 ^a
SE-1	20	1-9	4.81±0.23 ^b
SE-2	20	1-15	6.45±0.41 ^{af}
SE-3	20	2-12	6.33±0.31 ^{ade}
SE-4	20	1-16	7.33±0.36 ^{acehj}

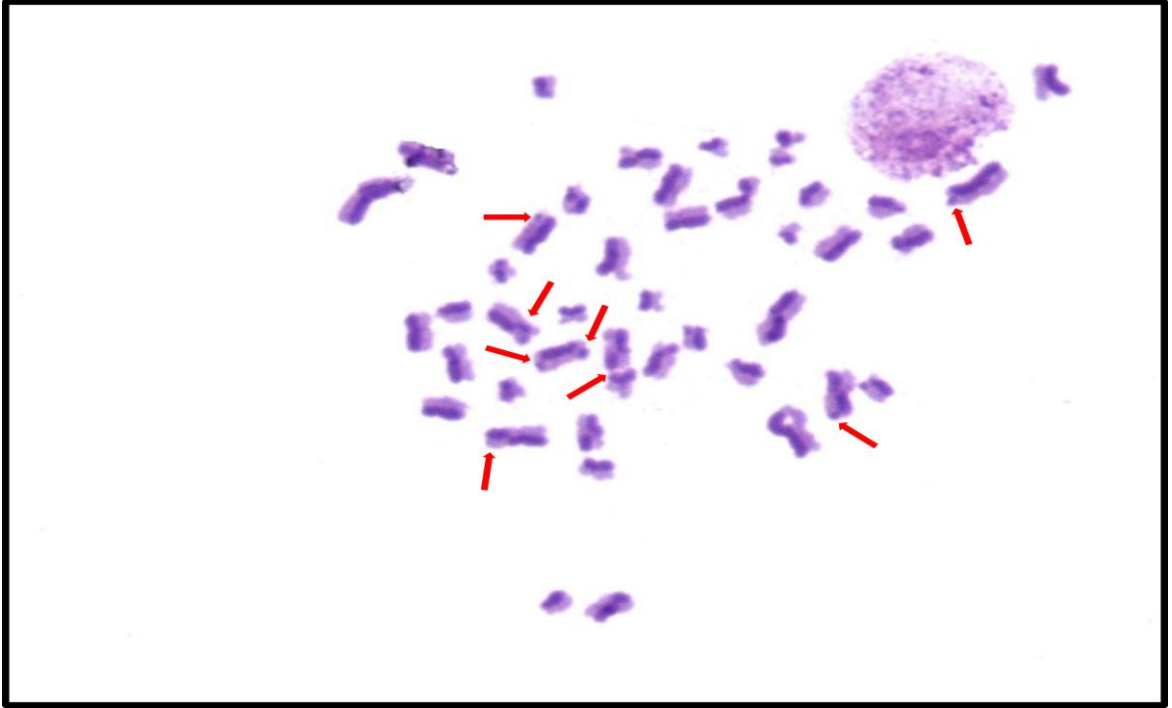
^ap<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında, ^bp<0.05 kontrolle karşılaştırıldığında, ^cp<0.001 CCl₄ verilen grupla karşılaştırıldığında, ^dp<0.05 CCl₄ verilen grupla karşılaştırıldığında, ^ep<0.001 SE-1 ile karşılaştırıldığında, ^fp<0.05 SE-1 ile karşılaştırıldığında, ^gp<0.001 SE-2 ile karşılaştırıldığında, ^hp<0.05 SE-2 ile karşılaştırıldığında, ⁱp<0.05 SE-3 ile karşılaştırıldığında.



