

**BAZI *LIMONIUM* TÜRLERİNE AİT BİTKİ
EKSTRELERİNİN MUTAJENİK ETKİLERİNİN
FARKLI TEST SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ**

Yasin EREN

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz-2011

**Bu tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No:
09.FENED.17**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Yasin EREN'in "**Bazı *Limonium* Türlerine ait Bitki Ekstrelerinin Mutajenik Etkilerinin Farklı Test Sistemleri ile Belirlenmesi**" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 27.06.2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA
Üye	: Prof. Dr. Muhsin KONUK
Üye	: Doç. Dr. Mediha CANBEK
Üye	: Yard. Doç. Dr. Halil BERBER
Üye	: Yard. Doç. Dr. Filiz SUSUZ

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

Prof. Dr. Rıdvan SAY
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI *LIMONIUM* TÜRLERİNE AİT BİTKİ EKSTRELERİNİN MUTAJENİK ETKİLERİNİN FARKLI TEST SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

Yasin EREN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA
2011, 126 sayfa

Alternatif tıbbı olan ilgi ve buna paralel olarak bitkilerin kullanımını da artmaktadır. Bitkilerin etkinliklerinin araştırılması hem ülkemiz ekonomisi, hem de halk arasındaki kullanımlarının güvenilirliğinin değerlendirilmesi bakımından önem taşımaktadır. Bu amaçla, ülkemizde insanlar ve diğer canlılar tarafından tüketilen *Limonium* cinsine ait bazı türlerin kök, gövde ve yaprak organları kullanılmıştır. Bu organlardan elde edilen, distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) ekstralarının mutajenik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) ekstralarının mutajenik ve sitotoksik etkileri *Allium*, AMES ve MTT testleriyle belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan türlerden *Limonium effusum* endemik bir tür iken *Limonium globuliferum* endemik değildir. İki tür ile yapılan, *Allium* kök büyüme inhibisyonu testi ve mitotik indeks belirleme çalışmalarına göre, distile su ekstraları, konsantrasyon artışına bağlı toksisite miktarında da artışa sebep olmuştur. Kromozom aberasyon çalışmalarında da özellikle iğ iplikleri bozulmalarının oluşturduğu anomaliler tespit edilmiştir. AMES testinde *Limonium globuliferum* yaprak metanol ekstresinin 10000 µg/plak; distile su kök ekstresinin 1 ve 0.1 µg/plak konsantrasyonları; gövde ve yaprak distile su ekstralarının tüm dozları mutajenik etki gösterirken, *Limonium effusum* kök, metanol ve distile su ekstraları zayıf mutajenik etki göstermiştir. Mitokondriyel aktiviteye dayalı bir test olan MTT testi sonuçları da ekstraların büyük çoğunluğunun sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada bakteriyel, bitkisel ve memeli hücreleri kullanan farklı test sistemleri ile ekstraların farklı organizmalar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Limonium effusum* ve *Limonium globuliferum* ekstralarının büyük çoğunluğu toksik etkiye sahip iken, bazı ekstraların hücrelerde pozitif etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Limonium effusum*, *Limonium globuliferum*, *Allium* test, AMES test, MTT test

ABSTRACT

PhD Dissertation

DETERMINATION OF MUTAGENIC EFFECTS OF THE EXTRACTS FROM *LIMONIUM* SPECIES BY USING DIFFERENT TEST SYSTEMS

Yasin EREN

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA
2011, 126 pages

Interest to the alternative medicine and usage of plants have been increasing day by day in parallel way. Investigation of plants efficiency is important with respect to both economics of our country and evaluation of reliability of plants usage. For this purpose in this study, root, stem and leaf organs of some species belonging to *Limonium* genus, consumed in our country by humans and other living organisms, were used. Mutagenic and cytotoxic effects of distilled water, methanol and acetone:methanol (2:1) extracts obtained from the mentioned organs were determined with *Allium*, AMES and MTT tests. *Limonium effusum* that was used in the study, is an endemic species but *Limonium globuliferum* is not an endemic species. According to *Allium* root growth inhibition test and mitotic index determination studies committed with two species, distilled water extracts caused to rising in the amount of toxicity depended on increasing concentration. In chromosome aberration studies, anomalies especially arising from spindle fiber disruptions, were determined. In AMES test, *Limonium effusum* root, methanol and distilled water extracts showed weak mutagenic effect, while *Limonium globuliferum* leaf methanolic extracts at 10000 µg/plate concentration; 1 and 0.1 µg/plate root distilled water extracts; and all dosage of stem and leaf distilled water extracts showed mutagenic effects. Results of MTT test, was operated based on mitochondrial activity, indicated that large majority of extracts had cytotoxic effect. In this study, it was aimed to determine the effects of the extracts, on different organisms by different test systems using bacterial, plant and mammalian cells. It was found that some of the *Limonium effusum* and *Limonium globuliferum* extracts had positive effects on cells, while large majority of extracts were toxic.

Keywords: *Limonium effusum*, *Limonium globuliferum*, *Allium* test, AMES test, MTT test

TEŐEKKÖR

Bu alıŐma boyunca katkılarını ve manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya, tüm çalışmalarda bize yol gösteren ve çalışmanın her basamağında engelleri aŐmamda yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Muhsin KONUK'a, laboratuvar çalışmalarının her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım ArŐ. Grv. Dr. Recep LİMAN ve ArŐ. Grv. Dilek AKYIL'a, tez çalışması boyunca verdiği katkılarından dolayı Sayın Yard. Doç. Dr. Halil BERBER'e teŐekkÖr ederim.

Hayatın her aşamasında ve tüm çalışma süresi boyunca sıkıntı ve dertlerime ortak olup manevi desteklerini veren hayat yoldaŐlarım sevgili eŐim ve aileme ve yorucu geçen günlerde yorgunluğumu unutturan biricik oğluma sonsuz teŐekkÖrlere.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Limonium</i> Bitkisinin İçeriği ve Farmakolojisi	3
1.1.1. İçeriği.....	5
1.1.2. Farmakolojisi.....	7
1.2. Toksik madde çeşitleri.....	8
1.3. Bitkilerin Toksik Etkileri.....	9
1.4. Mutajenite Test Sistemleri.....	10
1.4.1. Sitogenetik testler	12
1.4.2. Comet testi	16
1.4.3. Bakteriyel yöntemler	16
1.5. Hücre Kültürü	18
1.5.1. Primer Hücre Kültürü	18
1.5.2. Devamlı Hücre Kültürü	19
1.5.3. Diploid Hücre Kültürü.....	19
1.5.4. Hücre kültürünün avantajları ve dezavantajları	19
1.6. MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) hücre hattı	21
1.7. Bu Çalışmada Kullanılan Test Sistemleri.....	21
1.7.1. <i>Allium</i> testi	21
1.7.2. AMES Test (<i>Salmonella</i> / mikrozom test).....	22
1.7.3. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi.....	25
2. MATERYAL ve METOD	28
2.1. Bitki Ekstraksiyonu Yöntemi.....	28
2.2. <i>Allium</i> Test.....	28
2.2.1. EC 50 konsantrasyonunun belirlenmesi	29
2.2.2. Kromozom aberasyon testi	29

2.2.3. Preperatların hazırlanması	30
2.2.4. Mikroskopik çalışma	31
2.2.5. Verilerin istatistiksel analizleri.....	32
2.3. AMES Mutajenite Testi.....	32
2.3.1. Bitki Ekstreleri	32
2.3.2. <i>Salmonella typhimurium</i> test suşları.....	32
2.3.3. Deneyde kullanılan besiyerlerinin içerikleri ve hazırlanmaları	32
2.3.4. Test maddeleri	38
2.3.5. AMES deneyi	38
2.4. MTT Testi.....	45
2.4.1. Hücrelerin testler için hazırlanması.....	45
2.4.2. MTT analizi.....	46
3. BULGULAR.....	47
3.1. <i>Allium</i> Testine Ait Bulgular	47
3.1.1. Kök büyümesi inhibisyonu testi.....	47
3.1.2. Mitotik indeks (MI) üzerine etkileri	52
3.1.3. Kromozom aberasyon çalışmaları	60
3.2. AMES Testine Ait Bulgular	71
3.2.1. Sitotoksik dozların belirlenmesi.....	71
3.2.2. AMES deneyi bulguları	71
3.3. MTT Testine Ait Bulgular	77
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1. <i>Limonium effusum</i> kök su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.	49
3.2. <i>Limonium effusum</i> gövde su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.	50
3.3. <i>Limonium effusum</i> yaprak su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.	50
3.4. <i>Limonium globuliferum</i> kök su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.	51
3.5. <i>Limonium globuliferum</i> gövde su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.	51
3.6. <i>Limonium globuliferum</i> yaprak su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.	52
3.7. Kromozom aberasyonu çalışmasında görüntülenen bazı anomaliler.	62
3.8. <i>Limonium effusum</i> kök su ekstralarının % proliferasyon verileri.	78
3.9. <i>Limonium effusum</i> gövde su ekstralarının % proliferasyon verileri.	79
3.10. <i>Limonium effusum</i> yaprak su ekstralarının % proliferasyon verileri.	79
3.11. <i>Limonium globuliferum</i> kök su ekstralarının % proliferasyon verileri.	80
3.12. <i>Limonium globuliferum</i> gövde su ekstralarının % proliferasyon verileri.	81
3.13. <i>Limonium globuliferum</i> yaprak su ekstralarının % proliferasyon verileri.	81
3.14. <i>Limonium effusum</i> kök metanol ekstralarının % proliferasyon verileri.	82
3.15. <i>Limonium effusum</i> gövde metanol ekstralarının % proliferasyon verileri.	83
3.16. <i>Limonium effusum</i> yaprak metanol ekstralarının % proliferasyon verileri.	83
3.17. <i>Limonium globuliferum</i> kök metanol ekstralarının % proliferasyon verileri.	84
3.18. <i>Limonium globuliferum</i> gövde metanol ekstralarının % proliferasyon verileri.	85
3.19. <i>Limonium globuliferum</i> yaprak metanol ekstralarının % proliferasyon verileri.	85
3.20. <i>Limonium effusum</i> kök aseton:metanol (2:1) ekstralarının % proliferasyon verileri.	86

3.21. <i>Limonium effusum</i> gövde aseton:metanol (2:1) ekstrelerinin % proliferasyon verileri.....	87
3.22. <i>Limonium effusum</i> yaprak aseton:metanol (2:1) ekstrelerinin % proliferasyon verileri.....	87
3.23. <i>Limonium globuliferum</i> kök aseton:metanol (2:1) ekstrelerinin % proliferasyon verileri.	88
3.24. <i>Limonium globuliferum</i> gövde aseton:metanol (2:1) ekstrelerinin % proliferasyon verileri.	89
3.25. <i>Limonium globuliferum</i> yaprak aseton:metanol (2:1) ekstrelerinin % proliferasyon verileri.	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. <i>Allium</i> testi kök büyümesi inhibisyonu testi sonuçları.....	48
3.2. <i>Limonium effusum</i> kök su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.....	54
3.3. <i>Limonium effusum</i> gövde su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.....	55
3.4. <i>Limonium effusum</i> yaprak su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.....	57
3.5. <i>Limonium globuliferum</i> kök su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.....	58
3.6. <i>Limonium globuliferum</i> gövde su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.....	59
3.7. <i>Limonium globuliferum</i> yaprak su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.....	61
3.8. <i>Limonium effusum</i> kök su ekstreleri kromozom aberasyonu sonuçları.....	64
3.9. <i>Limonium effusum</i> gövde su ekstreleri kromozom aberasyonu sonuçları.....	65
3.10. <i>Limonium effusum</i> yaprak su ekstreleri kromozom aberasyonu sonuçları.....	66
3.11. <i>Limonium globuliferum</i> kök su ekstreleri kromozom aberasyonu sonuçları.....	68
3.12. <i>Limonium globuliferum</i> gövde su ekstreleri kromozom aberasyonu sonuçları.....	69
3.13. <i>Limonium globuliferum</i> yaprak su ekstreleri kromozom aberasyonu sonuçları.....	70
3.14. Aseton:metanol (2:1) ekstreleri ile yapılan AMES testinin sonuçları.....	74
3.15. Metanol ekstreleri ile yapılan AMES testinin sonuçları.....	75
3.16. Distile su ekstreleri ile yapılan AMES testinin sonuçları.....	76

1. GİRİŞ

Yaşamımıza yeni giren bazı fiziksel ve kimyasal ajanlar, insan hayatını kolaylaştırdığı gibi bazı sağlık sorunlarına da neden olmaktadır. Günümüzde halen yeni kimyasal ürünler hayatımızdaki yerlerini almaya devam etmektedirler. Bu ürünlerin kullanımından önce insan sağlığına etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Günümüzde alternatif tıbbın önemli bir kısmını oluşturan bitki ekstreleri, mutajenik etki oluşturan kimyasallara veya çevresel etmenlere karşı antimutajenik etki gösterebildiği gibi, bu ekstrelerden bazıları farklı organizmalarda farklı mutajenik ve sitotoksik etkiler de gösterebilmektedir.

Tıbbi bitkilerin kullanımı, her zaman insanlık kültürünün bir parçası olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya popülasyonunun % 80'ine varan bir kesiminin, bazı sağlık hizmetleri açısından geleneksel tıbbi sistemlere güvendiklerini bildirmektedir. Bununla birlikte birçok tıbbi bitkinin özellikle mutajeniteleri ve karsinojeniteleri gibi toksikolojik özelliklerini gösteren raporlar da vardır (Alade, 2009). WHO, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeleri, non-toksik oldukları kanıtlanan geleneksel bitki preparasyonlarını, sağlık programlarına ilave etmeleri yönünde teşvik etmektedir (WHO, 1985).

Bitkileri kullanarak tedavi etme yöntemi olan fitoterapi, tüm dünyada ve bu tedavi yönteminin daha sistematik ve karmaşık olarak uygulandığı ülkelerde kullanılmakta ve modernleşme ile birlikte gelişmiş ülkelerde uygulanması hızla artmaktadır (Saad ve ark., 2006).

Bazı medikal bitkilerin aşırı terapötik avantajları olmasına rağmen medikal bitkilerin bazı içerikleri potansiyel olarak toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olabilmektedir. (Gadano ve ark., 2006). İlaçlar, organizmada özellikle hedef sistem üzerinde etkisini gösterirken, bitkisel ilaçlarda birçok sistem spesifik olmayan şekilde fizyolojik olarak aynı anda etkilenebilmektedir (Eagelton ve Man, 2006). Bu nedenle, tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin de, konvansiyonel ilaçlarda olduğu gibi kalite, güvenlik ve etkinlik yönünden test edilmeleri ve standardizasyonlarının yapılması gerekmektedir (Simaan, 2009). Son yıllarda bitkisel ilaçların kullanımının artmasıyla fitoterapiye ilgi de artmıştır. Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde ticari önem kazanmasından dolayı geleneksel ilaçların üretimi ve kullanımı yaygınlaşmaktadır. (Roy-Byrne ve ark., 2005).

Geleneksel tıpta, farklı etkin maddeleri içeren ilaçların aynı anda uygulanması, ilaç etkileşimleri ve yan etkileri nedeniyle genellikle tercih edilmemektedir. Fitoterapide ise saflaştırılmış aktif bileşenleri yerine bitkinin tamamının kullanılması, içerdiği farklı bileşenlerinin sinerjik etki göstermesine veya toksisitesinin tamponlanarak azalmasına neden olur (Poppenga, 2002).

Bazı bitkisel ürünlerin ise substrat, baskılayıcı veya indükleyicisi olarak, ksenobiyotik metabolizmasında önemli rol oynayan sitokrom p450'leri (CYP450) etkilemesi sonucu aynı anda uygulanan ilaçların farmakokinetiğini, karsinojen ve steroid metabolizmasını değiştirdiği bildirilmiştir. CYP450 ile toksik olmayan metabolitlere dönüşüp atılabilen bazı bitkisel maddelerin yanında, toksik metabolitlere dönüşüp zararlı etkiler gösterenler de bulunabilir. Bitkisel ürünlerden bazıları, CYP450'nin baskılanmasına neden olarak, toksik metabolitlerin oluşumuna ve prokarsinojen aktivasyonunu engelleyerek karsinogenezin azalmasına neden olurken; bazıları CYP450 indükleyici olarak davranır, bazıları ise reaktif ara ürünler ile CYP450 reaksiyonlarını etkiler (Zhou ve ark., 2004). Bu durumun tersine karaciğer ve böbrek gibi ksenobiyotik metabolizmasında önemli rol oynayan CYP450 enzimlerinin sentezlendiği organlarda yetmezliklerin olması da bitkisel ürünlerin metabolizmasını ve zehirliliklerini etkilemektedir (Steff, 2007).

Ülkemiz endemik bitki florası bakımından zengindir. Bu bitkilerin etkinliklerinin araştırılması hem ülkemiz ekonomisi, hem de halk arasındaki kullanımlarının güvenilirliğinin değerlendirilmesi bakımından önem taşır (Anonim, 2008). Bu çalışmada da ülkemiz için endemik olan *Limonium effusum* türünün ve endemik olmayan *Limonium globuliferum* türünün bazı türlerinin mutajenik etkilerini saptayabilmek ve bu doğrultuda bu bitkinin ekstrelerinin sitotoksik ve mutajenik etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

İlaç endüstrisinin temelini oluşturan bitkilerin içerikleri ve etkileri ne kadar fazla açığa çıkarılırsa insan sağlığı ve diğer canlıların sağlıkları için üretilebilecek drogların kullanılabilirliği de belirlenmiş olacaktır. *Limonium* bitkisinin ekstreleri de bu amaçla daha önceden etkileri belirlenmemiş bitkilerden bir tanesidir. Halk arasında drog olarak kullanıldığı rahatsızlıklar bulunduğu gibi bu bitkilerin ekstreleri veya doğrudan kullanımları bilinçsiz olarak yapılmaktadır.

Drog olarak kullanılan bitkilerin bazılarının mutajenik veya toksik etki gösterdikleri de bilinmektedir. Ratlarda yapılan bir çalışmaya göre, *Limonium nashii* bitkisinin tanin ekstralarının tümör oluşumuna sebep olduğu tespit edilmiştir (William ve ark., 1978). Tümörlerin oluşumlarını da serbest radikaller tetiklemektedir. Serbest radikallerin de patolojik şartların oluşumuna ve kansere sebep oldukları bilinmektedir (Murray ve ark., 2004). Bu tümör oluşturuca etkisinin yanında, kullandığımız *Limonium* türlerinin mutajenik ve sitotoksik etkileri ve bu etkinin ne düzeyde gerçekleştiği araştırılmıştır. Mutajenlerin mutajenik etkilerini göstermek amacıyla *in vitro* test sistemleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada da *Limonium effusum* ve *Limonium globuliferum* bitkilerinin distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) ekstralarının mutajenite ve sitotoksitelerini belirlemek amacıyla *in vitro* test sistemlerinden bitki dokularıyla yapılan *Allium* testi, bakteriyel bir test olan AMES testi ve memeli hücreleriyle yapılan MTT testi kullanılmıştır.