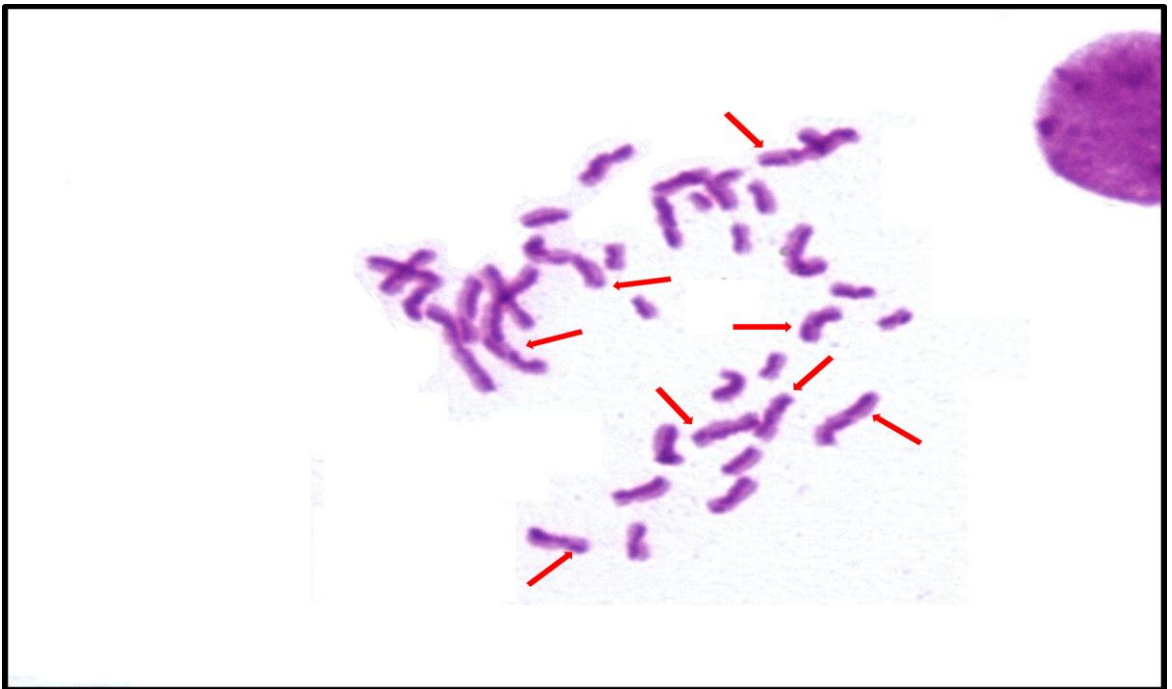
Şekil 4.2.1 KKD frekansı üzerine SE'lerinin etkileri.



Şekil:4.2.2. Donör 1'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 7 KKD değişimi.



Şekil:4.2.3 Donör 2'ye ait elde edilen bir metafaz alanındaki 8 KKD değişimi



Şekil:4.2.4 Donör 3'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 8 KKD değişimi

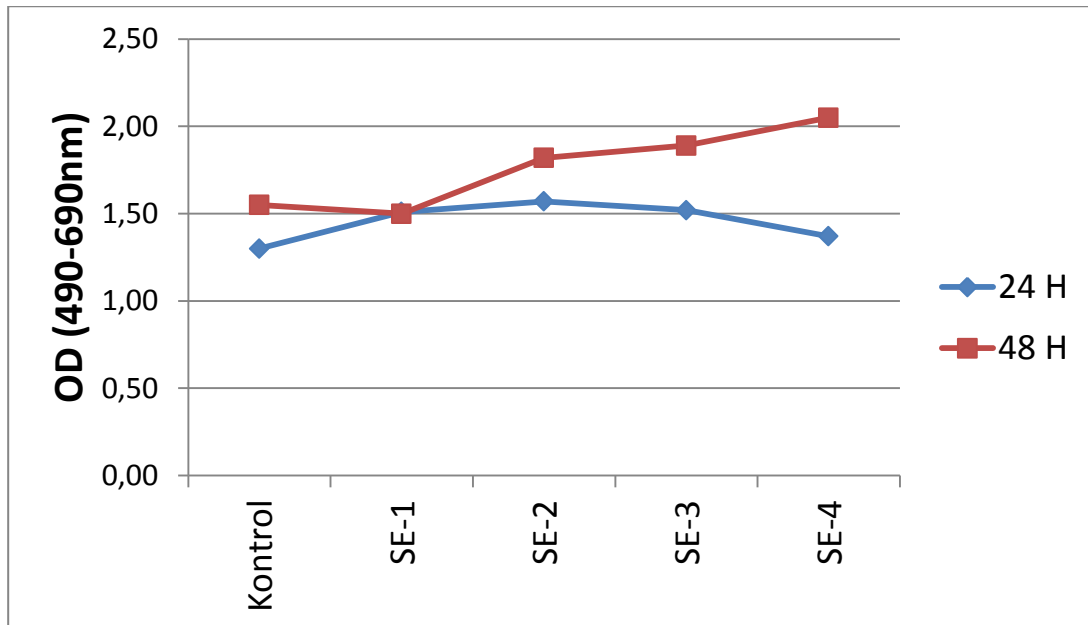
4.3 LDH SONUÇLARI

SE'lerinin hücre kültür ortamına salınan LDH miktarına üzerine etkileri Tablo 4.3.1 ve Şekil 4.3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.1 LDH seviyesi üzerine SE'lerinin etkileri

Gruplar	24 H	48 H
Kontrol	1.30±0.06	1.55±0.03
SE-1	1.51±0.11	1.50±0.02
SE-2	1.57±0.13	1.82±0.05 ^{ab}
SE-3	1.52±0.11	1.89±0.05 ^{ab}
SE-4	1.37±0.08	2.05±0.03 ^{abc}

^ap<0.05 kontrolle karşılaştırıldığında, ^bp<0.05 SE-1 ile karşılaştırıldığında, ^cp<0.05 SE-2 ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.3.1 LDH seviyesi üzerine SE'lerinin etkileri

24 saatlik kültürlerde SE'lerinin LDH seviyesini artırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. 48 lik saatlik kültürlerde ise LDH seviyesi üzerine SE'lerinin toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle SE-2,

SE-3 ve SE-4'ün LDH seviyesini istatistiksel olarak önemli derecede artırmıştır ($p<0.05$).

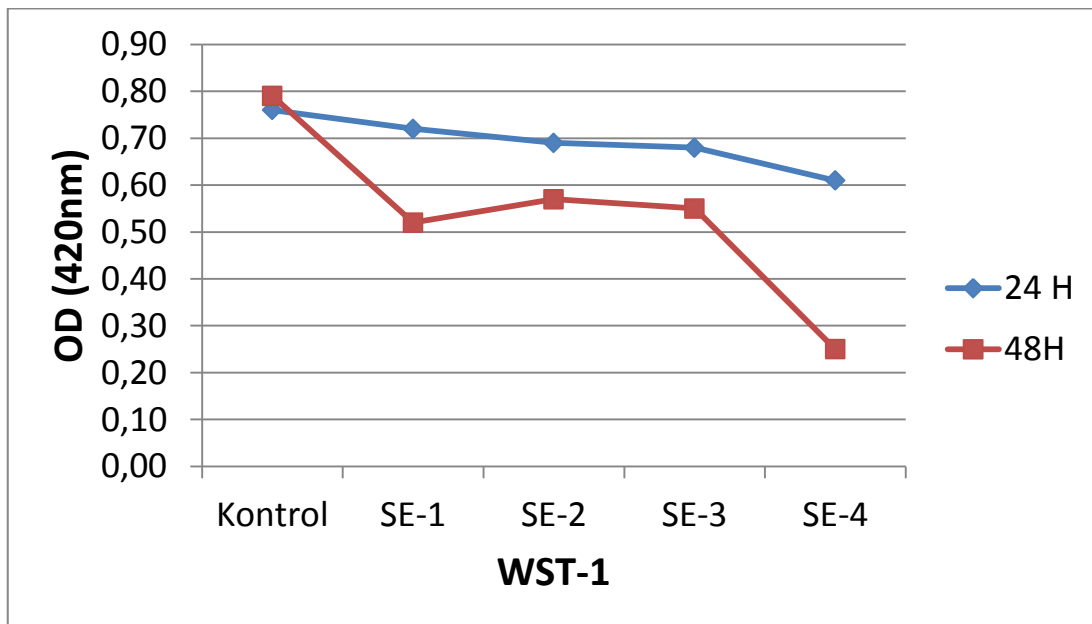
4.4 WST-1 SONUÇLARI

Hücre çoğalması üzerine SE'lerinin etkileri Tablo 4.3.1 ve Şekil 4.3.1'de gösterilmiştir. 24 saatlik kültürlerde SE'lerinin hücre çoğalmasını engellediği belirlenmiştir. Hücre çoğalması üzerine SE'ların engelleyici etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 4.4.1 SE'lerinin hücre çoğalması üzerine etkileri.