1.1. *Limonium* Bitkisinin İçeriği ve Farmakolojisi

TÜBİTAK Tüvives veritabanlarına göre (2011) 'a göre *Limonium* sp.'nin sistematik hiyerarşisi aşağıdaki gibidir.

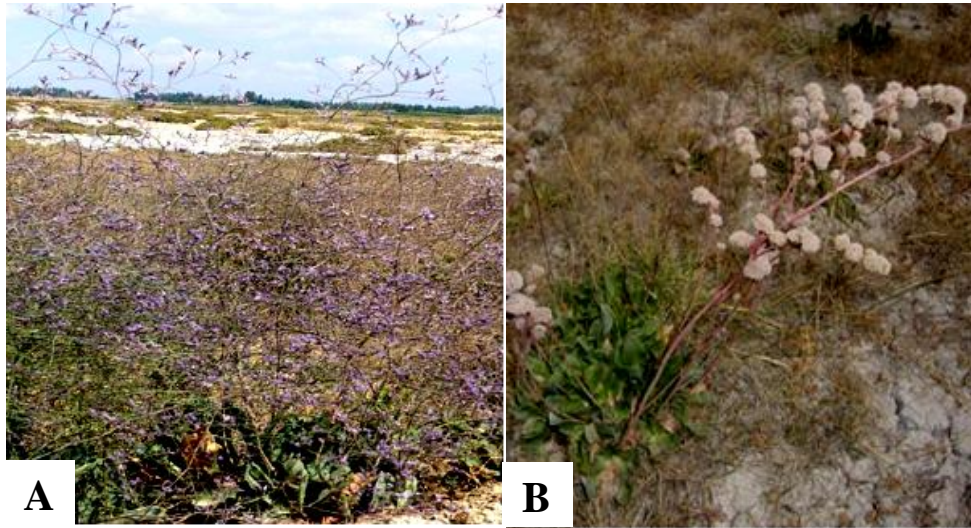
Alem	: Plantae
Altalem	: Tracheobionta
Bölüm	: Magnoliophyta Cronquist, Takht. & Zimmerm. ex Reveal
Sınıf	: Magnoliopsida Brongn.
Altsınıf	: Caryophyllidae Takht.
Takım	: Plumbaginales Lindl.
Aile	: Plumbaginaceae Juss.
Cins	: <i>Limonium</i>

Limonium cinsinin dahil olduğu *Plumbaginaceae* familyası dünyada 24 cins ve 800 tür ile temsil edilen bu familya, Türkiye'de 6 cins ve 68 tür ile temsil edilir (Davis, 1982).

Limonium bitkisi bir halofittir ve halofitler deniz kenarı ve iç kesimlerdeki tuzlu habitatlarda yayılış gösterirler. Tuza ve kurak ortamlara dayanıklı bitkilerdir.

Populasyonları, yüksek tuz stresi veya diğerk ilişkili abiyotik faktörlerin direkt etkisinden dolayı yüksek ölüm oranıyla karşı karşıyadırlar. Tohumları glikofitlere benzer olarak optimal çimlenmeyi tatlı sularda gösterirler (Zia ve Khan, 2004)

Plumbaginacea familyasına dahil olan *Limonium* bitkisi, halofit bir bitkidir ve dünyada geniş yayılım göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan *Limonium effusum* (Boiss.) Kuntze ülkemize ait endemik bir tür ve *Limonium globuliferum* (Boiss. Et Heldr.) Kuntze ise endemik değildir. *L. effusum* Acı Göl (Afyonkarahisar) çevresinden, *L. globuliferum*, ise Heybeli Kaplıcası (Afyonkarahisar) çevresi tuzlu step alanlardan toplanmıştır. *Limonium* türleri halk arasında kunduz otu, eşekkulağı ya da deve kulağı olarak adlandırılmaktadır. Bu türlerin taze yaprakları hayvanlar tarafından yenilir. Bu türlere ait fotoğraflar Şekil 1.1’de verilmiştir.



Şekil 1.1. *Limonium effusum* (A) ve *Limonium globuliferum* (B) türlerine ait fotoğraflar.

Limonium cinsinin kanamayı durdurucu etkisi, antibakteriyel, iltihap önleyici, şişmeleri önleyici, menstruasyonu ve sindirim sistemini düzenleyici etkileri vardır. Ayrıca rahim kanseri ve rahim kanama bozukluklarının klinik uygulamalarında kullanılmaktadır (Chen Xinmin, 1991; Bingwen ve ark., 1994). Son araştırmalar ise *Limonium* bitkisinin karaciğeri koruyucu etkisi olduğu, antikansorejenik ve antiviral etkilerinin olduğunu göstermiştir (Kuo ve ark., 2002; Chaung ve ark., 2003).

Süs bitkisi ve ilaç sanayinde kullanılan bu tür aynı zamanda ödem hastalığına faydalıdır. Mesane taşlarının düşürülmesine yardım edip, spazm ve ağrıları gidermektedir. İdrar yollarında biriken kum ve taşların dökülmesine yardımcı olduğu, kanı temizleyip, vücutta biriken zararlı maddelerin atılmasını sağladığı, romatizma şikâyetlerini giderdiği bildirilmiştir. (Anonim, 2006)

1.1.1. İçeriği

Limonium bitkisinin kimyasal kompozisyonu çok zengindir. Örneğin *Limonium sinense* türünde 100 gram bitkide 14,81 g protein, 15,4 g total şeker, 13,01 g kül tespit edilmişken yağ içeriği ise çok düşük bulunmuştur. Ayrıca vitaminler, taninler, alkaloidler, organik asitler, flavonoidler ve diğer bazı içerikler de tespit edilmiştir. Protein içeriğine bakacak olursak 18 çeşit aminoasit içerdiği görülmüştür. Esansiyel aminoasitler olan valin, threonin ve fenilalanin açısından zengin olan *Limonium* cinsi, esansiyel olmayan prolin, glutamik asit açısından da zengindir. Ancak metionin ve sistein aminoasitlerinin oranı ise çok düşük düzeyde tespit edilmiştir. *Limonium sinense* nispeten büyük miktarda proteinik olmayan nitrojen içermektedir (Zhen-fa ve Liang, 1991).

Limonium bitkisinin kimyasal kompozisyonu çok zengindir. Örneğin *Limonium sinense*'de yağ içeriği düşük iken 100 gramındaki protein içeriği 14,81 g, toplam şeker 15,4 g ve 13.01 kül bulunmaktadır. Ayrıca vitaminler, taninler, alkaloidler, organik asitler ve flavonoidleri içermektedir. Atomik absorpsiyon spektrofotometrisi ile inorganik element tayini yapılmış olup buna göre *Limonium* türlerinin inorganik elementlerce özellikle de iz elementler açısından zengin oldukları tespit edilmiştir. *Limonium*'un değişmez elementleri olarak potasyum (K), sodyum (Na), kalsiyum (Ca) ve magnezyum (Mg) tespit edilmiştir. Bunların içinde en yüksek düzeyde bulunanları K ve Na elementleridir. Demir (Fe) içeriği de yüksektir. İz elementlerden nikel (Ni), çinko (Zn), krom (Cr) ve kobalt (Co) içeriği de fazladır (Zhen-fa ve Liang, 1991). *Limonium bicolor* ile yapılan bir analizde ise Cu, Zn, Mn ve Fe içeriği yüksek bulunmuştur (Xiuyun ve Xian, 1991).

Limonium sinense C, B1, B2, B12 vitaminleri ve kareotenoidler açısından zengin bulunmuştur. Ayrıca bir miktar D ve E vitamini de içermektedir (Zhen-fa ve Liang, 1991).

Avaz (2010) yaptığı çalışmada FTIR analizi ile bazı *Limonium* türlerinin içeriklerini tespit etmiştir. Buna göre *Limonium globuliferum* kök metanol ve su ekstralarında epigallocatechin, flavonal, gallocatechin, mentol, timol, karvakrol, kafeik asit ve harmon bulunduğunu, yaprakların su ekstralarında ise rutin, rutinose, epigallocatechin, myrcetin, kubain, flavonol, mentol, timol, karvakrol, kafeik asit, kumarinler ve kinonları, yaprak metanol ekstralarında ise rutin, rutinose, myrcetin, sitrik asit, ellagic, myrcetin 3-O-a-L, kuercetin, flovonal, kafeik asit, taninler ve kumarinler tespit etmiştir. *Limonium effusum* yaprak metanol ekstralarında myrcetin, kubain, mentol, timol, karvakrol, harmon ve katesol tespit ederken kök su ekstralarında myrcetin, kubain, mentol, timol, karvakrol, harmon ve katesol bulurken kök metanol ekstralarında ise rutin, syringic asit, ellagic, myrcetin 3-O-a-L, kuercetin, flovonal ve kubain tespit etmiştir .

Limonium sinense'nin toprak üstü kısmından Zhu ve Jiu-rong (1994) myrcetin, quercetin bileşikleri ve bazı diğer bileşikleri izole etmişlerdir. Başka çalışmalarda ise temel olarak 3- flavanone, 5'dimethoxy-flavanone, table catechin gallate, table gallate, catechin, gallic acid ester, N- trans-p-etil kafeik amide izole etmişlerdir (Lin ve Chou, 2000; Lin ve Kuo, 2000). Murray ve ark. (2004) ayrıca *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze ile köklerinden polifenollerini izole etmişlerdir.

Limonium bicolor ile yapılan bir çalışmada suda çözünebilen polisakkarit izole edilmiştir. Disakkarit monomer yapısından oluşmuş olan polisakkaritin her bir tekrarlayan disakkarit yapısı birbirine α -1,4 glikozidik bağı ile bağlanarak kuvvetli bir polisakkarit zinciri oluşmuştur (Ka-Lin ve Li, 2004).

Bunlara ilave olarak *Limonium* bitkisi belli bir miktar alkaloidler, organik bazlar ve alifatik bileşikler içermektedirler (Zhen-fa ve Liang, 1991).

1.1.2. Farmakolojisi

Limonium sinense analizleri bu bitkinin vitamin açısından zengin olduğunu göstermektedir. Özellikle de kan hücresi materyali olan B12, B2 ve C vitaminleri içerdiği bulunmuştur (Zhen-fa ve Liang, 1991). Aynı zamanda *Limonium* bitkilerinin bolca Fe, Zn, Ni, Co ve diğer elementlerini içerdiği tespit edilmiştir. Bunlardan Fe hemoglobin için önemli bir bileşendir, Zn ise insan kan oluşumuyla ilgili enzimlerin bir bileşenidir. Ni kırmızı kan hücrelerinin rejenerasyonunu artırıcı etkiye sahiptir. Co ise demir metabolizmasında, hemoglobin sentez enzimlerinde, kırmızı kan hücrelerinin olgunlaşmasında önemli fizyolojik rollere sahiptir. Co ayrıca B12 vitaminin aktif bir içeriği olması açısından önemlidir (Zhen-fa ve Liang, 1991).

Limonium bicolor ile yapılan bir çalışmada, içeriğindeki inorganik elementlerin kanamayı durdurucu etkisindeki rolü pozitif korelasyon göstermiştir (Xiuyun ve Xian, 1991). *Limonium bicolor*'un etanol ekstraktları ve kaynatılarak çıkartılan özlerinin ratlarda kanama zamanını kısaltıcı etkisi olduğu bulunmuştur (Bingwen ve ark., 1994).

Limonium bicolor'un kimyasal kompozisyon analizlerinden elde edilen verilere göre bu bitki içeriğinde gallik asit de bulunmaktadır. Gallik asitin önemli derecede iltihabı önleyici etkisi, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gelişimini engelleyici etkisi vardır. Yine bu bitki içeriğinde bulunan luteolinin de iltihap önleyici ve antibakteriyel etkisi bulunmuştur (Zhenheng ve Hafei, 2005; Hong ve ark., 2004).

Yine karaciğer hasarı oluşturulmuş ratlarda, *Limonium* bitkisinin kökünün su ekstraktlarının ve yapraklarının alkol-kloroform ekstraktlarının karaciğeri korumada rolünün bulunduğu tespit edilmiştir (Chaung ve ark., 2003). Aynı zamanda farelerde yapılan akut toksisite testinde LD50 değeri 777,6 mg / kg olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmayla da bitkinin düşük toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Limonium bicolor'un suda çözünebilir polisakkaritleri ile yapılan hücre çalışmaları bu polisakkaritlerin HeLa hücrelerinin proliferasyonunu önemli derecede inhibe ettiğini göstermiştir (Ka-Lin ve Li, 2004). Bir başka çalışma *Limonium* bitkisinin flavanoidler açısından zengin olduğunu tespit etmiştir ve

quercetin gibi bazı maddelerin antioksidant ve antikansorejenik etki gösterdiği bulunmuştur (Zhenheng ve Hafei, 2005; Jinming, 2003).

Limonium sinense'nin alkol ekstralarının *Herpes simplex* virüs tip I'ı inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca *Limonium sinense* bitkisinin etanolik ekstralarından tanin bileşenlerinden olan Samarangenin B önemli derecede *Herpes simplex* I virüsünü inhibe etmiştir (Kuo ve ark., 2002).

Sonuç olarak *Limonium* bitkisi düşük toksisite göstermektedir. Kimyasal kompozisyonu çok kompleks olup protein içeriği, inorganik elementler, iz elementler ve vitamin açısından zengindir. Ayrıca flavonoidler, taninler, polisakkaritler ve diğer fizyolojik ve farmakolojik açıdan aktif maddeler içermektedirler. Bu cinsin kanamayı durdurma, antibakteriyel, anti kanserojenik, iltihap önleyici, karaciğeri koruyucu ve antiviral etkisi tespit edilmekle birlikte klinik kullanım alanı çok sınırlıdır. Bu nedenle *Limonium* bitkilerinin aktif içerikleri ve farmakolojik rollerini belirlemek önemlidir.

1.2. Toksik madde çeşitleri

Toksik maddeler insanların maruz kalma yollarına göre birkaç sınıfa ayrılırlar. Bunlar ilaçlar, yiyecek katkı maddeleri, pestisitler, endüstriyel kimyasallar, çevresel kirlenmeler, doğal toksinler ve evsel zehirlerdir.

Birçok insan yaşamları için bir çeşit veya daha fazla ilaç tüketmektedirler. İlaçlar biyolojik sistemler için yüksek oranda etkili bir şekilde tasarlanmakta ve sonuç olarak da bunların birçoğu potansiyel olarak toksiktir. İlaç toksisitesi yüksek dozdan veya nadir görülebilen yan etkilerinden kaynaklanmaktadır. İlaçların kimyasal yapıları çok fazla değişkenlik gösterir ve biyolojik aktivite açısından yüksek oranda çeşitliliğe sahiptirler. İlaç insanlar tarafından alınan biyolojik aktivitesi bilinen tek yabancı maddedir.

Doğrudan vücuda alınan ikinci yabancı madde de yiyecek katkı maddeleridir. Bununla birlikte katkı maddeleri düşük biyolojik aktiviteye sahiptir. Katkı maddeleri unu veya rengi değiştirmek için, bozulmayı önlemek için veya başka amaçlar için yiyeceklere katılmaktadır. Zaten yiyeceklerde doğal olarak pişirme kaynaklı veya diğer kontaminasyonlardan oluşan potansiyel toksik

maddeler bulunmaktadır. Ayrıca hayvansal gıdalarla ilgili veteriner ilaçlarından kaynaklanan ilaç kalıntıları da yiyeceklerde bulunmaktadır.

Endüstriyel kimyasallar çevresel kirleticilere dâhil edilebilirler. Kullanıldıkları veya üretildikleri işyerlerinde direkt risk taşıyabilirler. Geniş anlamda endüstriyel maruz kalma günlük yaşamda kullanılan çözücüler hatta yazı düzeltme sıvılarını bile içine alır.

Kirliliğin ana kaynağı endüstriyel işlemler ve pestisitler gibi maddelerin çevreye salınmasıdır. En fazla görünen fakat belki de en önemli olmayan kirleticisi fabrika veya enerji santrallerinden çıkan dumandır. Çevresel kirleticiler havaya, nehirlere, denizlere veya karaya dökülmektedir. Araba eksoz dumanı bilinen birkaç toksik içeriği ile temel bir kirleticisi kaynaktır. Pestisitler tahıllara, ekim alanlarına uygulanarak doğrudan tahıllar aracılığıyla veya içme suyuna karışarak doğrudan alınabilen bir kirleticidir.

Birçok bitki ve hayvan korunma veya saldırı amacıyla toksik maddeler üretmektedirler. Hayvan, bitki ve bakteri orjinli doğal toksinler, farklı toksik etkileri bulunan ve insan zehirlenmesinde önemli bir sebep olan çeşitli kimyasal tipleri kapsar. Bazı insanlar doğa güvenlidir teorisini öne sürerler fakat bu gerçekten çok uzaktır ve insan için toksik olduğu bilinen birçok maddenin orjini doğadır. Doğal toksinler yeme yoluyla, yiyeceklerde kontaminasyon oluşturarak veya bazı canlıların sokmasıyla toksik etkisini gösterir (Timbrell, 2002).

1.3. Bitkilerin Toksik Etkileri

Bitkiler yanlışlıkla temas yoluyla veya bitkilerin yenmesiyle toksik etki oluşturabilirler. Toksisitenin diğer bir kaynağı ise bile bile bazı bitkilerin yenmesidir. Toksikite olasılığı ayrıca reçete ile satılan ilaçlarla bitkisel ilaçların etkileşimine girmelerinden oluşabilir. Mesela bazı bitkiler hepatik sitokrom enzimlerini etkilemektedir. (Izzo ve Ernst, 2001).

Geçmişten günümüze bitkilerin biyoaktif kimyasalları hakkındaki bilgiler düzenli bir şekilde artış göstermiştir. Özellikle bitkisel ilaçlara ilginin artması ve tıbbi sorunlara yeni yaklaşımlar getirme çabaları bu artışı sağlamıştır. Bilhassa

tıbbi sorunlardan biri olan kanser üzerine bitkilerin toksik etkilerinin kullanılabilirliği araştırılmaktadır.

Evrimsel süreç içinde bitkiler virüsler, bakteriler ve funguslar tarafından saldırıya uğramış ve hayvanlar tarafından yenilmişlerdir. Buna karşılık bitkiler de antimikrobiyal kimyasallar ve hayvanları defetmek için çeşitli kimyasallar üretmek gibi birçok savunma mekanizması geliştirmişlerdir (Klaassen, 2008).