Gruplar	24 H	48 H
Kontrol	0.76±0.01	0.79±0.01
SE-1	0.72±0.03 ^a	0.52±0.32 ^a
SE-2	0.69±0.01 ^a	0.57±0.25 ^a
SE-3	0.68±0.02 ^a	0.55±0.32 ^a
SE-4	0.61±0.01 ^a	0.25±0.04 ^{ab}

^a $p<0.05$ kontrolle karşılaştırıldığında, ^b $p<0.05$ SE-1 ile karşılaştırıldığında,



Şekil 4.4.1 Hücre çoğalması üzerine SE'lerinin etkisi.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA ve SONUÇ

TARTIŞMA

Sığla balzamu geleneksel tedavide mide ülseri başta olmak üzere, mide hastalıklarında, balgam söktürücü, astım, bronşit ve akciğer hastalıklarında hemoroid, bazı deri hastalıklarında kullanılmaktadır (Guenther 1952; Fıçıcıoğlu 1988). Sığla balzamının yatıştırıcı ve analjezik özelliği olduğuna inanıldığından özellikle romatizma ağrılarını azaltmakta kullanılmıştır. Ayrıca antibakteriyal, antifungal ve antipatojenik özelliklerinden dolayı birçok hastalık etkenine karşı kullanılmıştır (Guenther 1952; Baytop 1980; Bozkurt and Göker 1986; Fıçıcıoğlu 1988; Aureli, Costantini et al. 1992).

Sığla balzamının farklı konsantrasyonlarının bazı bakteri türleri üzerinde kuvvetli antibakteriyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Balzamın antibakteriyal aktivitesinin çalışıldığı en kapsamlı çalışmalardan birinde; balzamın %10'luk derişiminin *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı, %1'lik derişiminin *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* bakterilerine karşı, %0.4'lük derişiminin *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* bakterilerine karşı %0.2'lik derişiminin *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* bakterilerine karşı antibakteriyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanında %0.1'lik derişiminin ise bakterilerin üremesini engellemediği gösterilmiştir (Sagdic, Ozkan et al. 2005).

Türkiye'deki Sığla ağacını da kapsayan 19 farklı bitki türü ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada 200 mg/mL lık bitki ekstratlarının nalidisik asit, penisilin G, novobiyosin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklere direnç gösteren Gram + ve Gram – 14 bakteri türü ve 1 maya mantarının gelişimleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *Eucalyptus*

camuldulensis, *Rosmarinus officinalis*, *Ecballium elaterium*, *Liquidambar orientalis*, *Cornus sanguinea*, *Vitis vinifera*, *Inula viscosa*, *Hypericum perforatum* ve *Punica granatum* bitki ekstratlarının güçlü antibakteriyel etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. *L. orientalis* ekstratı *Bacillus cereus* bakterisi ve *Candida albicans* maya mantarı dışındaki *Staphylococcus aureus*, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* gibi bakterilerinin gelişimlerini inhibe ettiği belirlendi. Sığla balzamu geniş spekturumda antibakteriyel aktivite göstermiştir (Oskay and Sarı 2007). Deri endüstrisinde antimikrobiyal olarak kullanılan %50 organa sülfür bileşikler ile karşılaştırıldığında %1, %2, %5 Sığla balzamının deriler üzerinde benzer antimikrobiyal etki gösterdiği belirlendi (Bayramoğlu 2010).

L. orientalis balzamının 28×10^{-3} mg/mL hava konsantrasyonun *Phytophthora cactorum*, *Cryphonectria parasitica* ve *Fusarium circinatum* bitkisel patojenlerine karşı antifungal etki gösterdiği, 17×10^{-3} mg/mL hava konsantrasyonun ise *P.cactorum* ve *F.circinatum* patojenlerine karşı etkili olduğu, 7×10^{-3} mg/mL, $3,5 \times 10^{-3}$ mg/mL hava konsantrasyonlarının ise sadece *P.cactorum* patojenine karşı etki gösterdiği belirlenmiştir (Lee, Kim et al. 2009).

Bir çeşit ağaç nematodu olan *Bursaphelenchus xylophilus* türüne karşı 28 bitkinin esansiyel yağları ile yapılan testler sonucunda coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*), ve valerian (*Valeriana wallichii*) yağları 2 mg/mL konsantrasyonda %100 nematidisial aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Kim and Seo 2008).