Bitkiler tarafından sentezlenen kimyasallar göz önünde bulundurulurken, bitkiler tarafından üretilen bir toksik kimyasalın miktarındaki değişkenlik üzerinde durulmalıdır. Bu değişkenliklerin sebebi birkaç tanedir:

1. Bitkinin farklı bölgeleri bir kimyasaldan farklı konsantrasyonlarda içerebilir. Mesela *Pteridium aquilinum* bitkisinde bulunan karsinojenik terpen yapraklarında köklerine göre daha yüksek düzeyde bulunmuştur. (Rasmussen ve ark., 2003).
2. Bitkinin yaşı bu değişkenliği sağlayabilir. *Lactuca* türlerindeki laktusin ve diğer seskuiterpenler olgunlaşma ile birlikte artmaktadır. (Sessa ve ark., 2000).
3. İklim ve toprak bazı kimyasalların sentezini değiştirebilir. Likenler güneş ışığında UV ışıklardan korunmak için daha fazla karotenoid üretirler (Klaassen, 2008).
4. Bitkilerdeki tür içi genetik farklılıklar kimyasalların sentezini değiştirebilir. Bazı bitkilerde bulunan toksik kimyasalların sentezi bazen cinse özgü bazen de familyaya özgü olabilmektedir. *Raunculus* cinsinin ürettiği anemonin kimyasalı bu bitkinin bulunduğu familyadaki diğer bazı cinsler tarafından da üretilmektedir (Klaassen, 2008).

1.4. Mutajenite Test Sistemleri

Son dönemlerde kimyasal mutajenlerin belirlenmesi için kısa zamanlı test sistemlerinin gelişiminde önemli ilerlemeler olmuştur. Bu gelişim, kimyasalların potansiyel karsinojenik aksiyonlarına yol açan kompleks işlemlerin ve kısa zamanlı testlerin riskleri nasıl belirlendiğinin anlaşılmasına dayanmaktadır. *In vitro* testler, mutasyonlar, kromozom kırılmaları ve diğer genetik etkileri belirlemek için *in vivo* testlere göre daha kullanışlı, daha ekonomik ve daha hızlı birçok testi kapsamaktadır (Barile, 2008). Sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal

maddenin kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmesi sağlığımız açısından gerekli olmakla birlikte, laboratuvar hayvanları ile yapılan kanserojenizasyon deneylerinin hem çok zaman almaları, hem de çok pahalı olmaları nedeniyle tercih edilmemektedir. (Debnath ve ark., 1991; Maron ve Ames, 1983).

Uzun zamanlı testler, uygun hayvan türleri seçilerek hayvana maddenin uygulanmasını takiben yapılan otopside patolojik ve histolojik çalışmalarla ölçülmektedir (Bağcı, 1985; Forman ve Ames, 1991). Ayrıca hayvan deneylerinde cinsiyet faktörü, yaş, veriliş biçimi ve farklı türler farklı sonuçlara neden olmaktadır. Dolayısıyla sağlıklı sonuçlar elde edilememektedir. Memelilerde mutasyon testlerinin yapılmasında en önemli zorluk memelilerin bu test sistemlerine oldukça az duyarlı olmaları yüzündendir. Bunun yanında mikroorganizmalar mutajenlere karşı çok daha fazla duyarlıdır (Vural, 1984). Canlı hayvan deneyleri yerine kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyelerini ölçebilmek için son yıllarda birçok *in vitro* test sistemi geliştirilmiştir. Kısa zamanlı testler diye bilinen bu testlerle kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Bağcı, 1985). Kısa dönemli *in vitro* çalışmalar, kimyasal maddenin bakterilerde mutajenik etkisinin hücrelerde değişmeye neden olup olmadığı, DNA değişim ve tamiri üzerindeki etkisi memelilerde mutajenik etkisinin araştırılmasını kapsar (Vural, 1984).

Mutasyonlar, normal hücre proliferasyonu, reproduksiyon, fizyoloji ve hücre biyolojisinde temel sonuçlar oluşturan DNA ve RNA'daki değişimlerdir. Mutasyonlar doğrudan veya dolaylı sonuçlar gösterebilir fakat aynı zamanda fenotipik değişikliklerle sonuçlanan gen sekansındaki sabit kalıtsal değişimler de gösterebilmektedir. Mutasyonların sonuçlarının tipi ve boyutu, doza, frekansa, uygulama süresine ve başlangıç değişikliklerine organizmanın verdiği karşılığın sebep olduğu sekonder etkilere bağlıdır (Barile, 2008).

Genetik mutasyonlardan kaynaklı değişimler, genetik bilginin transferine engel olur ve genellikle kendini letal bir etki olarak gösterir. *In vitro* testlerin avantajları birçok sayıda kimyasal hızlı bir şekilde değerlendirme imkanı vermesi, mutajenite ve karsinojenitenin mekanizmasını önermesi, hayvansal test

sistemlerinin azalması, insan ve hayvan risk tayinine katkı sağlaması olarak sayılabilir (Barile, 2008).

Kısa zamanlı testlerde sitogenetik ve bakteriyel yöntemler kullanılmaktadır.

1.4.1. Sitogenetik testler

In vivo ve *in vitro* sitogenetik testlerin üç farklı tipi klastojeniteyi göstermektedir. Bu ışık mikroskobu testleri kromozomların sayısı veya yapısındaki kimyasal olarak indüklenen değişimleri belirlemek için kullanılmaktadır. Özellikle hücre kültürü adaptasyonları çok daha kullanışlı, ekonomik ve birçok bileşiği görüntüleme kabiliyetine sahiptir. Sitogenetik çalışmaları, çevresel olarak yada çalışma ortamında klastojenlere ve radyasyona maruz kalan belirli populasyonlar için (Barquinero, 1993) ya da bireysel olarak etkilenme dozunu saptamak için kullanılabilir (Fender ve Wolf, 1998; Sram ve ark., 1998). Kimyasalların mutajenliğini araştırmada kullanılan en yaygın sitogenetik yöntemler, yapısal kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleridir (Albertini ve ark., 2000). Bu testler *in vivo* olarak laboratuvar hayvanlarında (Desesso ve ark., 2000; Topaktaş ve Speid, 1990), *in vitro* olarak da insan kan lökositleri, mesane, mide nasal ve sperm hücreleri ile çeşitli kültür hücrelerinde uygulanabilmektedir (Surralles ve ark., 1998).

Kromozom Aberasyonu

Bilinen birçok karsinojen ayrıca kromozom kırılmalarını indükleyen klastojen ajanlar olarak tanımlanmaktadır. CHO ve V79 hücre hatları ve insan lenfositleri kısa zamanlı sitogenetik çalışmalar için yaygınlıkla kullanılmaktadır (Aardema, 2006; Clare, 2006).

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

Bu test kısaca hücreler metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir (Akman, 1983; Trosko, 1997).

Mikronükleus testi (MN)

Mikronükleus ölçüm testleri, kromozom aberasyonlarının belirlenmesi için hız ve hassasiyeti bakımından diğer testlerle karşılaştırılabilir. Mikronükleuslar, özellikle de sentromer eksikliğinden kaynaklanan, mitotik hücre bölünmesi boyunca yavru nükleusa başarılı bir şekilde geçemeyen kromozom fragmentlerinden ileri gelmektedir. Analiz özellikle çoğalma özelliği gösteren kültürlerdeki çeşitli bitki ve memeli hücreleriyle kullanılmaktadır. Mikronükleus belirlenmesi için kullanılan protokoller kromozom aberasyonu için kullanılan protokollerle çok az farklılıklar içermektedir (Parry ve Parry, 2006).

Mikronükleus hücre çekirdeğinin dışında sitoplazmada yer alan çekirdek orjinli küçük küresel bir oluşumdur. Mikronükleus içeren hücre sayısındaki artış, maruz kalınan klastojenik (DNA'yı hedefler, kromozom kırılmalarına neden olur) veya aneujenik (kromozom sayısının değişimine etkilidir, genellikle DNA'yı hedef almaz) ajanların genotoksik etkilerini yansıtan bir belirteçtir. Mikronükleus testi bölünme yeteneğine sahip tüm hücrelerde yapılabilen bir testtir. Temel prensibi, bazı mitoz anomalileri ve kromozom kaybı gibi durumların ortaya çıkarılmasına yöneliktir (Trosko, 1997; Majone, 1990).

Kısa zamanlı sitogenetik testlerin sınırlamaları

Kültüre edilmiş hücrelerin metabolik biyotransformasyon potansiyelleri eksiktir. Bu da metabolize olmayan temel kimyasalların genotoksitesinin belirlenmesini sınırlandırmaktadır. Mikrozoal enzim preparasyonları, besleyici katmanlar ve kültür kombinasyonları, metabolize edici enzimlerin eksikliğinde ilave edilebilirler. Kromozom aberasyon testi daha duyarlı ve güvenilir bir test iken, KKD ve mikronükleus testlerinden daha yorucu ve pahalıdır (Barile, 2008).

Planlanmamış DNA sentezi (PDS)

Hem *in vivo* hem de *in vitro* memeli hücreleri devamlı olarak doğal veya deneysel yollardan kimyasallara maruz kalarak saldırıya uğramaktadırlar. Bu hücreler, evrimsel seçim yoluyla hasarların onarımını gerçekleştiren savunma sistemlerini geliştirmişlerdir. Planlanmamış DNA sentezi işleminin onarım mekanizması iyi tanımlanmıştır. Bu toksikoloji testinin prensibi, test kimyasalları ile muamele boyunca veya sonrasında, kültür hücrelerine [³H]-TdR (3H-Timidin) katılması esasına dayanmaktadır.

Sonraki enzimatik onarım işlemleri, kimyasal saldırının bir sonucu olarak oluşan DNA parçalarının var olduğu hücrelerin tanımlanmasıyla başlatıldığından, planlanmamış DNA sentezi testi DNA hasarının indirekt ölçüm metodudur. Primer DNA yapısı oluşan parçaların çıkarılması, DNA polimerizasyonu ve sonraki ligasyon işlemleri sayesinde yeniden eski haline dönüştürülmektedir. Analiz, sırasıyla otoradyografi veya sıvı parlamalarının sayımı ile yarı kantitatif veya kantitatif veri üretmektedir (Williams, 1977).

Hücre transformasyonu

Hücre transformasyonu için kısa zamanlı testler, kimyasal olarak indüklenen *in vivo* kanserler için, hassasiyet ve mekanistik olarak geçerli *in vitro* modelleri içermektedir. Malignant transformasyon, karsinojenik indüksiyon ile ilişkili fenotipik değişikliklere eşlik etmektedir. Testler, test bileşiklerinin karsinojenik potansiyelleri ve transforme kabiliyetlerini (hücre morfoloji veya büyüme karakteristiklerindeki değişiklikler gibi) tespit etmek için oluşan değişikliklerin sonuçlarını kullanmaktadır.

Testlerin yeniden üretilebilirliğin eksikliği, aşırı çeşitlilik ve bazı sonuçların yorumlamalarında karşılaşılan subjektif yorumlardan kaynaklanan problemleri vardır (Barile, 2008).

Fokus transformasyon analizi

C3H/10T1/2 ve BALB/c 3T3 fibroblast ölümsüz hücre hatları bu analizde kullanılmaktadır. Bu hücreler, özellikle devamlı proliferatif özellikleri ve *in vivo* tümör oluşturuca eğilimlerinden, ölümsüz memeli kültürlerinin karakteristik yapılarını göstermektedirler. A549 gibi diğcr insan ve kemirgen ölümsüz hücrelerinden farklı olarak, insan akciğcr karsinoma ve insan kolon karsinomasından (Caco-2) türevlenmiştir. Bu ölümsüz hücreler tek tabaka kültürlerde odaklar oluştururlar (Barile, 2008).

Tip I odaklar malignant olarak transforme olmuş gibi hesaplanmaz; bunlar sıkı paketlenmiş odaklardır ve tek tabaka kültürler, konakçı hayvana inokülasyondan sonra tümör oluşturuca değillerdir.

Tip II odaklar yoğun, üst üste gelen çok tabakalı hücre ağlarını göstermektedir.

Tip III odaklar yoğun bir şekilde boyanmış üst üste gelen çok tabakalı hücre; büyüme modellerinin kenarları düzensiz ve konakçı hayvana enjekte edildiğinde tümör oluşturuca. Analizin, *in vivo* oluşan çok aşamalı karsinojenlerin teşvikinin belirlenmesinde ve anlaşılmasında belirli bir değeri vardır.

Kardeş kromatid değişimi (KKD)

Kardeş kromatid değişimi (KKD) kromatidlerin homolog bölgeleri arasındaki replike olan DNA'nın crossing over olayını içerir. Kromozom aberasyonundan farklı olarak değişim morfolojik değişiklikleri içermez ve kardeş kromatidlerin ayırt edici etiketleme yöntemiyle, değişimi tespit etmektedir. Transkribe olan DNA'nın BrdUrd (Bromodeoksiüridin) etiketlemesinin bir boya ile kombine edilmesiyle metod uygulanmaktadır. BrdUrd'nin hücrelere katılması, S fazındaki hücrelerin fraksiyonlarının kesin olarak tahmin edilmesinde, yalnızca [³H]-TdR uygulanmasıyla yapılan DNA ölçümü işleminden, daha etkilidir. Optimal metod ise eşzamanlı olarak hem DNA içeriğinin hem de hücrelere katılan BrdUrd'nin ölçülmesidir. Protokol, kültür medyumuna BrdUrd etiketinin

eklenmesi haricinde karyotip analizine ve kromozom aberasyonunun belirlenmesine benzerdir. KKD ve karsinojenite arasında kuvvetli bir korelasyon olduğu kabul edilmektedir. Buna ilave olarak KKD kromozom aberasyonlarının belirlenmesinden daha az zahmetli bir testtir. Bu da KKD testinin, karsinojen ve genotoksik ajanlar için kullanışlı ve dominant bir kısa zamanlı test olduğunu doğrulamaktadır (Barile, 2008).

KKD testi toksik madde-DNA etkileşimini açığa çıkarmadaki duyarlılığı ve genotoksik kimyasalların kültüre edilmiş yada muamele edilmiş hayvanlardan alınan örneklerinde KKD 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). KKD yönteminin prensibi, kardeş kromatidlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanmasına dayanır. Kardeş kromatidlerde meydana gelen parça değişimi, boyanma farklılığından hemen anlaşılır. Bu yöntemle sadece kromozomlarda oluşan yapısal değişimler gözlemlendiğinden dolayı KKD yöntemi sınırlı amaçlar için kullanılabilir (Trosko, 1997; Bakale ve Mc Creary; Galli ve Schiestl, 1996).

1.4.2. Comet testi

Bu yöntem iplik kıvrılmaları, çapraz bağlanma, alkali labile site gibi DNA hasarlarını ve kesme-çıkarma onarım bölgelerindeki hataları bir jel sistemi kullanılarak belirleyebilmektedir (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve ark., 1988). Uygulamada kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücrelerindeki DNA hasarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Albertini ve ark., 2000). Comet testi hücre metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir (Chetalat ve ark., 1996; Kasamatsu ve ark., 1996).

1.4.3. Bakteriyel yöntemler

Kısa zamanlı testler hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde potansiyel karsinojen ve mutajenleri tespit etmek için kullanılmaktadır. Prokaryotlar bakteri ve siyanobakterileri içerirler. Bakteriyel test sistemleri,

büyüme ve çoğalması, besiyeri içinde sınırlı oranda bulunan temel bir besinin (genellikle amino asit) varlığına bağlı olan oksotrof organizmaları kullanmaktadır. Buna karşılık normal veya yabancı tip prototrofik organizmada mutasyon yoktur. Böylece büyüme ve çoğalması için ilave bir besine ihtiyaç duymaz.

Bakteriyel testlerin temeli (1) bileşen bağımlı suşlardan yabancı tiplere geriye mutasyonların indüksiyonuna (2) ilave ajan eklenmesiyle oluşan fenotipik değişiklikleri tanımlayan ileriye mutasyonların indüksiyonuna bağlıdır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Bakteriler gecelik kültürlerinde çok sayıda gelişirler ve nadir mutasyonel olayların saptanmasına olanak tanırırlar. Ayrıca bakteriyel genetik bilgi ve deneyimlerin artışı, çeşitli ajanlara karşı yabancı tiplerinden daha hassas olan özel bakteri mutanlarının oluşturulmasına olanak sağlanmıştır. Ayrıca bakterileri kimyasal ve fiziksel ajanlarla mutasyona uğrama açısından daha hassas hale getirebilmek için, çeşitli işlemler uygulanmaktadır (Gatehouse ve ark., 1990).

UMU (SOS) test sistemi

UMU test sistemi, kimyasal ajanların genotoksik etkilerini saptamak amacıyla kullanılan kolorimetrik, bakteriyel bir test sistemidir (Quilerdet ve Hofnung, 1985). SOS cevabı esas alınarak geliştirilmiştir ve regülatör bir sistem olan SOS sistemi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içerisinde ilk olarak karakterize edilmiş olan en kapsamlı, en kompleks ve en iyi anlaşılmiş sistemdir (Oda ve ark., 1985; Walker, 1985). UMU test sistemi, diğer SOS-cevap genlerinden çok daha dolaysız bir şekilde mutajenez ile ilgili olduğu düşünülen UMU operonunun ifade edilme düzeyini saptamaya dayanır. Bu test için tek bir bakteri suşu gereklidir. Yüksek bakteriyotoksik etkilere sahip olan kimyasalların teşhisinde kullanılabilir. UMU test suşu olan TA 1535/pSK1002'ye eklenen çok kopyalı plazmidler, NR (nitroantren) geni, NAT (N-asetil transferaz) geni yada her ikisini bakteriye aktarmaktadır. Sonuç olarak bu bakteri suşu DNA hasarına sebep olan “nitroantren” ve “aromatik aminler” e karşı hassasiyet kazanır (Josephy, 1997).

Özet olarak çeşitli faktörler *in vitro* mutajenite testlerinden elde edilen heterojen sonuçlara katkıda bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri:

1. Prokaryotik hücrelerde hücrel biyotransformasyonun eksikliği.
2. Prokaryotik hücrelerdeki DNA tamir mekanizmalarının kararsızlığı.
3. Memeli hücre kültürü sistemlerindeki detoksifiye enzimlerinin düzensiz varlığı.
4. Mutajenik ajanların belirli sınıflarına karşı *in vitro* metodların hassasiyet seviyelerinin değişkenliği.
5. Sonuçları, *in vivo* muameleleri yansıtmayan *in vitro* testlerin, yüksek düzeydeki hassasiyetleri.

Çevresel faktörler, spontan mutasyonların oranları, canlının normal şartlar altındaki biyolojik fonksiyonları ve gen yapısı ilişkileri hesaba katıldığında bu dinamikler, muamele edilen kimyasallar ile ilişkili zıt etkileri önlemek için düzenleyici test şemalarının gelişimini artırabilir.

In vivo modellerle uyumlu *in vitro* mutajenite test teknolojisinin geliştirilmesi ile önemli bir dönüm noktası başarılmış olacaktır. Gereksiz hayvan kullanımını azaltmak için uygulanabilir *in vitro* test sistemlerinin geliştirilmesi önemli bir amaçtır (Barile, 2008).

1.5. Hücre Kültürü

Farklı dokulardan üretimi sağlanan hücre kültürleri primer hücre kültürleri, devamlı hücre kültürleri ve diploid hücre kültürleri olmak üzere üç grupta toplanmaktadır.

1.5.1. Primer Hücre Kültürü

Orijinal dokudan yeni ayrılan ve ilk olarak kültür şartlarında bulunan hücrelerden oluşmaktadır. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücrelerin genotipi ve fenotipi, orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri taşımaktadır. Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınmaktadırlar. Bu işleme *subkültür* adı verilmektedir. Yeni üretilen hücre kültürleri aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatlarını oluşturmaktadırlar. Hücre hatları, hücrelerin alındığı dokuların özelliklerine göre değişmek şartı ile farklı oranlarda

subkültüre izin vermektedirler. Ancak bu hücrelerin deneysel ortamlarda çoğalmaları sınırlıdır (Hanks ve ark., 1996; Davis, 1996; Spier ve Griffiths, 1985).

Primer hücre kültürleri, üretim aşamalarının zor olmasına, hassas hücreler olmalarına, çalışma esnasında ortaya çıkabilecek sorunlara ve kontrollerinin son derece güç olmasına rağmen orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri nedeniyle değer kazanmışlardır (Browne, 1988; Mjör ve Hensten-Pettersen, 1983).

1.5.2. Devamlı Hücre Kültürü

Subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir. Herhangi bir kültürün, devamlı doku kültürü olabilmesi için en az 70 kere subkültürünün olması gerekmektedir. Transförmasyonları nedeniyle fizyolojik özelliklerini koruyamamaktadırlar. Devamlı hücre hatları, standart kültür örnekleri olarak embriyonik veya kanserli dokulardan kodlanmış ve kullanıma sunulmuştur (Spier ve Griffiths, 1985).

1.5.3. Diploid Hücre Kültürü

Primer kültürlerin subkültürlerinin yapılmasından elde edilmektedirler. Ancak bu kültürlerdeki bütün hücreler, alındıkları dokunun karyotipini % 85 oranında korumaktadırlar. Diploid kültürlerde bazı hücrelerde kromozom tipleri kaybolabilmektedir (Spier ve Griffiths, 1985).

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde primer hücrelerin devamlı hücrelere oranla daha etkili oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte, primer ve devamlı hücre kültürlerinin sitotoksik maddeye verdikleri metabolik cevaplar arasında bazı farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Devamlı hücre kültürleri genetik ve metabolik olarak stabil olduklarından test sonuçlarının standardizasyonu daha kolaydır (Schmalz, 1994; Feigal ve ark., 1985).

1.5.4. Hücre kültürünün avantajları ve dezavantajları

Avantajları

Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilmektedir. Sıcaklık, pH, osmotik basınç,

oksijen ve karbondioksit kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanırken, canlı vücudunda sabit bir çevre oluşturarak birtakım testleri yapmak daha zordur.

Örnek homojenitesinin kontrolü sağlanabilmektedir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Ancak birkaç pasaj sonra kültüre edilmiş hücreler homojen hale gelebilmektedir. Hücrelerin homojenitesi, elde edilen ürünlerin homojenitesi açısından son derece önemlidir. Bunun sağlanmasının bir diğer yolu da çalışan kişilerin homojenitesi ve çalışmaların aynı koşullarda yapılmasıdır.

Hücre kültürleri ekonomiktir. *In vivo* sistemlerde test için canlı organizmaya verilen maddelerin bir kısmı çeşitli yollarla dışarıya atılacak, bir kısmı da organizmanın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılacaktır. Bu koşullarda canlı bir organizmada verilen maddenin ancak % 10'una cevap alınabilirken, hücre kültürlerinde bu oran % 90'lara çıkabilmektedir.

Hücre kültürleri ürün elde edilmesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilir. Son yıllarda geliştirilen teknikler ile bu daha kolay hale gelmiştir (Freshney, 1986).

Dezavantajları

Primer kültür ile başladığında, birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Yani hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusudur (Kallus, 1984).

Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir.

Deneyim çok önemli bir faktördür. *In vitro* çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme uzmanlık gerektirmektedir.

Hücre kültürleri, *in vivo* yöntemlere oranla daha ekonomik olmasına karşın kullanılan hücre üretme vasatları ve diğer malzemeler son derece pahalıdır. Buna rağmen elde edilen ürünün saf olması önemli bir avantajdır. Ancak son yıllarda bu teknolojinin gelişmesi, kullanılan malzemelerin geliştirilmesine ve giderek daha da ucuzlamasına olanak tanımaktadır (Freshney, 1986; Davis, 1996; Kang ve ark., 1993).

1.6. MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) hücre hattı

MDBK hücre hattı Madin ve Darby tarafından normal yetişkin bir boğanın (*Bos taurus*) böbreğinden türevlenmiştir. Bu hattın bir sığır virüsü (BVDV) ile enfekte olduğu öğrenilmiştir. Daha sonra Van Deusen adlı araştırmacı ATCC'ye bu virüsün enfeksiyonuna uğramamış MDBK hattını bulduğunu bildirmiştir. Hücre hattı NBL-1 olarak da bilinmektedir. Yapışık ve epitelyum benzeri hücrelerdir (Anonim, 2011).

1.7. Bu Çalışmada Kullanılan Test Sistemleri

1.7.1. *Allium* testi

Allium testi kimyasallar, kirleticiler ve kontaminantlar için hızlı bir tarama prosedürüdür ve böylelikle çevresel riskleri göstermektedir. Kök büyüme inhibisyonu ve kromozomlar üzerine olumsuz etkilerin belirlenmesi, muhtemel toksisitenin gösterilmesini sağlar. Bitkilerde kök uçları, toprak veya sudaki kimyasallar ve kirleticilerle temas eden ilk kısımdır. Soğanın (*Allium cepa*) kök ucu sisteminin gözlenmesi, bu bitkinin çevresel kontaminantlar gibi zararlı etkilere karşı özellikle duyarlı olduğunu göstermiştir. Yeni gelişen kök sistemlerinin gelişiminin inhibisyonunun ölçülmesiyle oluşan bariz etkilerin miktarı belirlenebilirken, kök ucu hücrelerinin kromozomlarının incelenmesi muhtemel mutajenik etkileri gösterebilir (Fiskesjö, 1985).

Toksisite, test edilen kimyasalların toksik durumlarını belirlemek için hasar derecesinin kullanıldığı makroskobik parametrelerle (büyüme inhibisyonu gibi) birlikte mutajenezi kanıtlamak için kromozom kırık ve hasarlarının oranlarının belirlendiği mikroskobik parametrelerle de ölçülebilir (Grant, 1982).

Bitkilerin saklanması ve taşınması kolaydır. Aynı zamanda bitkileri elde etmek hem ucuz hem de kolaydır. Genellikle bitki hücrelerinin kromozom şartları iyidir, buda kontrol şartlarında yüksek bir standart sağlamaktadır. *Allium* testi nispeten kısa ve kolay bir test sistemidir. Bu test sistemi yüksek duyarlılığa sahiptir ve yeniden elde edilebilir sonuçlar vermektedir. Birkaç test sistemiyle karşılaştırılabilen sonuçlar sağlayan bir testtir. Gözlenebilen makroskobik ve mikroskobik etkiler arasında iyi bir korelasyon vardır. Makroskobik etki (kök

büyümesinin inhibisyonu) en duyarlı parametre gibi görülmektedir. Mikroskobik incelemeler kromozom hasarlarının ve hücre bölünme bozukluklarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu da toksik etkinin veya potansiyel mutajenitenin mekanizması veya önemi hakkında ilave bilgiler sağlamaktadır (Fiskesjö, 1985).

Kök hücreleri bazı karışık fonksiyonlu oksidaz enzimlerine sahiptir ve bunlar birçok promutajenin mutajene aktive edilmesinde kullanılan enzimlerdir. Bu aktive edici sistem, reaktif bir metabolit aracılığıyla toksik etkilerini kullanan kimyasalların tespitini kolaylaştırır. Bu sistemin, saf maddeleri, içme sularını, doğal suları ve endüstriyel atıkları ve bitki ekstraktları gibi madde veya çözeltilerin test edilmesinde geniş bir kullanım alanı vardır ve çevresel kimyasalların toksisite sıralaması ve değerlendirilmesinde kullanışlıdır (Fiskesjö, 1981; Fiskesjö, 1983; Fiskesjö, 1985).

Test, kök sistemlerinin gelişimi üzerine herhangi bir açık etki olmaksızın geniş bir pH aralığında (3.5-11.0) çalışabilmektedir. pH tek başına köklerin gelişimini etkilemese de bazı durumlarda pH iyonizasyon durumunu değiştirmesiyle toksik potansiyeli çarpıcı bir şekilde değiştirebilir. Bu durum bileşiklerin toksisitesinin değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulmalıdır.

Sistemin dezavantajları test edilen bileşenlerin fiziksel halleriyle ilişkilidir. Başka bir problem sularda veya endüstriyel atıklarda bulunan çözünemeyen bileşenlerdir (Fiskesjö, 1985).

Allium test yüksek oranda hassastır ve diğer test sistemlerinde test edildiğinde zararlı olmadığı varsayılan birkaç bileşen için pozitif toksik etkiler verebilir. Bu bazen hatalı pozitif sonuçlarla sonuçlanmasına rağmen bu ayrıca kontaminasyonların gözden kaçmamasını sağlar. Bu, özellikle kompleks karışımlar test edildiğinde önemlidir (Fiskesjö, 1985).

1.7.2. AMES Test (*Salmonella* / mikrozoom test)

Ames testi bakteriyel 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 (Russell, 1998; Gatehouse ve ark., 1990; Friedberg, 1995). Bu testin

devam eden popülaritesi DNA'ya zarar veren tehlikelerin (genotoksik) teşhis edilmesi ve yüksek hassasiyetteki mutajenez biyokimyasal mekanizmaların açıklanması yeteneği ile bağlantılıdır (Josephy, 1997). Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (his G, his C ya da his D) gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Ayrıca histidin mutantlarına ek olarak bu mutantlara bazı diğer mutasyonlar ilave edilir.

Bu testin temeli, yapay *Salmonella typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (his⁻ = oksotrof) olan suşlarının test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip his⁺ hale geri dönüşmesine dayanır. Geri dönüşen (revertant) bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde de mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakteriler olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan revertant koloni sayısı sayılması gerekir (Maron ve Ames, 1983). 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.

Reversiyon test yöntemi uygulamalarında, farklı özelliklerde geliştirilen ve çeşitli amaçlarla kullanılan *Salmonella typhimurium* test suşları dışında *E.Coli*'nin bazı suşları da yer almaktadır. Bu bakteri kültürleri de aynı prensibe uygun olarak, triptofan E lokusunda oluşturulan mutasyonla, oksotrof hale getirilmiştir. Bu şekilde geliştirilen *E.coli* WP2 uvr A (pKM 101) ve *E.Coli* WP2 (pKM101) suşları AT baz çifti mutasyonu taşımaktadır (Gatehouse ve ark., 1990).

Salmonella typhimurium LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş suşlarının genetik özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Histidin mutasyonu: Her test suşu histidin operonunun değişik bölgelerinde ya operondaki baz değişimleri ya da çerçeve kaymasına yol açan baz ilavesi veya çıkarması ile mutant hale getirilmiştir.

His G 46 mutasyonu: His G geni bakteriler tarafından histidin sentezinde kullanılan ilk enzimi kodlayan gendir. Bu mutasyon TA 1535 ve TA 100 mutantlarında vardır. His G geninde lösin amino asidinin kodunu –GAG- baz çifti değişimi sonucu prolin amino asidi kodunu olan –GGG- dönüşmüştür. Bu

mutasyon her iki mutantda da baz çifti değişimlerine neden olan mutajenik kimyasallar tarafından geri dönüştürülür.

His D 3052 mutasyonu: His D geni de histidin sentezinde kullanılan histidinol dehidrogenaz enzimi kodlamaktadır. Bu mutasyon gendeki tek bir nükleotidin eksikliği sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. TA 98 ve TA 1538 mutantlarında vardır.

His D 6610 mutasyonu: Bu mutasyon gene bir nükleotid eklenmesi sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. Mutasyonda etkilenen bölgede beş yerine altı sitozin dizisi bulunmaktadır.

His G 428 mutasyonu: "ochre" stop kodonu varlığından dolayı His G geni inaktif durumdadır. Başlangıçta geliştirilen His- mutantlarının çeşitli test maddelerine karşı duyarlılığını arttırmak için bu suşlara aşağıdaki mutasyonlar eklenmiştir.

Rfa mutasyonu: Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelmiştir. Lipopolisakkarit tabakanın kısmen yok olması ile normalde hücre içine giremeyen büyük moleküller hücre içine girmektedir.

UvrB mutasyonu: Bu mutasyon DNA onarım sisteminde kesip-çıkarma görevini üstlenen enzimini kodlayan UvrB genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. Delesyon sonucu "chl" ve "bio" genleride çıkarılmıştır. Bio geni bakterinin biotin sentezinden sorumlu bir enzimi kodlamaktadır. Dolayısıyla bakterilerin üreyebilmeleri için histidin amino asidinde olduğu gibi biyotin amino asidine ihtiyaç vardır.

R faktörü: Amplicin dirençlilik geni olup bu geni taşıyan bakterilerde normalde hücrelerde bulunan ve hata frekansı yüksek olan DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve gerek pozitif sonuçlarının artmasına, gerekse spontan olan mutasyonların artmasına neden olur. R faktörüne sahip olmayan suşlar zayıf mutajenik sonuçlar verirken R faktör genini taşıyan pKM 101 plazmidine sahip yeni suşlar oldukça kuvvetli sonuçlar vermişlerdir (Durusoy ve Kambur, 2003; Cerna ve ark., 1998; Nakamura ve ark., 1992).

Diğer bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik olan unsur, memelilerde detoksifikasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin

olmayışıdır. Bu sistem pek çok kimyasal grubu reaktif olmayan hale getirirken, bazı bileşikleride DNA ile etkileşime girebilen yüksek ölçüde elektrofilik, mutajenik hatta karsinojenik forma dönüştürmektedir (Haack ve ark., 2001). Mutajenik etkisi test edilen herhangi bir ajanın bu enzim aktivasyonunun etkisi ile nasıl bir potansiyele sahip olacağını belirlemek kaçınılmazdır. Bu yöndeki sakıncanın giderilmesi için memeli laboratuvar hayvanlarından izole edilen karaciğer enzim ekstresi bakteriyel sisteme dahil edilerek testler prosedüre uygun olarak tekrarlanmaktadır.

En yaygın olarak kullanılan enzim preparatı, sıçanların, enzim aktivasyonu uyarılmış olan karaciğer dokularından homojenize edilen post mitokondriyel süpernatandır (Hass ve ark., 1986; Vrijssen ve ark., 1990). Bu materyal, ilaç metabolize edici enzimlerin bir çeşidini, sitokrom bağımlı monooksijenazları, sitokrom bağımsız oksidazları, amidaz, esteraz, glutatyon-S-transferaz, sülfotransferaz, açıl transferaz, metil transferaz, dehidrogenaz ve peroksidazları içermektedir. Enzim özütü, kofaktörler, tuzlar ve tampon sistemle tamamladığında, S9 karışımı adını almaktadır.

Ames yönteminde pozitif sonuç veren bir ajan için, insan ya da diğer memeliler de mutajenik veya karsinojeniktir denilemez. Bakteriyel mutasyonun pozitif olması, ajanın potansiyel zararı konusunda bir ön uyarı anlamı taşır. Ayrıca yüksek organizmalarda yapılacak olan daha kapsamlı çalışmaları yönlendiren önemli bir belirteçtir.

1.7.3. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi

İlaç geliştirme çalışmalarının prelinik aşamasında ve toksikolojik araştırmalarda hücre kültürü yöntemi ile sitotoksisite çalışmaları hem hayvan deneylerinin azaltılmasını; hem de sistemlere yönelik özel etkilerin moleküler düzeyde anlaşılmasını sağladığından günümüzde zorunlu hale getirilmiştir. Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan ölümsüz hücre hatları ise çalışmaların primer hücre kültürlerine göre daha hızlı, ucuz ve güvenilir olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2002).

Doğrudan veya dolaylı olarak hücre sayısını belirlemek için iki yöntem vardır. Doğrudan hücre sayımı yönteminde tüm hücreler sayılırken dolaylı

yöntemler canlı hücrelerin besiyeri ortamındaki parametrelerde gerçekleşen değişikliklere dayanmaktadır (Genç ve ark., 2002). MTT analizi, hücre proliferasyonunu ölçen indirekt bir yöntemdir, fakat MTT mitokondriyal aktivasyonu ölçen bir indikatördür. MTT testi hücre kültürü esasına dayanan indirekt olarak hücre büyümesi veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılığı testidir (Doğan ve ark., 2004). Birçok araştırmacı tarafından sitotoksisite araştırmalarında kullanılmaktadır (Mohamed ve ark., 2000; Ali ve ark., 2001). MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. MTT kolorimetrik tayini, canlı hücrelerin çözünebilir tetrazolium tuzunu [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür] çözünemeyen formazan çöküntüsü haline dönüştürmesi yeteneğini belirleyen bir testtir. Hızlı ve doğrudan dehidrogenaz aktivitesini ölçer. Bilhassa MTT mitokondriyal elektron transport sistemindeki sitokrom b, c bölgeleri ve ubikuinon bölgesinde ve süksinat dehidrogenaz aktivitesi sonucuyla redüklenir. Bu reaksiyon sarı renkli tuzları, spektrofotometrik olarak konsantrasyonları belirlenebilen organik çözücüler içerisinde çözünebilir mavi renkli formazan kristallerine dönüştürür (O'Hare ve Atterwill, 1995). Tetrazolyum tuzlarının formazan ürünlere dönüşümü, NADH veya NADPH'in azalmasıyla meydana gelir. NADH dehidrogenazları solunumun enerji üreten reaksiyonlarında: glikoliz, kreps döngüsü ve oksidatif fosforilasyonda rol alır. NADPH dehidrogenazları ise biyosentetik üretim reaksiyonlarında görev alır. Bu dehidrogenazlar genelde mitokondrilerde yer alırlar. Formazan kristalleri DMSO, izopropanol ya da formazan ürünlerinin çözülebildiği ve rapor edilen diğer uygun çözücülerde çözüldükten sonra çözünen boyanın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Subhashini ve ark., 2005). Oluşan formazan tuzlarının miktarı direkt olarak hücre sayısının oranını gösterir (Holst ve Oredsson, 2005).