Sığla balzamının özellikle bu bakteri, mantar, nematode ve bitki patojenlerine karşı koruyucu etkisinin balzamın en önemli komponentlerinden olan stirenden kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle Asya orijinli olan *L. orientalis* bitkisinin yapılan farklı çalışmalarda %70-90 arasında stiren içerdiği yapılan farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur (İstek 1994; Hafızoglu, Reunanen et al. 1996; Duru, Çakır et al. 2002; Fernandez 2005; Kim and Seo 2008).

Uluslar arası kanser araştırmaları ajansı (IARC) stireni 2B grubu kanserojen olarak sınıflandırmıştır (IARC 1994). Stiren hücrelerde sitokrom P450 (CYP2E1) sistemi tarafından metabolize edildikten sonra oluşan stiren 7.8–oksit (SO) elektrofilik özelliğinden dolayı makromoleküllere bağlanabilir ve DNA’da tek zincir kırıklarına neden olur. Stirenin genotoksik etkisi elektrofilik ara ürün olan SO’dan kaynaklandığı belirlenmiştir (Nakajima, Wang et al. 1994; Norppa and Sorsa 1993; IARC 1994).

İş yerlerinde stirene maruziyete bağlı olarak DNA kırıklarının bir göstergesi olan KKD’nin arttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Yager, Paradisin et al. 1993). Camurri ve arkadaşlarının (1982), yaptığı çalışmada 60 ppm’lik stirene maruz kalan işçilerde KKD üçkat artmıştır (Camurri 1982). Stiren ve SO’in DNA zincirlerinde kırılmalara neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Somorovska ve arkadaşlarının (1999) 44 işçi üzerinde yaptığı çalışmalarda stirene maruziyet ile tek zincir DNA kırıkları arasında kuvvetli bir korelasyon olduğu belirtilmiştir (Somorovska 1999).

Yaptığımız çalışmalarda Sığla balzamından elde edilen balzamin 0.4, 0.8, 1.6 ve 4.0 µg/mL’lik dozlarının genotoksik ve sitotoksik etkilerini inceledik. Literatüre uygun olarak özellikle 1.6 ve 4.0 µg/mL’lik dozların KKD frekansını önemli derecede artırdığını belirledik. Ayrıca aynı dozların hücrelerde LDH salınımını artırarak toksik etkiye neden olduklarını ve hücre çoğalmasını inhibe ettiğini belirledik.

Yapılan ön çalışmalarda kullandığımız 50, 100 ve 200 µg/mL’lik dozlarının hücre bölünmesini tamamen inhibe ettiğı ve çekirdek morfolojisinde bozulmalara eden olduğu belirlenmiştir. Kullanılan ön çalışma dozlarının içeriğindeki stiren konsantrasyonu yaklaşık olarak 45 ile 180 µg/mL’dir. Bu konsantrasyonlar literatürde stiren ile ilgili verilen toksik dozun üzerindedir ve literature uygun olarakta hücreler üzerinde toksik etkiye sahiptir.

Stirenin genotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda stiren konsantrasyonunun 0.2-55 µg/mL’lik dozlarının KKD frekansını artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Yager et al. 1993; Laffon et al. 2002). Çalışma sonuçlarımız literatürle uygunluk göstermektedir. Kullandığımız Sığla balzamının içerisinde yaklaşık olarak 3.6 µg/mL

stiren bulunduğu ve bu dozunda lenfosit hücrelerinde KKD frekansını artırdığı ve sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

SONUÇ

Sığla balzamu hücreler üzerine olan genotoksik ve sitotoksik etkilerinden dolayı antibakteriyal, antifungal ve antiparazit olarak kullanılabilir. Ancak içeriğindeki yüksek stiren konsantrasyonundan dolayı insan hücreleri üzerinde toksik etkiye sahiptir. Bundan dolayı geleneksel tedavide kullanılan dozlarının iyi belirlenmesi gerekmektedir.