Bu tekniğin birçok avantajı yüzünden bugün bu teknik geleneksel teknikler üzerinde önemli bir avantaj sağladığı düşünülmektedir. Hızlı, çok yönlü, kantitatif ve yüksek düzeyde yeniden üretilebilirliğe sahip bir tekniktir. Geniş bir alanda kullanıma sahip olan teknik, antitümör ilaç belirleme programlarında (Ruben ve Neubauer, 1987; Alley ve ark., 1988; Carmichael ve ark., 1988), yüzen hücreler olan lösemi ve akciğer karsinoma hücrelerinde, hücre proliferasyon

alışmalarında, ilaçlarla tetiklenen hücre ölümlerinde ve MTT substratından formazan ürünü oluşturan enzimatik aktivite kaybında kullanılmaktadır. MTT testi her hücre hattı için uygulanabilir bir testtir. Optimal sayıda hücre ekimi, deney süresi, ve MTT inkübasyon süresi değerlendirilebilir optik dansite için gerekli parametrelerdir (Mosmann, 1983).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Bitki Ekstraksiyonu Yöntemi

Limonium effusum ve *Limonium globuliferum* bitkileri Acıgöl ve Heybeli Kaplıcası (Afyonkarahisar) bölgelerinden toplandıktan sonra Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbariyumu'nda taksonomik sınıflandırılması Doç. Dr. Mustafa Kargıoğlu tarafından yapılmıştır. Oda şartlarında kurutulmuş bitkilerin kök, gövde ve yaprakları birbirlerinden ayrılıp her bir kısım ayrı ayrı toz haline getirilmiştir. Çözücü olarak bu çalışmada distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) kullanılmıştır. Distile su ekstraksiyonu Sofowora (1999)'ya göre yapılmıştır. Kapalı şişelere konulan toz halindeki 25'er gramlık bitki örneklerine 250 ml distile su eklendikten sonra toz halindeki bitkiler 80°C'de 30 dakika su banyosunda bekletilmiş ve daha sonra ekstreler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kısım alınıp filtre kağıdından geçirilmiştir. En son elde edilen ekstrelerin çözücüleri, 45°C'deki rotary cihazında vakumla uçurulmuştur. Metanol ve aseton:metanol (2:1) ekstreleri Sirohi ve ark. (2009)'nın ekstraksiyon protokollerinin modifiye edilmesi ile elde edilmiş olup 25'er gram örneklerden alınıp üzerlerine 250 ml çözücülerden eklenmiştir. 24 saat oda sıcaklığında bekleyen ekstreler, distile su ekstraksiyonunda anlatıldığı gibi santrifüj edilmiş ve rotary cihazında çözücüleri uçurulmuştur. Hazırlanan 100 g/L çözelti stok olarak kullanmış ve deneylerde kullanılan çözeltiler deney esnasında bu stok çözeltiden taze olarak hazırlanmıştır.

2.2. *Allium* Test

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak soğan (*Allium cepa*, 2n=16) kullanılmıştır. Kimyasal madde olarak da fuksin, potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$), glasiyal asetik asit, metanol kullanılmıştır. *Allium* testi, Fiskesjö (1985)'den modifiye edilerek yapılmıştır.

2.2.1. EC 50 konsantrasyonunun belirlenmesi

1. Soğanların kuru kök kısımları kazandıktan sonra 24 saat süreyle distile suda bekletilip köklendirilmiştir (her bir konsantrasyon için 8 adet).
2. Homojen (büyüklük ve ağırlık açısından) olan soğanlardan her bir konsantrasyon için 5'er adet seçilmiştir.
3. Bu soğanlar daha sonra 96 saat belirtilen konsantrasyonlarda ve kontrol grubunda bekletilmiştir. Çözeltiler hergün değiştirilmiştir.

Bu sürenin sonunda kontrol grubundan elde edilen kök uzunluklarıyla, konsantrasyonlardaki kök uzunlukları karşılaştırılmıştır. Kontrol ve farklı konsantrasyonların her birine ait 5'er soğandan 10 kökün uzunluğu (mm) ölçülerek, o konsantrasyona ait ortalama kök uzunluğu belirlenmiştir (her konsantrasyon için 50 kök = 5 soğan × 10 kök). Ortalama kök uzunluğunu kontrole göre %50 azaltan konsantrasyon değeri, etkili konsantrasyon (EC50) değeri olarak tanımlanmıştır.

2.2.2. Kromozom aberasyon testi

Allium cepa'nın kök ucu meristem hücrelerinin hücre döngüsünün 24 saattir (Elçi, 1994). Bu durum dikkate alınarak, mitotik indeks ve kromozom aberasyonları için her bir konsantrasyonun uygulama süreleri 24, 48 ve 72 saat olarak yapılmıştır.

1. Distile suda 24 saat süreyle bekletilen soğanlardan homojen uzunluktaki köklere sahip soğanlar, etkili konsantrasyon (EC50), yarısı (EC50/2) ve iki katı (2×EC50) olan konsantrasyonlara 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır.
2. Her muamele için 7'şer adet soğan kullanılmıştır. Fiksasyon, boyama ve daimi preparasyon için 5 soğanın kök uçlarından örnekleme yapılmış ve her soğana ait kökler ayrı bir tüpe konulmuştur. Soğandaki en yüksek mitoz sıklığının sabah saat 6:00 ile 9:00 arasında elde edilmesinden dolayı kök ucu materyallerinin alınması sabah saat 7:00-8:00 arasında tamamlanmıştır.

2.2.3. Preperatların hazırlanması

Fiksasyon

1. Her bir uygulama süresi sonunda soğan kök ucundan itibaren yaklaşık 1-2 cm uzunluğunda kesilen materyaller Carnoy's fiksatifine (3 kısım %95'lik metanol:1 kısım glasiyal asetik asit) alınarak 24 saat 4°C'de tespit edilmiştir.
2. Fiksasyon işleminden sonra kökler kullanılıncaya kadar %70'lik alkol içerisinde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Hidroliz

1. Hücreleri birbirlerinden ayırıp mikroskopta daha iyi gözlenebilmelerini sağlamak amacıyla bu işlem yapılmıştır.
2. Kökler %70'lik alkol içerisinden çıkartıldıktan sonra 1N HCl içerisine alınarak 60°C sıcaklıktaki su banyosunda 7 dakika hidroliz edilmiştir.

Boyama

1. Hidroliz işleminden sonra kökler distile su içerisinde alınarak 15 dakika bekletilmiştir.
2. Kökler Feulgen boyası ile oda sıcaklığında bir saat boyanmıştır.
Feulgen boyasının (Elçi, 1994) hazırlanışı:
1 g fuksin (Sigma) üzerine 200 ml kaynatılmış su ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu karışıma 20 ml 1N HCl ilave edilerek bir gün bekletilir. Süzülen bu karışıma 2 g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$, Sigma) eklenerek boya kapaklı bir şişeye konulmuştur. Buzdolabında 24 saat bekleyen ve açık çay rengini alan boya kullanıma hazır hale gelmiştir.

Daimi Preparasyon

1. Boyanmanın en yoğun olduğu yaklaşık 1-2 mm uzunluğundaki kök ucu dokusu kesilerek geriye kalan kısım atılmıştır.
2. Kök ucu üzerine %45'lik glasiyal asetik asit damlatılıp üzerine lamel kapatılarak ezme-yayma preparat yapılmıştır.
3. Preparatlar kanada balzamu kullanılarak daimi peraparat haline getirilmiştir.

2.2.4. Mikroskobik çalışma

Mikroskobik analizler; mitotik indeks, anafaz ve telofazdaki kromozom aberasyonları ile diğer aberasyonların belirlenmesini içermektedir.

1. Kök ucu meristem hücrelerine ait mitotik indeksin belirlenmesinde, her uygulama için hazırlanan 5 preparatın her birinde 1000'in üzerinde hücre olmak üzere toplam yaklaşık 5000-6000 hücre içinde mitoz giren hücreler sayılmıştır ($MI = \text{mitoz girmiş hücre sayısı} / \text{toplam hücre sayısı} \times 100$).
2. Mitotik indeks hesaplamalarından sonra, preparatların incelenmesine yeniden başlanmış ve bu sefer kromozom aberasyonları her preparatta 100 anafaz veya telofaz hücresi olmak üzere her uygulamada toplam 500 anafaz veya telofaz hücresi incelenerek belirlenmiştir. Anafaz-telofaz hücrelerinde görülebilen kromozom aberasyonları şunlardır: Yapışıklık, anafaz köprüleri, kalın kromozomlar, multipolarlık ve fragment oluşumlarıdır. Diğer anomaliler ise C-mitoz, poliploidi ve binükleer hücre oluşumlarıdır.
3. Belirlenen kromozom aberasyonları 10×40 büyütmede dijital fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.2.5. Verilerin istatistiksel analizleri

Biyolojik testlerin her birinden elde edilen veriler SPSS programında varyans analizi (ANOVA) uygulanarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Verilerin ortalamaları arasındaki $p < 0.05$ düzeyindeki farklılıklar, Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenerek istatistiksel açıdan homojen gruplar belirlenmiştir.

2.3. AMES Mutajenite Testi

2.3.1. Bitki Ekstreleri

Limonium globuliferum ve *Limonium effusum* bitkilerinin distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) ekstreleri bu çalışmada kullanılmıştır. Ekstreler yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

2.3.2. *Salmonella typhimurium* test suşları

Deneyde, Prof. Dr. Ames ve arkadaşları tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bu suş Hacettepe Üniversitesi Biyoloji bölümü öğretim üyelerinden olan Prof. Dr. Nuran Diril'den sağlanmıştır. TA 98 suşu kodon kayması, TA 100 ise baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır.

2.3.3. Deneyde kullanılan besiyerlerinin içerikleri ve hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan kimyasallardan nutrient broth no:2, Oxoid markalı olup diğer kimyasallar, magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), sitrikasit monohidrat, potasyum fosfat (K_2HPO_4), sodyum amonyum fosfat ($NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$), D-Biyotin, L-Histidin-HCl, ampisilin trihidrat, sodyum hidroksit, kristal viyole, glikoz, agar, NaCl, sodyum azid, 2-aminoantrasen, 4-NPD, 2-aminofluoren, potasyum klorür, magnezyum klorür, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, β -NADP, glikoz-6-fosfat ve S9 fraksiyonu Sigma'dan alınmıştır.

Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Kullanım: MGA ve HBA (master) plakları

	<u>1000 ml için</u>
Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 gr
Sitrikasit monohidrat	100 gr
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 gr
Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2NH_4 PO_4 \cdot 4H_2O$)	175 gr
Distile su (45 °C)	670 ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya ilave edilmiştir. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edilmiştir.

(0.5 mM) Histidin/Biyotin Solüsyonu

Kullanım: Mutajenite deneyi (100 ml top agara 10 ml olacak şekilde)

	<u>250 ml için</u>
D-Biyotin (F.W. 247.3)	30.9 mg
L-Histidin-HCl (F.W. 191.7)	24.0 mg
Distile su	250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş, daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilize edilmiştir. Solüsyon 4 °C'de saklanmıştır.

(% 0.8/0.02 NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Kullanım: Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolü.

	<u>100 ml için</u>
Ampisilin trihidrat	0.8 gr
0.02 N Sodyum hidroksit	100 ml

Ampisilin trihidrat, 0.02 N NaOH içinde çözüldü ve sterilizasyon için 0.22 µm çaplı filtreden geçirilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.

(%1) Kristal Viyole Solüsyonu

Kullanım: Suşların kristal viyoleye duyarlılıkları, dolayısıyla rfa mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının kontrolü.

	<u>100 ml için</u>
Kristal viyole	0.1 gr
Distile su	100 ml

Kristal viyole ve distile su karıştırıldı ve solüsyon ışık geçirmeyen bir kaba konup +4°C’de saklanmıştır.

(% 0.13) Biotin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	<u>50 ml için</u>
D-biyotin	0.65 mg
Distile su	50 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edilmiştir.

(% 0.5) Histidin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	<u>400 ml için</u>
L-Histidin-HCl (F.W. 191.7)	2 gr
Distile su	400 ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile su içinde çözüldü ve otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edilmiştir.

(%20) Glikoz Çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

	<u>100 ml için</u>
Glikoz	20 gr
Distile su	100 ml

Glikoz distile su içinde çözülerek otoklavda 110°C’de 15 dakika sterilize edilip 0-4°C’de saklanmıştır.

(0.1 µg/µl) Sodyum Azid Çözeltisi

Kullanım: Pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA 100 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanılan kimyasaldır. 0-4°C’de saklanmıştır.

Top Agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

	<u>1000 ml için</u>
Agar	6 gr
NaCl	5 gr
Distile su	1000 ml

Agar-su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözülmüş ve otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edilmiştir.

Histidin/Biyotin Plakları (HB agar)

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 gr
% 20 glikoz	50 ml
Histidin HCl. H ₂ O	10 ml
0.5 mM Biyotin	6 ml
50XVB	20 ml
Distile su	914 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45°C’ye soğutulup % 20 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi ilave edilmiş, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin eklenmiş, karıştırılıp petri kutularına 30 ml olarak dağıtılmıştır.

Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları (HBA agar)

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanması

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 gr
Distile su	910 ml

50XVB tuzları	20 ml
% 20 glikoz	50 ml
Histidin HCl.H ₂ O	10 ml
0.5 mM Biyotin	6 ml
(%0.8/0.02 NaOH) Ampisilin	3.15 ml

Agar ve su otoklavlanmış, 45°C'ye soğutulup % 20 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırılmış ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin eklenip plaklar petrilere 30 ml olarak aktarılmıştır. Bu plaklarda bakteriler 4°C'de 2 ay saklanabilmektedir.

Minimal Glikoz Agar Plakları (MGA)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 gr
Distile su	930 ml
50X VB	20 ml
% 20 glikoz	50 ml

Agar ve su 2 litrelik kaptaki karıştırılıp çözülmüş ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45°C'ye soğutulup % 20 glikoz ve 50X VB tuzları eklenip petri kutularına 30 ml olarak aktarılmıştır.

Nutrient Agar Plakları (NA)

Kullanım: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolü
(a. Kristal viyole b. UV duyarlılığı)

	<u>1000 ml için</u>
Oxoid nutrient broth no:2	25 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Agar, broth ve su 2 litrelik kaptaki karıştırılıp otoklavlanmış ve petri kutularına 30 ml olacak şekilde aktarılmıştır.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Kullanım: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

	<u>200 ml için</u>
Oxoid nutrient broth no:2	5 gr
Distile su	200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.

Tuz Çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M MgCl₂)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	<u>500 ml için</u>
Potasyum klorür (KCl)	61,5 gr
Magnezyum klorür	40,7 gr
Distile su	500 ml

Maddeler distile suda çözülmüş ve 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilip 4°C'de saklanmıştır.

0.2 M Sodyum-Fosfat Tamponu (pH=7,4)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	<u>500 ml için</u>
0.2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	13,82 gr
0.2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	14,2 gr
Distile su	500 ml

Karışım pH 7.4'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

0.1 M β-NADP Çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	<u>5 ml için</u>
β-NADP (F.W. 765.4)	383 mg
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0.22 µm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

1 M Glikoz-6-Fosfat Çözeltisi

Kullanım: Mutajenite deneyi için S9 karışımı

	<u>10 ml için</u>
Glikoz-6-fosfat	2,82 gr
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0.22 µm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

S9 Karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörler)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>50 ml için</u>
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml
MgCl ₂ -KCl tuz çözeltisi	1 ml
1 M Glikoz-6-fosfat	0,25 ml
0.1 M β-NADP	2 ml
0.2 M fosfat tamponu pH=7.4	25 ml
Steril distile su	19,75 ml

Karışım, her zaman taze olarak ve yeterince hazırlanmış olup içerikler daima buz içinde tutulmuştur.

2.3.4. Test maddeleri

Limonium effusum ve *Limonium globuliferum* türlerinin distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) ekstralarının 0.1 µg/plak, 1 µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak, 1000 µg/plak ve 10000 µg/plak konsantrasyonları hazırlanmıştır. Tüm AMES testi çalışmalarında bu dozlar kullanılmıştır.

2.3.5. AMES deneyi

Bu çalışmada, USA'dan elde edilen test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve Ames/*Salmonella*/mikrozom testi Maron ve Ames yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olarak iki grup

halinde çalışılmıştır. Her doz paralel 3 plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, solvent kontrol ve spontan kontroller deneye paralel olarak denenmiştir. Pozitif kontrol olarak TA100 S9'suz deneylerde 10 µg/plak sodyum azid (SA), TA100 S9'lu deneylerde 5 µg/plak 2-aminoantrasen (2AA), TA98 S9'lu deneylerde 200 µg/plak 2-aminofluoren (2AF), TA98 S9'suz deneylerde 200 µg/plak 4-nitro-o-fenilendiamin (4-NPD) kullanılmıştır.

***Salmonella* suşlarının kültürlerinin ve master plaklarının hazırlanması**

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi'nden getirilen bakteri plakları histidin biyotin ampisilin (HBA) plaklarına paralel ekimleri yapıp 37°C'de 48 saat inkübasyona alınmıştır. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml nutrient broth (NB) ortamı içinde süspansiyon edilerek bir gece (12-16 saat) 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp Histidin/biyotin/ampisilin agar (HBA) üzerine çizgi ekim yapılarak plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar 4°C'de 2 ay süre ile saklanmış ve pasajlar yapılmıştır.

***Salmonella* suşlarının stoklanması ve stok kültürlerin açılması**

Genetik kontrolleri yapılarak HBA'ya ekilmiş olan bakterilerden tek koloniler alınarak 2 ml NB içinde 37°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüplerinin içerisine 1 ml bakteri kültürü ve 90 µl DMSO eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. Kapakları sıkıca kapatılarak sıvı azot içerisine daldırılıp çıkartılmış ve böylece şok donmaları sağlanmıştır. Şok dondurulan kültürler stok olarak kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır. Bu stok kültürler 1-2 yıl süre ile tazeliklerini korumaktadır.

***Salmonella* suşlarının kontrol testlerinin yapılması**

Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığını bilmek gerekir. Bu nedenle bakterilerin genetik özellikleri bazı testlerle kontrol edilmiştir.

Histidin gereksinimi kontrolü

Bakterilerin minimal glikoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺ lardan ayırt edilir. Bu amaçla NB'da, bir gece üretilen bakterilerden MGA ve histidin/biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. 37°C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıdığı anlaşılır. Şekil 2.1'de bu çalışmaya ait fotoğraflar verilmiştir.

***uvrB* mutasyonu kontrolü**

Bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB'da bir gece büyütülen bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınıp nutrient agar (NA) plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plakın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir plaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm. yüksekten 8 sn. süre ile ışınlanmıştır. Işınlanmadan sonra petri kapakları kapatılıp 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, *uvrB* mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Çünkü DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir. Bu da bize kullanılacak bakterilerin *uvrB* mutasyonu taşıdığını göstermiştir. Şekil 2.2'de *uvrB* mutasyonu kontrolüne ait fotoğraf verilmiştir.

Rfa mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü NB'da bir gece büyütülen 0.1 ml sıvı kültür, 45°C su banyosunda tutulan 2.5 ml top agar üzerine ilave edilip daha sonra NA plaklarına dökülerek plaklara 8 işareti yaptırılmıştır. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0.5 cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına % 0.1'lik kristal viyole karışımından 10 µl damlatılmıştır. Kâğıdın boyayı emmesi beklenilmiş, sonra plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin Rfa mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır. Bu genotip kontrolü çalışması Şekil 2.3'te verilmiştir.