REFERANSLAR

- Acar, İ., İktüeren, P., 1987. Sığla Ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) Doğal Yayılışı, Sığla Balzamu Üretimi ve Pazarlaması. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi. 33, 7-16.
- Akbas, E., et al., 2001. The investigation of cigarette smoking on the lymphocyte life time and genotoxic effects. Turkish Journal of Geriatrics. 4, 15-18.
- Akman, Y., 1995. Türkiye Orman Vejetasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi.
- Alan, M., Kaya, Z., EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for oriental sweet gum (*Liquidambar orientalis*). Vol. 2011. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 2003.
- Arnaudeau, C., et al., 2001. DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. Journal of Molecular Biology. 307, 1235-1245.
- Atay, I., 1985. Sığla Ağacının (*Liquidambar Orientalis* Mill) önemi ve Silvikültürel Özellikleri. İ.Ü. Orman Fakültesi Dergisi, 35, 15-21.
- Ates, D. A., Erdogru, T. O., 2003. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. Turk J Biol 27, 157-162.
- Atmaca, M., et al., 2004. Sister Chromatid Exchange Frequency in Lymphocytes Cultured from Cotton Gin Workers. Turk J Med Sci. 34, 247-250.
- Aureli, P., et al., 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. Food Protect. 55, 344-348.
- Barale, R., et al., 1998. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: I. Contribution of methodological factors. Environ Mol Mutagen. 31, 218-27.
- Barch, M. J., Editor. The Act Cytogenetics Laboratory Manual. Raven Press, New York, 1991.
- Başaran, G. F., Alkolik bireylerdeki alkol ve sigara tüketimine bağlı oluşan SCE oranlarının sigara içen ve sigara içmeyen bireylerdeki SCE oranları ile karşılaştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Vol. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 1998.
- Bayramoğlu, E. E., 2010. Soaking with Storax- Possibility of Using Sığla Tree (*Liquidambar orientalis* Mill. Var *orientalis*) Storax as Bactericide in the Soaking Float. Jalca. 105.
- Baytop, T., 1950. Sur le *Styrax liquidus*. Pharm. Acta Helv. 25, 60.
- Baytop, T., Farmakognozi. 2783, İstanbul, 1980.
- Baytop, T., Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Post and Present). İstanbul 1984.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul
- Belsito, D., et al., 2007. A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients. Food and Chemical Toxicology. 45 1-23.
- Berkel, A., Sığla Ağacı Odunun Makroskopik Özellikleri ve Anatomik Strüktürü Hakkında Araştırmalar. İ.Ü. Orman Fakültesi Dergisi,, Vol. 5, 1955a, pp. 1-18.

- Berkel, A., 1955b. Sığla Ağacı Odunun Makroskopik Özellikleri ve Anatomik Strüktürü Hakkında Araştırmalar,. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi. 5, 1-18.
- Beyazıt, V., 2009. Effects of Sweet Gum (*Liquidambar orientalis*), Mulberry Leaves(*Morus alba*) and the Larval Ganglion Extracts of Silkworm (*Bombyx mori*) on Stroke Parameters (Hemoglobin, Strokin, Cortexin, Frontalin, Temporalin, Parietalin, Occipitalin, Brain Ventriculin, Hemorrhagic Clot) in Rabbits(*Lepus capensis*). Journal of Animal and Veterinary Advances. 8 2164-2170.
- Bozkurt, Y., Göker, Y., 1986. Orman Ürünlerinden Faydalanma Ders Kitabı. İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları, İstanbul.
- Carrano, A., et al., 1978. Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. Nature. 271, 551-553.
- Ceylaner, B. G., Şizofrenili olgularda kardeş kromatid değişimlerinin (Sister Chromatid Exchange-SCE) araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Vol. Doktora Tezi. Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, 1997.
- Das, B. C., Natarajan, A. T., 1988. Factors that Influence Formation of Sister Chromatid Exchanges in Human Blood Lymphocytes. Critical Reviews in Toxicology. 19, 43- 86.
- Das, B. C., Sharma, T., 1983. Reduced frequency of baseline sister chromatid exchanges in lymphocytes grown in antibiotics and serum-excluded culture medium. Hum. Genet. 64, 249-253.
- Davis, P., 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University, Edinburgh.
- De Ferrari, M., et al., 1991. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and SCE analysis in peripheral blood lymphocytes. Mutation Research. 260, 105-113.
- Debova, G. A., 1981. Effect of widely used drugs on frequency of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 92, 716-717.
- Draize, J. H., et al., 1948. Toxicological investigations of compounds proposed for use as insect repellents. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 93, 26-39.
- Duru, M. E., et al., 2002. Composition of the volatile oils isolated from the leaves of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* and *L. orientalis* var. *Integriloba* from Turkey. Flav Fragrl J. 17, 95-98.
- Efe, A., *Liquidambar Orientalis* Mill (Sığla Ağacı) Morfolojik ve Palinolojik Özellikleri Üzerine Araştırmalar. Fen Bilimleri Enstitüsü, Vol. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 1986.
- Efe, A., 1987. Studies on the Morphological and Palynological Characteristics of *Liquiambar orientalis* Mill. in Turkey. I.U. Orm. Fak. Dergisi 37, 273-286.
- Erdem, N., Kontraplak ve yonga-levha fabrikalarında çalışan işçilerde formaldehit ve odun tozuna maruziyetin solunum fonksiyonları üzerine etkisi ve genotoksik hasarın araştırılması. Sağlık Bilimleri Ens, Vol. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 1997a.
- Erdem, N., Kontroplak ve yonga - levha fabrikalarında çalışan işçilerde formaldehit ve odun tozuna maruziyetin solunum fonksiyonları üzerine etkisi ve genotoksik hasarın araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Gazi Üniversitesi, Ankara, 1997.