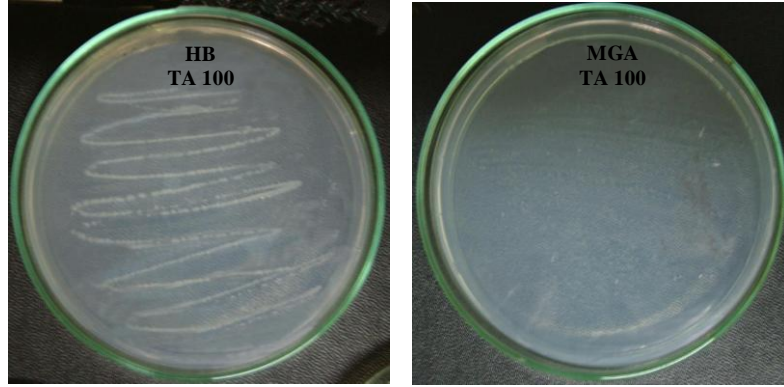
R-faktör varlığı kontrolü

Test bakterilerinin içerdiği, R-faktör taşıyan pKM 101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, büyütülen NB içinde bakteri kültürü (% 0.8 Ampisilin/0.02 M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak, 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdükleri gözlenmiştir. Yani bakteriler R-faktör plazmidini içermektedirler.

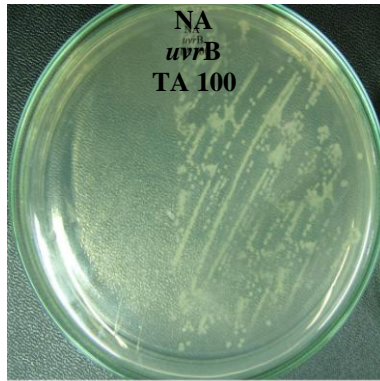
Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar; TA 100 için 75-200 revertant/plaktır. Bu test için, 37°C'de, NB'da büyütülen bir gecelik kültürden 0.1 ml alınıp, 45°C'deki su banyosunda tutulan 0.25 ml 0.5 M histidin-biyotin solüsyonu içeren 2.5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test

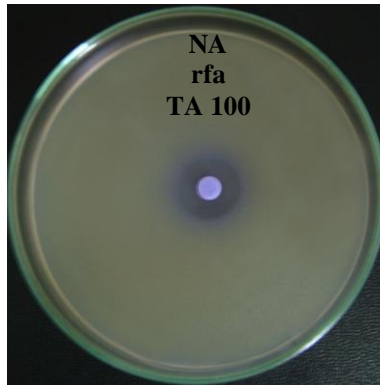
tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37°C’de 48-72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. Bu kontrole ait fotoğraf Şekil 2.4’te verilmiştir.



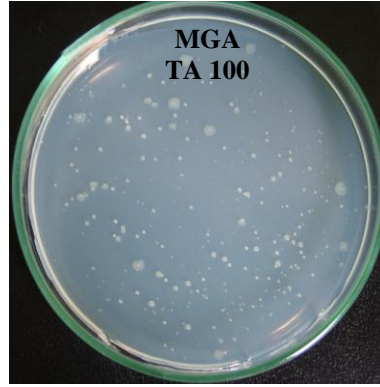
Şekil 2.1. *S. typhimurium* TA 100 histidin gereksinimi kontrolü.



Şekil 2.2. *S. typhimurium* TA 100 suşlarının uvrB mutasyonu kontrolü.



Şekil 2.3. *S. typhimurium* TA 100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü.



Şekil 2.4. *S. typhimurium* TA 100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü.

Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml nutrient broth içerisinde süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon işleminden sonra kültür çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 110 rpm'de 12-16 saat inkübe edilmiştir.

Bu süre sonunda gecelik kültürden 100 µl alınmış ve 20 ml NB bulunan erlen içerisinde eklenerek taze kültürleri hazırlanarak 140 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda taze kültürün % 0.9 serum fizyolojik ile 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ve 10⁻⁶ olacak şekilde bir dizi sulandırmaları hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına her bir konsantrasyondan 3 petri olacak şekilde 100 µl'lik miktarlarda alınarak 45°C'deki su banyosunda tutulan 2.5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak NA plaklarına yayılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. *S. typhimurium* ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 ml'sinde 1-2 x 10⁹ ml/bakteri olması öngörülmektedir.

Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması

Sitotoksik etkinin saptanması deneyi Dean ve ark. (1985) göre yapılmıştır. Kullanılan test bileşiklerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla 2 ml top agara 0.1 ml bakteri kültürü ve 0.1 ml değişik konsantrasyonlarda ekstrelerden ilave edilmiştir. Öncelikli olarak ekstrelerin 0.1 µg/plak, 1µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak ve 10000 µg/plak

konsantrasyonları test tüpüne eklenmiştir. Tüpteki karışım 3 ayrı NA plağına dökülerek plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı belirlenmiş ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir.

S9 karışımının hazırlanması

Salmonella/mikrozom test sistemi için standart S9 karışımı bileşenleri 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glikoz-6-fosfat, 4 mM β-NADP, 100 mM Na-fosfat pH:7.4 ve bu karışımın her ml'si için 0.04 ml. derişimindeki S9 fraksiyonudur. Karışım her mutajenite deneyi için taze hazırlanmakta ve deney süresince buz içerisinde saklanmaktadır.

Ames mutajenite testinin yapılışı

Deneyin amacı, daha önceden büyümesi için histidin aminoasidine gereksinim duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüşmesi temeline dayanır. AMES testi, Maron ve Ames (1983)'e göre yapılmıştır.

S9'suz (-) deney

Bu amaçla, içlerine 0.25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2.5 ml'lik top agar içeren deney tüpleri 45°C'lik su banyosunda ısıtılıp içlerine 0.1 ml test maddesi ve 0.1 ml 5 saatlik taze bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak 37°C'ye ısıtılmış MGA plaklarına dökülmüş, plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37°C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olmak üzere hazırlanarak iki bağımsız deney yapılmış ve sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol ve pozitif kontrol kullanılmıştır.

S9'lu (+) deney

Plak inkorporasyon testinde, test bileşigi, bakteriyel test suşu, S9 karışımı top agara karıştırılarak minimal glikoz agarlı plaklara dökülmüştür. Plaklar 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaklardaki his⁺ revertant bakteri kolonileri sayılmıştır.

Bu yöntemde, 0.25 ml histidin biyotin eklenmiş 45°C'deki 2.5 ml'lik top agara, test suşu kültüründen 0.1 ml, test edilecek kimyasaldan 0.1 ml ve S9 karışımından 0.5 ml eklenip düşük hızda 3 saniye vorteksenerek oda sıcaklığındaki minimal glikoz agarlı plaklara yayılmıştır. Top agarın plağın bütün yüzeyine donmadan yayılmasını sağlamak için karıştırma, dökme, yayma işleminin tümü, 20 saniyeden az bir sürede yapılmıştır. Her deneyde, her suşun geri dönme özgüllüklerini ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için pozitif mutajen kullanarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Bakteriyi, S9 karışımını ve kullanılan çözücüyü içeren fakat test edilen kimyasalı içermeyen negatif kontrol plakları her suş için kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısının saptanmasında kullanılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve iki bağımsız deney yapılmıştır.

2.4. MTT Testi

2.4.1.Hücrelerin testler için hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) hücreleri (Sigma), Earle's BSS (Balanced Salt Solution), 2mM L-glutamin, 0,1mM esansiyel olmayan amino asitler ve 1,5 g/L sodyum bikarbonat içeren, % 90 EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Sigma) besiyerinden ve % 10 fetal sığır serumundan oluşan besiyerinde çoğaltılmıştır.

37°C ve % 5 CO₂'li etüvde çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini tamamen veya % 90 düzeylerinde kapladıkları zaman Tripsin-EDTA (Sigma) ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue (Sigma) boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT için 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarının her kuyucuğunda yeterli hücre olacak şekilde

besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 100 µl hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin plak tabanlarına yapışması için 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24, 48, 72 ve 96 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Bitki ekstralarının çözücülerini negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Metanol ve aseton miktarı % 0.1'i geçmeyecek şekilde ve ekstre konsantrasyonları 50-25-12.5-6.25 ve 3.125 µg/ml olacak şekilde besiyerine eklenmiştir (Mosmann, 1983).

2.4.2. MTT analizi

Test maddeleri ile 24, 48, 72 ve 96 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5mg/ml⁻¹ MTT solüsyonu (Sigma) ile canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözülme formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için karbondioksit inkübatöründe 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µl DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik densiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre proliferasyonu sıfır kabul edilerek, deney hücrelerinin proliferasyon oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Mosmann, 1983).

3. BULGULAR

3.1. *Allium* Testine Ait Bulgular

Allium testi, *Limonium effusum* ve *Limonium globuliferum* türlerinin kök, gövde ve yaprak kısımlarının su ekstraları ile çalışılmıştır. Kullanılan diğer iki çözücü olan metanol ve aseton:metanol (2:1) ile bu çalışma denenmiş fakat bu çözücülerin oda sıcaklığındaki hızlı uçucu özelliklerinden dolayı deney gerçekleştirilememiştir.

Allium testi ile kullanılan bitkilerin su ekstralarının, kök büyümesi inhibisyonu üzerine, mitotik safhalar üzerine etkisi ve oluşturdukları kromozom aberasyonları belirlenmeye çalışılmıştır.

3.1.1. Kök büyümesi inhibisyonu testi

Bu çalışma ile bitki ekstralarının hem kök büyümesi üzerine etkisi araştırılmış hem de sonraki aşamalar olan mitotik indeksin (MI) saptanması ve kromozom aberasyonlarının belirlenmesi denemelerinde kullanılacak olan konsantrasyon değerleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Bu amaçla kontrol grubunun ortalama kök uzunluğunu (3,85 cm) yarıya düşüren yaklaşık değer olan etkin konsantrasyon (EC_{50}) değerleri hesaplanmıştır. Etkin konsantrasyon değerini bulmak için ise üç farklı deneme kurulmuş olup, ilk denemede 50, 37.5, 25, 12.5 ve 6.25 g/L'lik konsantrasyonlar kullanılmıştır. *Limonium effusum*'un yaprak ekstresinde ve *Limonium globuliferum*'un gövde ve yaprak ekstralarında ilk deneme sonucunda EC_{50} değeri tespit edilmiştir. Fakat kullanılan bitkilerin diğer kısımlarında EC_{50} değeri tespit edilemediği için ilave iki deneme daha yapılmıştır. Bu denemelerde ise ilk denemeden elde edilen verilerin ışığında hareket edilerek her bir bitki organı için farklı olmak üzere üç farklı konsantrasyon daha kullanılmıştır. Kullanılan bu değerler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Yapılan tüm denemelerin sonucunda *Limonium effusum*'un kök, gövde ve yaprak ekstralarından elde edilen EC_{50} konsantrasyonları sırasıyla 20, 65 ve 50 g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1. *Allium* testi kök büyümesi inhibisyonu testi sonuçları.

<i>L. effusum</i> Kök Ekstreleri			<i>L. globuliferum</i> Kök Ekstreleri		
g/litre	Ort. kök uzunluk	% Değişim	g/litre	Ort. kök uzunluk	% Değişim
Kontrol (Su)	3,85±0,42a	100,00	Kontrol (Su)	3,85±0,42a	100,00
6,25	3,56±0,47b	92,47	6,25	4,18±0,95b	108,57
12,50	2,79±0,8c	72,47	12,50	3,07±0,77c	79,74
15,00	2,62±0,33d	68,05	25,00	2,32±0,54d	60,26
20,00	1,98±0,22e	51,43	30,00	2,16±0,29e	56,10
22,50	1,75±0,13f	45,45	32,50	1,97±0,15ef	51,17
25,00	1,42±0,49g	36,88	35,00	1,75±0,16f	45,45
37,50	1,49±0,31g	38,70	37,50	1,5±0,22g	38,96
50,00	1,18±0,19h	30,65	50,00	0,95±0,26h	24,68
<i>L. effusum</i> Gövde Ekstreleri			<i>L. globuliferum</i> Gövde Ekstreleri		
g/litre	Ort. kök uzunluk	% Değişim	g/litre	Ort. kök uzunluk	% Değişim
Kontrol (Su)	3,85±0,42ab	100,00	Kontrol (Su)	3,85±0,42a	100,00
6,25	3,73±0,69b	96,88	6,25	3,98±0,29a	103,38
12,50	3,97±0,58a	103,12	12,50	3,84±0,22a	99,74
25,00	3,4±0,66c	88,31	25,00	3,04±0,50b	78,96
37,50	2,79±0,91d	72,47	37,50	2,28±0,51c	59,22
50,00	2,56±0,59e	66,49	50,00	1,97±0,31d	51,17
65,00	1,98±0,19f	51,43			
75,00	2,45±0,25eg	63,64			
85,00	2,30±0,29g	59,74			
<i>L. effusum</i> Yaprak Ekstreleri			<i>L. globuliferum</i> Yaprak Ekstreleri		
g/litre	Ort. kök uzunluk	% Değişim	g/litre	Ort. kök uzunluk	% Değişim
Kontrol (Su)	3,85±0,42a	100,00	Kontrol (Su)	3,85±0,42a	100,00
6,25	3,47±0,92b	90,13	6,25	4,07±0,56b	105,71
12,50	3,14±0,47c	81,56	12,50	3,95±0,81ab	102,60
25,00	2,46±0,63d	63,90	25,00	3,24±0,50c	84,16
37,50	2,45±0,32d	63,64	37,50	2,46±0,52d	63,90
50,00	1,96±0,23e	50,91	50,00	1,99±0,33e	51,69

*Sütunlardaki farklı küçük harfler $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

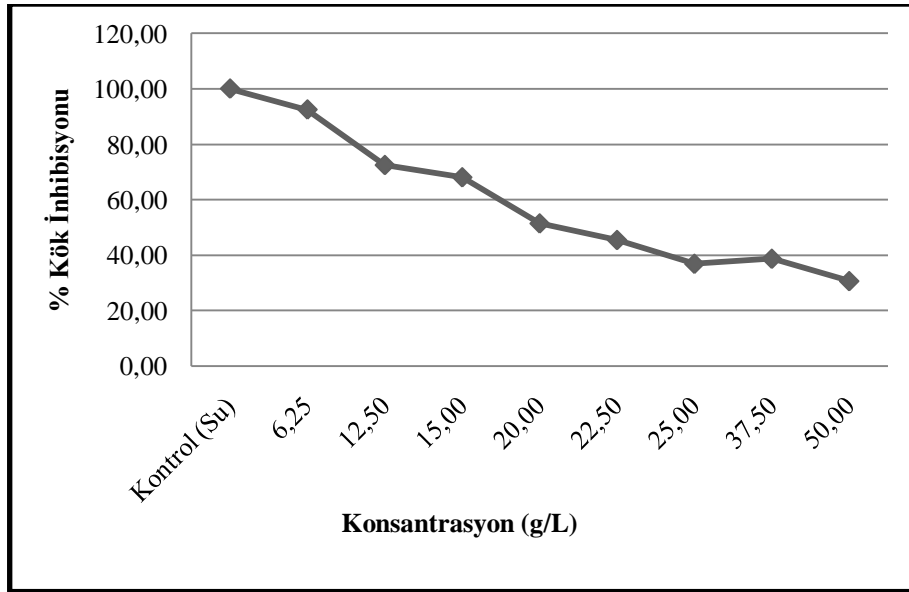
Limonium globuliferum için ise bu konsantrasyonlar sırasıyla 32.5, 50 ve 50 g/L olarak bulunmuştur.

Kök büyümesi inhibisyonu verileri, kontrol grubuna göre ortalama kök uzunluğunu artıran konsantrasyonların, *Limonium effusum* gövde ekstresi için 12.5 g/L ve *Limonium globuliferum* kök ekstresi 6.25 g/L, gövde ekstresi 6.25 g/L ve yaprak ekstresi için 6.25 g/L ile 12.5 g/L olduğunu göstermiştir. Kök büyümesi üzerine en fazla inhibe edici etki ise *Limonium globuliferum* kök ekstresinin 50

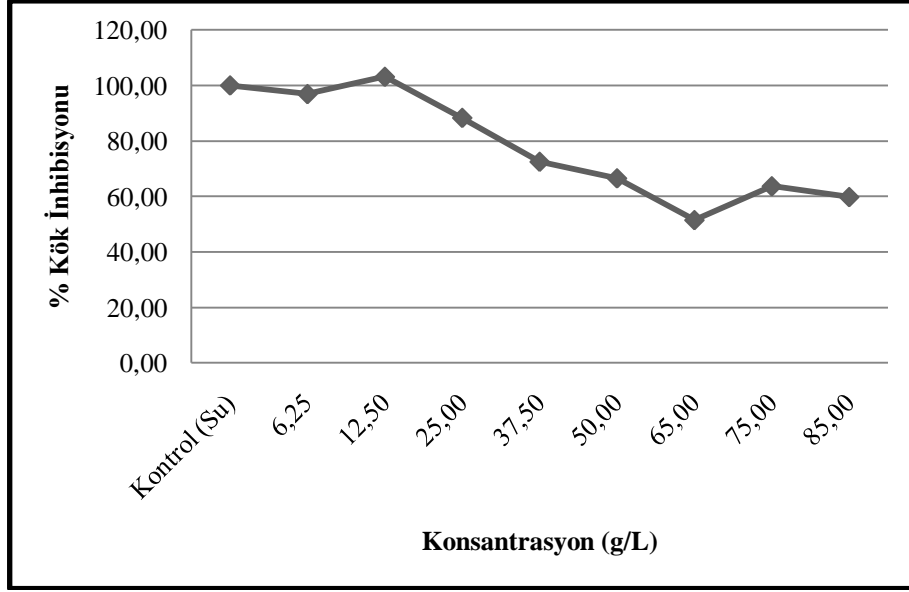
g/L'lik konsantrasyonunda görülmüştür (0.95 cm). Her tür ve her türün farklı ekstreleri için, kullanılan farklı konsantrasyonlardan elde edilen kök uzunluk değerleri, Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.

Kök uzunluğunda kontrol grubuna göre farklı konsantrasyonlarda meydana gelen % değişim miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Kontrol grubu %değişim oranı %100 alınarak diğer konsantrasyonlardaki değişim bu orana göre hesaplanmıştır. Elde edilen % değişim verilerine göre kök büyümesindeki en fazla inhibisyon *L. globuliferum* kök 50 g/L konsantrasyonunda elde edilmiştir (% 24,68). Kök uzunluğundaki en fazla artış % 108,57 değişim oranı ile *L.globuliferum* kök 6,25 g/L konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu sonuçlar, *L.globuliferum* kök ekstresinin düşük konsantrasyonlarının kök büyümesini olumlu yönde etkilediğini gösterirken yüksek konsantrasyonların kök büyümesini çok açık bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir.