- Fernandez, X., 2005. Chemical composition of the essential oils from Turkish and Honduras *Styrax*. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*. 20, 70-73.
- Fıçıoğlu, S., Saflaştırılmış Sığla Balzaminin Analitik İncelenmesi,. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 1988.
- Gadhia, P., et al., 1991. Adriamycin-induced sister chromatid exchange and chromosomal aberrations in Down's syndrome lymphocytes. *Mutagenesis*. 6, 31-33.
- Garret, N. E., et al., 1986. Evaluation of the genetic activity profile of 65 pesticides. *Mutation Research*. 168, 301-325.
- Guenther, E., 1952. *The Essential Oil*. Krieger Publishing CO., Malabar, Florida, New York.
- Gül, G. S., Sığla ağacı Kabuk Sıyrıntılarından Yağ Elde Etme Yöntemleri Üzerine Araştırmalar. Vol. 178. Orman Araştırma Enstitüsü,, 1986.
- Gulec, M., et al., 2009. Investigation of vasoactive ion content of herbs used in hemorrhoid treatment in Turkey. *Pak J Pharm Sci*. 22, 187-92.
- Hafizoğlu, H., 1982. Analytical Studies on the Balsam of *Liquidambar orientalis* Mill. by chromatography and Mass Spectrometry. *Holzforschung*. 36, 311-313.
- Hafizoglu, H., et al., 1996. Chemical composition of levant storax. *Holzforschung*. 50, 116-117.
- Helleday, T., 2003. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res*. 532, 103-15.
- Hill, A., Wolff, S., 1982. Increased induction of sister chromatid exchange by diethylstilbesterol in lymphocytes from pregnant and premenopausal women. *Cancer Res*. 42, 893-896.
- Hill, A. F., 1952. *Economic Botany: A Textbook of Useful Plants and Products*. McGraw Hill, New York.
- TÜBİTAK, <http://www.eski.tubitak.gov.tr/tubives/index.php>. Vol. 2011. TÜBİTAK, 2011.
- IARC, I. A. f. R. o. C., 1994. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some industrial chemicals. 60.
- Ickert-Bond, S. M., et al., 2005. Comparative infructescence morphology in *Liquidambar* (Altingiaceae) and its evolutionary significance. *American Journal of Botany*. 92, 1234-1255.
- İkbal, M., et al., 2003. Association of sister chromatid exchange frequencies in patients with ankylosing spondylitis with and without HLA-B27. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 62, 775-777.
- İstek, A., Sığla Balzamin (Storax)'ın Kimyasal Bileşenleri. Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı, Vol. Orman Endüstri Yüksek Mühendisliği Ünvan Alma Tezi. Kardeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 1994, pp. 60.
- Jenner, P. M., et al., 1964. Food flavorings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology* 2 327-343.
- Kim, J., Seo, S. M., 2008. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *J. Agric. Food Chem*. 56, 16.
- Köhler, H. A., 1887. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen und kurz erläuterndem Texte. Untermyhaus, Gera.
- Latt, S. A., Schreck, R. R., 1980. Sister chromatid exchange analysis. *American Journal of Human Genetics*. 32, 297-313.

- Lee, Y. S., et al., 2009. Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 93, 138–143.
- Lüleci, G., et al. Eds.), 1990. Sitogenetik uygulama yöntemleri. Ankara.
- Nakajima, T., et al., 1994. CYP2C11 and CYP2B1 are major cytochrome P450 forms involved in styrene oxidation in liver and lung microsomes from untreated rats, respectively. *Biochem Pharmacol.* 48, 637-42.
- Norppa, H., Sorsa, M., 1993. Genetic toxicity of 1,3-butadiene and styrene. IARC Scientific Publications Lyon. 185-93.
- Oskay, M., Sarı, D., 2007. Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*. 45, 176-181.
- Öztürk, A., Meme kanserli olguların lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi sıklığı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı., Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 1995.
- Pandita, T. K., 1983. Effect of Temperature Variation on Sister Chromatid Exchange Frequency in Cultured Human Lymphocytes. *Human Genetics*. 6189-190.
- Pedersen, C., et al., 1979. Sister chromatid exchanges in cultured peripheral lymphocytes from twins. *Hum Genet.* 52, 281-94.
- Perry, P., Evans, H. J., 1975. Cytological Detection Of Mutagen-Carcinogen Exposure By Sister Chromatid Exchange. *Nature*. 258, 121-125.
- Popp, W., et al., 1994. Sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of oral cancer patients seem to be influenced by drinking habits. *Carcinogenesis*. 15, 1603-1607.
- Powers, M. F., et al., 1961. A study of the toxic effects of cinnamon oil. *The Pharmacologist*. 3, 62.
- Rodriguez-Reyes, R., Morales-Ramirez, P., 2003. Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU. *Mutagenesis*. 18, 65-72.
- Sagdic, O., et al., 2005. A study on inhibitory effects of Sigla tree (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*) storax against several bacteria. *Phytother Res.* 19, 549-51.
- Sasaki, Y. F., et al., 1989. Modifying effects of components of plant essence on the induction of sister-chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*. 226 103-110.
- Shubber, E. K., et al., 1991. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes from infants with Down's syndrome. *Mutat Res.* 248, 61-72.
- Sinha, A. K., et al., 1985. Analyses for in vitro growth conditions, cytokinetics, and sister chromatid exchanges in lymphocytes cultured from the Sprague-Dawley rat. *In Vitro Cell Dev Biol.* 21, 583-7.
- Stoll, C., et al., 1982. Sister Chromatid Exchange and Growth Kinetics in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Research*. 42, 3240-3243.
- Tanrıverdi, N., Kardeş kromatid değişimi. Sağlık Bilimleri Ens., Vol. Bilim Uzmanlığı Tezi. Çukurova Üniversitesi, 1991.
- Taylor, J. H., 1958. Sister Chromatid Exchanges in Tritium-Labeled Chromosomes. *Genetics*. 43, 515-29.
- Taylor, J. H., et al., 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 43, 122.

- Top, M., et al., 2007. The health benefits of traditional chinese plant medicines: Weighing the scientific evidence. Rural Industries Reserarch and Development corporation. 06, 128.
- Tossavainen, A., Scand, J., 1978. Styrene use and occupational exposure in plastics industry. Work Environ Health 2, 7-13.
- TSE 85, Sığla Balzamlı, Türk Standartları Entitüsü , Ankara, Kasım 1963.
- Tyler, V. E., et al., 1981. Pharmacognosy. Lae & Febiger Publisher, Philadelphia.
- WHO, W. H. O., Environmental Health Criteria 26 Styrene. Geneve, 1983.
- Yager, J. W., et al., 1993. Sister-chromatid exchanges in ymphocytes are increased in relation to longitudinally measured occupational exposure to low concentrations of styrene. Mutat Res 319, 155-65.
- Zaitsev, A. N., Rakhmanina, N. L., 1974. Some data on the toxic properties of phenylethanol and cinnamic alcohols. Voprosy Pitaniya. 6.
- Zakharov, A. F., Egolina, N. A., 1972. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. Chromosoma. 38, 341-65.
- Zanzoni, F., et al., 1979. Sister Chromatid Exchange (SCE) in Human Lymphocytes Effect of UV C Irradiation and Age. Arch. Dermatol. Res. 265, 283-287.