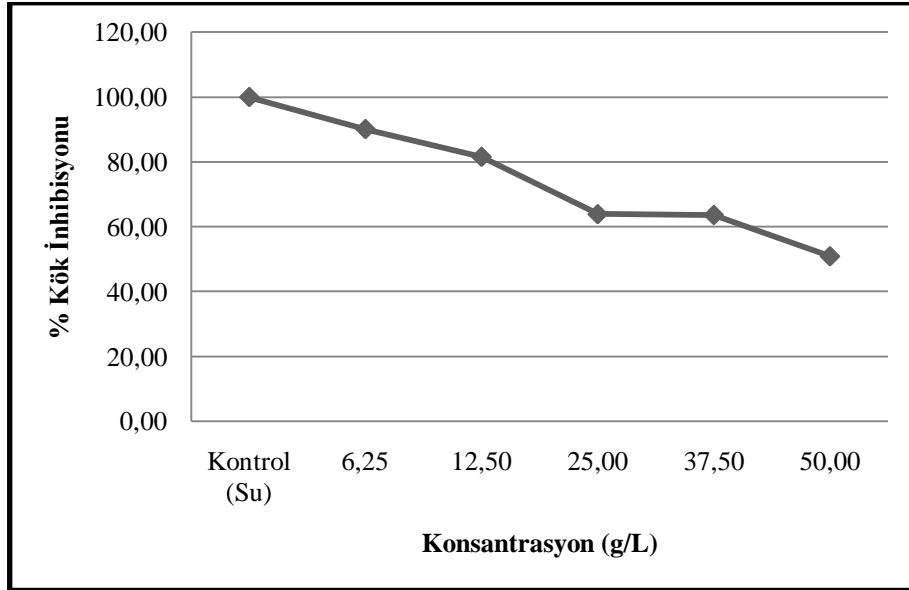
Elde edilen tüm veriler istatistiksel açıdan Duncan testine göre değerlendirilmiş olup homojen gruplar tespit edilmiştir. Kullanılan her ekstre kendi içerisinde istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur. *Limonium effusum* ve *Limonium globuliferum* gövde 6,25 ve 12,5 g/L konsantrasyonları hariç diğer konsantrasyonların verileri istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Duncan testi sonuçları Çizelge 3.1'de verilmiştir.



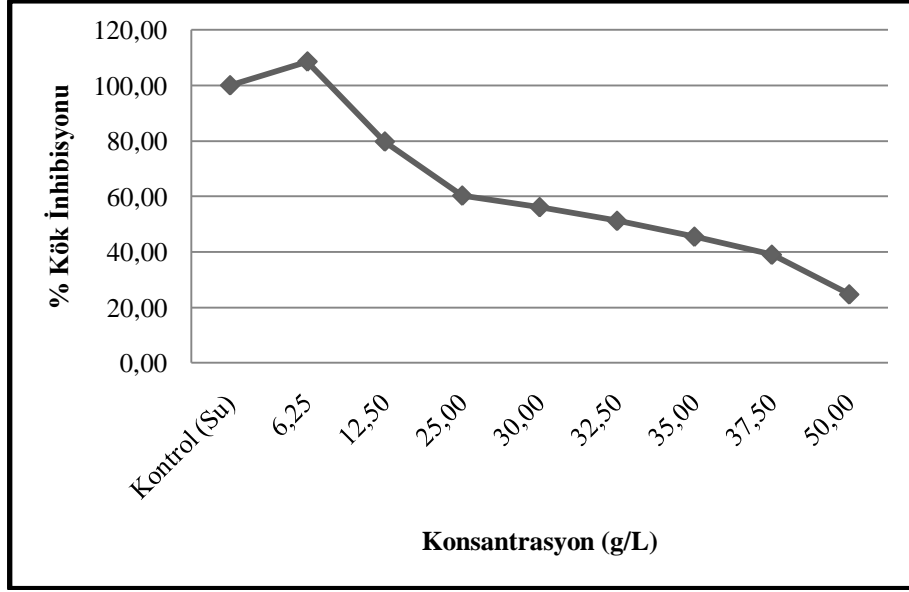
Şekil 3.1. *Limonium effusum* kök su ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.



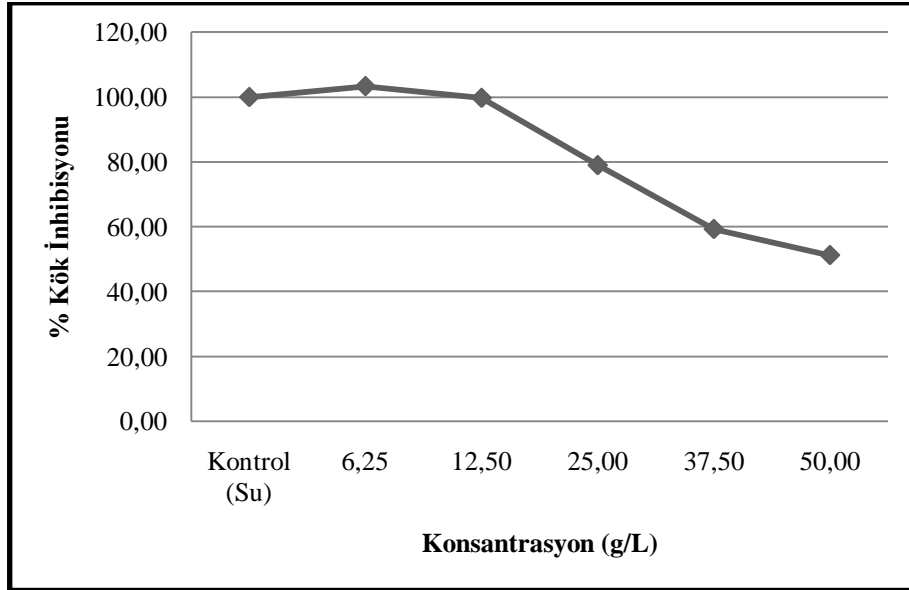
Şekil 3.2. *Limonium effusum* gövde su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.



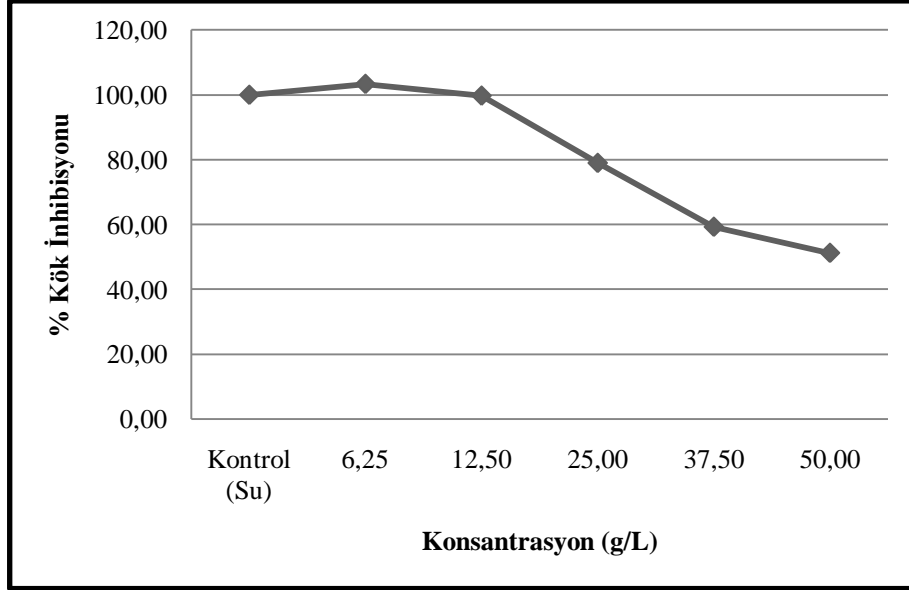
Şekil 3.3. *Limonium effusum* yaprak su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.



Şekil 3.4. *Limonium globuliferum* kök su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.



Şekil 3.5. *Limonium globuliferum* gövde su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.



Şekil 3.6. *Limonium globuliferum* yaprak su ekstralarının farklı konsantrasyonlarının kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi grafiği.

3.1.2. Mitotik indeks (MI) üzerine etkileri

Mitotik indeks çalışması için her bir ekstrenin farklı konsantrasyonlarından elde edilen köklerden hazırlanan preparatlarda yaklaşık 5000 hücre sayılmıştır. Bu yöntemle, hücrelerin mitozu girme oranları ve mitozun hangi safhasında inhibisyon etkisinin görüldüğü incelenmiştir.

Allium testi mitotik indeksi belirleme yönteminden elde edilen verilere göre *Limonium effusum* kök su ekstralarında, 24 saat uygulamasında 20 g/L ve 40 g/L'lik konsantrasyonlarda kontrole göre mitotik aktivite kaybı görülmüştür. 10 g/L'lik konsantrasyonda ise mitotik aktivite artmıştır. Özellikle 40 g/L'lik konsantrasyon kontrole göre anafaz ve telofaz safhalarını yüksek oranda azaltmıştır. *Limonium effusum* kök su ekstralarında, 48 saat uygulamasında 20 g/L ve 40 g/L'lik konsantrasyonlar kontrole göre mitotik aktiviteyi artırırken, 10 g/L'lik konsantrasyonda ise mitotik aktivitede azalma görülmüştür. Bunun yanında bu verilere zıt bir şekilde 20 g/L ve 40 g/L'lik konsantrasyonlarda metafaz, anafaz ve telofaz safhalarında büyük oranda bir düşme görülmüştür. Bu konsantrasyonlar, mitozu profaz safhasından sonraki safhaları inhibe edici etki göstermiştir. *Limonium effusum* kök su ekstralarında, 72 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlarda mitotik aktivitede artış görülmüştür. Fakat 20 g/L ve 40

g/L'lik konsantrasyonlar yine profaz sonrası safhaların tümünde inhibe edici etki göstermiştir. 10 g/L ise metafaz ve telofaz safhalarını artırmıştır. *Limonium effusum* kök su ekstrelerine ait tüm mitotik indeks verileri ve bu verilerin istatistiki değerlendirmeleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Limonium effusum gövde su ekstrelerinde, 24 saat uygulamasında 65 g/L ve 130 g/L'lik konsantrasyonlarda kontrole göre mitotik aktivite kaybı görülmüştür. 32.5 g/L'lik konsantrasyonda ise mitotik aktivite artmıştır. Her üç konsantrasyonda da mitoz safhalarına bakıldığında metafaz, anafaz ve telofaz oranı kontrole göre daha yüksektir. *Limonium effusum* gövde su ekstrelerinde, 48 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlar kontrole göre mitotik aktiviteyi artırırken, yine tüm konsantrasyonlar profaz sonrası fazların oranları kontrol grubuna göre daha yüksektir. Bu da bu ekstrenin 48 saat uygulamasında, mitotik safhaları artırıcı etkisi olduğunu göstermektedir. *Limonium effusum* gövde su ekstrelerinde, 72 saat uygulamasında 65 g/L ve 130 g/L'lik konsantrasyonlarda kontrole göre mitotik aktivite kaybı görülmüştür. 32.5 g/L'lik konsantrasyonda ise mitotik aktivite artmıştır. Bunun yanında tüm konsantrasyonların metafaz, anafaz ve telofaz oranları kontrole göre yüksektir. *Limonium effusum* gövde su ekstrelerine ait tüm mitotik indeks verileri ve bu verilerin istatistiki değerlendirmeleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Limonium effusum yaprak su ekstrelerinde, 24 saat uygulamasında 50 g/L ve 100 g/L'lik konsantrasyonlarda kontrole göre mitotik aktivite kaybı görülmüştür. 25 g/L'lik konsantrasyonda ise mitotik aktivite artmıştır. Özellikle 50 g/L'lik konsantrasyonda profaz oranı düşükken diğer tüm safhalarda bariz bir artış gözlenmiştir. *Limonium effusum* yaprak su ekstrelerinde, 48 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlar kontrole göre mitotik aktiviteyi düşürürken, metafaz, anafaz ve telofaz oranlarının kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2. *Limonium effusum* kök su ekstraktleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.

Konsantrasyon (g / L)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± Stantard sapma	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Stantard sapma			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5010	32,13±1,14ab	88,5±2,33a	1,66±0,32a	2,82±0,51ab	7,02±1,7a
10	5061	33,76±2,03b	89,23±0,67a	3,1±0,42a	2,4±0,28a	5,27±0,5a
20	5283	23,76±3,4c	79,94±2,5b	7,5±1,46b	6,27±1,14c	6,29±1,04a
40	5118	26,79±1,7ac	96,71±0,6c	1,78±0,57a	0,54±0,11b	0,97±0,38b
Kontrol- 48 saat	5118	31,61±1,01a	90,45±0,6a	2,45±0,27a	2,68±0,19a	4,42±0,72a
10	5297	24,68±1,57b	80,65±2,07b	5,17±0,58b	5,05±0,39b	9,13±1,48b
20	5209	35,53±1,94a	97,67±1,26c	0,76±0,17c	0,34±0,11c	1,23±0,64a
40	5132	46,86±1,55c	94,53±1,06ac	1,85±0,28ac	0,79±0,17c	2,83±0,84a
Kontrol-72 saat	5056	30,84±1,98a	90,2±2,63a	2,43±0,96a	1,72±0,88a	5,65±1,38a
10	5279	31,15±1,42a	86,69±1,38a	2,89±0,58a	1,63±0,31a	8,79±0,81b
20	5145	37,34±1,45b	95,58±0,31b	2,04±0,2a	1,23±0,16a	1,15±0,22c
40	5190	40,78±0,62b	96,36±0,07b	1,71±0,24a	0,94±0,01a	0,99±0,21c

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Çizelge 3.3. *Limonium effusum* gövde su ekstraları mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.

Konsantrasyon (g /L)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks (%) ± Stantard hata	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Stantard hata			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5010	32,13±1,14ab	88,5±2,33a	1,66±0,32a	2,82±0,51a	7,02±1,7a
32.5	5226	34,92±1,69a	79,57±0,95b	5,75±0,52b	7,19±0,74b	7,49±0,96a
65	5193	21,31±0,91b	80,54±0,87b	6,69±0,37bc	4,2±0,86a	8,57±1,11a
130	5114	19,74±0,58b	78,86±0,85b	7,32±0,44c	4,68±0,87a	9,14±1,13a
Kontrol- 48 saat	5118	31,61±1,01a	90,45±0,6a	2,45±0,27a	2,68±0,19a	4,42±0,72a
32.5	5197	35,21±1,15b	83,74±0,93b	5,15±0,4b	4,07±0,43a	7,03±0,89a
65	5075	39,87±0,8c	87,89±0,38c	2,87±0,61a	3,87±0,79a	5,36±1,01a
130	5227	37,14±0,65bc	86,59±0,63c	2,98±0,93a	4,21±0,74a	6,2±0,75a
Kontrol-72 saat	5056	30,84±1,98ab	90,2±2,63a	2,43±0,96a	1,72±0,88a	5,65±1,38a
32.5	5110	32,18±1,67a	89,77±1,07a	3,11±0,37a	1,96±0,28a	5,16±0,67a
65	5189	27,38±0,14b	84,61±0,95ab	3,78±0,6a	6,37±0,97b	5,24±0,16a
130	5167	23,27±0,5c	82,18±0,42b	4,62±0,69a	7,78±0,93b	5,42±0,42a

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Limonium effusum yaprak su ekstralarında, 72 saat uygulamasında 25 g/L'lik konsantrasyonda kontrole göre mitotik aktivite kaybı görülmüştür. 50 g/L ve 100 g/L'lik konsantrasyonlarda ise mitotik aktivite artmıştır. Özellikle 50 g/L konsantrasyonunda telofaz oranı diğer gruplara göre bariz yüksek bulunmuştur. *Limonium effusum* yaprak su ekstralarına ait tüm mitotik indeks verileri ve bu verilerin istatistikî değerlendirmeleri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Limonium globuliferum kök su ekstralarında, 24 saat uygulamasında 16.25, 32,5 ve 65 g/L'lik konsantrasyonlarda kontrole göre mitotik aktivite kaybı görülmüştür. 65 g/L konsantrasyonunda profaz oranı diğer gruplara göre düşük iken diğer safhaların oranlarının oldukça fazla olduğu görülmüştür. *Limonium globuliferum* kök su ekstralarında, 48 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlar kontrole göre mitotik aktiviteyi düşürmüştür. 32,5 g/L konsantrasyon profaz oranını artırırken telofaz oranını oldukça düşürmüştür. *Limonium globuliferum* kök su ekstralarında, 72 saat uygulamasında yine tüm konsantrasyonlar mitotik indeksi düşürmüştür. Bunun yanında 32,5 ve 65 g/L konsantrasyonları anafaz safhasına büyük ölçüde ket vurmuşlardır. *Limonium globuliferum* kök su ekstralarına ait tüm mitotik indeks verileri ve bu verilerin istatistikî değerlendirmeleri Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Limonium globuliferum gövde su ekstralarında, 24 saat uygulamasında 25, 50 ve 100 g/L konsantrasyonlarında kontrole göre mitotik aktivitede artış tespit edilmiştir. 25 g/L konsantrasyonunda profaz oranı diğer gruplara göre bariz oranda yüksek iken, bu konsantrasyonun metafaz, anafaz ve telofaz safhalarını azalttığı bulunmuştur. *Limonium globuliferum* gövde su ekstralarında, 48 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlar kontrole göre mitotik aktiviteyi artırıcı etki göstermiştir. Tüm konsantrasyonlar, profazı artırırken metafaz ve anafaz safhalarının oranlarını oldukça düşürmüşlerdir. 72 saat uygulamasında ise tüm konsantrasyonlar mitotik indeksi düşürmüştür. Bununla birlikte yine tüm konsantrasyonlar profazı düşürmüş fakat metafaz ve anafazı artırmışlardır. *Limonium globuliferum* gövde su ekstralarına ait tüm mitotik indeks verileri ve bu verilerin istatistikî değerlendirmeleri Çizelge 3.6'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. *Limonium effusum* yaprak su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.

Konsantrasyon (g /L)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± Stantard sapma	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Stantard sapma			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5010	32,13±1,14a	88,5±2,33a	1,66±0,32a	2,82±0,51ab	7,02±1,7a
25	5152	38,95±1,37b	88,15±1,25a	3,01±0,31ab	1,85±0,44a	6,99±1,04ab
50	5161	27,19±0,82c	80,72±1,14b	5,34±0,76c	3,96±0,62b	9,98±0,26b
100	5158	28,16±1,16c	87,92±0,65a	3,41±0,42b	2,72±0,27ab	5,95±0,46a
Kontrol- 48 saat	5118	31,61±1,01a	90,45±0,6a	2,45±0,27a	2,68±0,19a	4,42±0,72a
25	5067	29,17±1,25ab	87,21±0,96ab	3,58±0,77a	4,17±1,14a	5,04±1,56a
50	5259	26,37±1,21b	84,28±1,71b	6,75±0,64b	2,93±1,01a	6,04±0,68a
100	5422	21,34±0,51c	83,77±1,49b	4,13±0,31a	4,62±0,66a	7,48±1,39a
Kontrol-72 saat	5056	30,84±1,98a	90,2±2,63a	2,43±0,96a	1,72±0,88a	5,65±1,38ab
25	5273	28,73±0,91a	89,54±0,26a	3,36±0,17a	2,7±0,19a	4,39±0,42a
50	5148	37,74±0,85b	86,71±2,16a	2,3±1,28a	2,76±1,75a	8,21±1,31b
100	5239	41,44±0,7c	89,88±0,74a	2,58±0,41a	2,82±0,22a	4,71±0,19a

*Sütunlardaki farklı küçük harfler $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Çizelge 3.5. *Limonium globuliferum* kök su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları

Konsantrasyon (g /L)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± Stantard sapma	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Stantard sapma			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5010	31,98±1,27a	88,47±2,31a	1,67±0,31a	2,83±0,5a	7,03±1,69a
16.25	5277	23,71±1,13b	85,3±1,45a	4,02±0,48b	3,13±0,43a	7,55±0,89a
32.5	5164	23,11±1,44b	88,66±0,38a	2,75±0,43ab	0,97±0,27b	7,62±0,61a
65	5183	23,20±1,23b	74,99±1,76b	8,70±1,15c	7,76±0,37c	8,55±0,79a
Kontrol- 48 saat	5118	31,61±1,01ab	90,45±0,6ab	2,42±0,27ab	2,68±0,19ab	4,45±0,72ab
16.25	5181	30,77±1,99b	88,82±1,38a	1,23±0,19a	3,07±0,45b	6,88±1,14bc
32.5	5322	25,42±2,83ac	95,11±2,14b	1,83±0,98a	0,42±0,13c	2,64±1,05a
65	5245	23,97±2,6c	85,65±2,31a	3,97±0,57b	1,99±0,32a	8,39±1,77c
Kontrol-72 saat	5056	30,84±1,98a	90,2±2,63a	2,43±0,96a	1,72±0,88a	5,65±1,38a
16.25	5411	24,28±1,34b	88,2±2,53a	3,06±0,78a	6,33±2,17b	2,5±0,63b
32.5	5208	23,49±0,56b	90,57±0,96a	2,74±0,47a	0,74±0,14a	5,95±0,72a
65	5241	22,72±0,38b	90,14±0,8a	2,85±0,55a	0,99±0,3a	6,02±0,68a

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Çizelge 3.6. *Limonium globuliferum* gövde su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.

Konsantrasyon (g /L)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± Stantard sapma	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Stantard sapma			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5010	32,13±1,14a	88,5±2,33ab	1,66±0,32ab	2,82±0,51a	7,02±1,7a
25	5157	43,28±1,3b	93,01±1,06b	0,48±0,16a	0,36±0,23b	6,13±1,16a
50	5079	53,36±1,32c	85,21±1,4a	2,21±0,41b	1,43±0,05c	11,13±1,05b
100	5255	36,23±2,05d	92,8±0,37b	1,29±0,55ab	1,27±0,3bc	4,63±0,22a
Kontrol- 48 saat	5118	31,61±1,01ab	90,45±0,6a	2,45±0,27a	2,68±0,19a	4,42±0,72a
25	5104	32,92±0,38b	90,52±0,43a	0,7±0,19bc	0,65±0,25b	8,11±0,67b
50	5223	31,64±0,16a	93,27±0,9b	0,24±0,15b	0,98±0,36b	5,49±0,71a
100	5089	33,43±0,45b	95,49±0,72c	1,19±0,41c	1,07±0,34b	2,23±0,03c
Kontrol-72 saat	5056	30,84±1,98a	90,2±2,63a	2,43±0,96a	1,72±0,88a	5,65±1,38ab
25	5232	27,69±0,37ab	80,94±0,98b	2,82±0,33a	3,66±0,5ab	12,57±0,64c
50	5230	30,08±0,76a	81,14±0,75b	7,53±0,36b	4,16±0,62b	7,12±0,9b
100	5207	26,34±0,63b	89,82±0,8a	2,56±0,26a	3,85±0,6b	3,75±0,24a

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Limonium globuliferum yaprak su ekstralarında, 24 saat uygulamasında 25, 50 ve 100 g/L konsantrasyonlarında kontrole göre mitotik aktivitede azalma tespit edilmiştir. 25 g/L konsantrasyonunda profaz oranı diğer gruplara göre bariz oranda yüksek iken, bu konsantrasyonun, metafaz, anafaz ve telofaz safhalarını azalttığı bulunmuştur. Buna ters bir şekilde 50 ve 100 g/L konsantrasyonlarında profaz oranı düşük, fakat diğer safhalar yüksek oranda görülmüştür. *Limonium globuliferum* gövde su ekstralarında, 48 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlar kontrole göre mitotik aktiviteyi azaltıcı etki göstermiştir. Tüm konsantrasyonlar, profazı oranını düşürürken diğer safhalarda kontrole göre artırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. 72 saat uygulamasında ise tüm konsantrasyonlar mitotik indeksi açık bir şekilde artırmıştır. Özellikle 25 g/L konsantrasyonu diğer konsantrasyonlardan farklı olarak profazı düşürmüş fakat diğer fazları artırmıştır. *Limonium globuliferum* yaprak su ekstralarına ait tüm mitotik indeks verileri ve bu verilerin istatistiki değerlendirmeleri Çizelge 3.7’de verilmiştir.

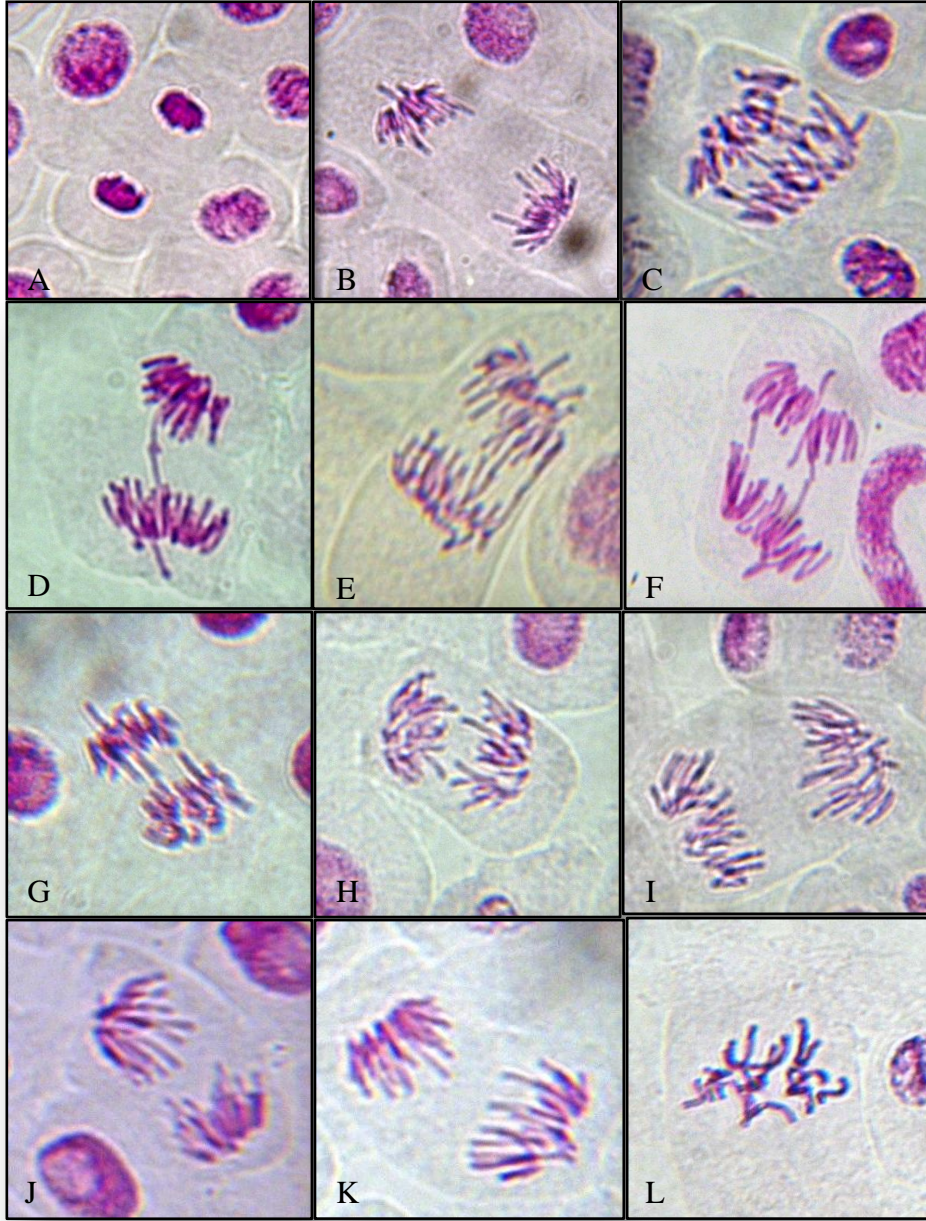
3.1.3. Kromozom aberasyon çalışmaları

Kromozom anomalilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışma iki aşamalı olarak yürütülmüştür. Çalışmanın ilk aşamasında yaklaşık olarak 500 adet anafaz-telofaz hücresi sayılmış ve bu hücrelerdeki anomalilere bakılmıştır. Fakat bazı konsantrasyonlar, mitozun anafaz ve telofaz safhalarının oluşumunu engellediği için ya 500 hücreden daha az hücre sayılmıştır ya da sayım işlemi gerçekleştirilememiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise anafaz-telofaz harici oluşan anomalilere bakılmıştır. Bu amaçla da yaklaşık her konsantrasyondan 5000 hücre sayılmıştır. Anafaz-telofaz kromozom anomalilerinin incelenmesi aşamasında, yapışkanlık, anafaz köprüleri, kalın kromozom ve bozulmuş anafaz-telofaz anomalileri incelenmiştir. Çalışılan diğer anomali tipleri ise C-metafaz, poliploidi ve binükleer hücre oluşumlarıdır. Bu bozukluklara ait fotoğraflar Şekil 3.7’de verilmiştir. Çalışma her ekstre için ayrı ayrı yapılmış olup kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Tüm *Allium* testi çalışmalarında olduğu gibi 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı süre uygulaması tatbik edilmiştir. Oluşan her bir anomalinin çalışılan hücre sayısına göre yüzdesi hesaplanmıştır. Daha sonra oluşan toplam anomali yüzdeleri, Duncan çoklu dağılım testi ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.7. *Limonium globuliferum* yaprak su ekstreleri mitotik indeks ve mitotik safhaların oranları.

Konsantrasyon (g /L)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± Stantard sapma	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Stantard sapma			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5010	32,13±1,14a	88,5±2,33a	1,66±0,32a	2,82±0,51a	7,02±1,7ab
25	5187	29,76±2,38ab	94,41±0,82b	0,34±0,09b	0,73±0,31b	4,52±0,49a
50	5233	26,68±1,78ab	82,74±1,91c	4,73±0,52c	2,85±0,49a	9,68±1,55b
100	5196	25,39±1,85b	81,87±1,89c	4,99±0,63c	3,03±0,61a	10,11±1,46b
Kontrol- 48 saat	5118	31,61±1,01a	90,45±0,6a	2,45±0,27a	2,68±0,19a	4,42±0,72a
25	5089	29,87±0,55a	88,55±1,61ab	3,59±0,47a	2,75±0,38a	5,11±1,09a
50	5233	26,72±1,03b	84,71±1,2b	3,35±0,41a	3,72±0,57a	8,22±0,62b
100	5154	25,87±0,67b	85,19±1,26b	3,66±0,36a	3,41±0,43a	7,74±0,76b
Kontrol-72 saat	5056	30,84±1,98a	90,2±2,63a	2,43±0,96a	1,72±0,88a	5,65±1,38ab
25	5193	38,55±1,53b	83,75±1,3b	4,22±0,46a	4,66±0,52b	7,37±0,79b
50	5081	45,93±1,02c	90,5±0,43a	3,25±0,53a	1,63±0,19a	5,62±0,62ab
100	5150	48,70±0,8c	92,38±0,35a	2,79±0,35a	1,15±0,11a	3,68±0,26a

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)



Şekil 3.7. Kromozom aberasyonu çalışmasında görüntülenen bazı anomaliler. A) Yapışıklık, B-G-I) Geri kalmış kromozomlar, C) Üçlü anafaz köprüsü, D-F) Tekli anafaz köprüsü, E) İkili anafaz köprüsü, H- J-K) Bozulmuş anafaz-telofaz, L) C-Mitoz.

Bitki ekstreleri ile yapılan anomali çalışmalarından elde edilen bilgiler ışığında bazı konsantrasyonların önemli ölçüde anomali oluşturdukları görülmüştür. *Limonium effusum* kök su ekstrelerinde yapılan çalışmanın 24 saat uygulamasında, 10 g/L ve 20 g/L konsantrasyonlarında toplam anafaz-telofaz anomalisi miktarının bariz bir şekilde arttığı görülmüştür. 40 g/L'lik konsantrasyonda ise anafaz ve telofaz safhaları çok büyük oranda azalmıştır ve dolayısıyla sayılabilecek yeterli hücre bulunamamıştır. Diğer anomalilerde ise 10 g/L ve 20 g/L konsantrasyonları başta C-metafaz olmak üzere anomalileri artırmıştır. *Limonium effusum* kök su ekstrelerinde, 48 saat uygulamasında 20 g/L konsantrasyonunda yine yeterli anafaz-telofaz safhası bulunamadığı için sayım yapılamamıştır. Diğer konsantrasyonlarda hem anafaz-telofaz hem de diğer anomalilerde artış gözlenmiştir. *Limonium effusum* kök su ekstrelerinde, 72 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlarda anafaz-telofaz anomali oranında artış gözlenirken diğer anomali oranlarında azalma görülmüştür. *Limonium effusum* kök su ekstrelerine ait tüm kromozom aberasyonu verileri ve bu verilerin istatistiki değerlendirmeleri Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Limonium effusum gövde su ekstrelerinde yapılan çalışmanın tüm konsantrasyonlarında ve uygulanan bütün sürelerde, anafaz-telofaz anomalilerinde önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Diğer anomalilerde ise bazı konsantrasyonlar hariç önemli farklar bulunamamıştır. *Limonium effusum* gövde su ekstrelerine ait tüm kromozom aberasyonu verileri ve bu verilerin istatistiki değerlendirmeleri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Limonium effusum yaprak su ekstrelerinde yine yapılan çalışmanın tüm konsantrasyonlarında ve uygulanan bütün sürelerde, anafaz-telofaz anomalilerinde önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Diğer anomalilerde ise özellikle 72 saat uygulamasının tüm konsantrasyonlarında azalma tespit edilmiştir. *Limonium effusum* gövde su ekstrelerine ait tüm kromozom aberasyonu verileri ve bu verilerin istatistiki değerlendirmeleri Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Limonium globuliferum kök su ekstrelerinde yapılan çalışmanın tüm süre uygulamalarında ve tüm konsantrasyonlarda anafaz-telofaz ve diğer anomalilerde artış gözlemlenmiştir. *Limonium globuliferum* kök su ekstrelerine ait tüm kromozom aberasyon verileri ve bu verilerin istatistiksel değerlendirmeleri

Çizelge 3.8. *Limonium effusum* kök su ekstreleri kromozom aberasyonu sonuçları.

Konsantrasyon (g/L)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)					Diğer Anormallikler (%)				
		Yapışıklık	Anafaz köprüsü	Kalgın kromozom	Bozulmuş anafaz-telofaz	Toplam Anormallikler (%± S.S)	Sayılan hücre sayısı	C-mitoz	Poliploidi	Binükleer Hücre	Toplam (%± S.S)
Kontrol-24 saat	500	1,4	2,6	3,4	9,2	16,6±1,6a	5010	0,11	0,12	-	0,23±0,18a
10	500	11,2	6	12	22,6	51,8±1,71b	5061	0,26	0,05	-	0,31±0,1a
20	500	23,05	6,34	18,18	6,79	54,34±1,56b	5283	0,32	-	0,1	0,33±0,06a
40	-	-	-	-	-	-	5118	0,06	-	0,06	0,12±0,08a
Kontrol- 48 saat	500	1,4	3	3,2	8,4	16±1,22a	5118	0,04	-	-	0,04±0,03a
10	500	18,6	3,2	4,6	10,4	36,8±2,88b	5297	0,06	0,06	0,06	0,18±0,08a
20	-	-	-	-	-	-	5209	0,03	-	0,1	0,13±0,03a
40	289	22,34	3,8	11,87	14,17	52,14±2,09c	5132	-	-	0,53	0,53±0,12b
Kontrol- 72 saat	500	12,4	8,4	5,8	7,2	33,8±1,11a	5056	0,18	0,05	-	0,23±0,11a
10	476	9,44	2,53	12,71	28,65	53,33±1,29b	5279	0,17	0,08	-	0,25±0,04a
20	90	1,05	3,93	21,17	28,91	55,06±1,89b	5145	0,12	-	0,08	0,20±0,02a
40	65	2,22	5,09	20,86	28,87	57,04±2,12b	5190	0,14	-	0,1	0,15±0,03a

Not: 40 g/L 24 saatlik uygulamada çok az anafaz-telofaz hücresi olduğu için sayılmamıştır.

20 g/L 48 saatlik uygulamada çok az anafaz-telofaz hücresi olduğu için sayılmamıştır.

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Çizelge 3.9. *Limonium effusum* gövde su ekstraları kromozom aberasyonu sonuçları.

Konsantrasyon (g/L)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)					Diğer Anormallikler (%)				
		Yapışıklık	Anafaz köprüsü	Kalın kromozom	Bozulmuş anafaz-telofaz	Toplam Anormallikler (%± S.S)	Sayılan hücre sayısı	C-mitoz	Poliploidi	Binükleer Hücre	Toplam (%± S.S)
Kontrol-24 saat	500	1,4	2,6	3,4	9,2	16,6±1,6a	5010	0,11	0,12	-	0,23±0,18a
25	500	11,6	6,2	21,4	19,6	58,8±1,98b	5152	0,29	-	-	0,29±0,08a
50	465	14,37	5,92	14,23	12,54	47,06±1,8c	5161	0,1	-	-	0,1±0,09a
100	189	14,06	3,46	22,73	12,57	52,82±1,66d	5158	0,08	-	0,04	0,12±0,08a
Kontrol- 48 saat	500	1,4	3	3,2	8,4	16±1,22a	5118	0,04	-	-	0,04±0,03a
25	500	20,59	5,17	17,55	11,9	55,22±3,68b	5067	0,14	-	-	0,14±0,18a
50	500	14,6	6,4	19,2	16,1	56,8±3,38b	5259	0,36	-	-	0,36±0,17b
100	500	15,4	6,2	21,4	11,8	54,8±2,88b	5422	0,07	-	0,03	0,1±0,07a
Kontrol- 72 saat	500	12,4	8,4	5,8	7,2	33,8±1,11a	5056	0,18	0,05	-	0,23±0,11a
25	500	15,99	4,35	20,14	11,6	52,08±2,52b	5273	0,03	-	0,02	0,05±0,1b
50	500	10,2	4,4	18,6	24,6	57,08±1,15c	5148	0,06	0,02	0,02	0,1±0,08a
100	500	12,6	4,8	21	32,6	71±1,37d	5239	0,1	-	0,19	0,2±0,1a

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Çizelge 3.10. *Limonium effusum* yaprak su ekstraları kromozom aberasyonu sonuçları.

Konsantrasyon (g/L)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)					Diğer Anormallikler (%)				
		Yapışıklık	Anafaz köprüsü	Kalın kromozom	Bozulmuş anafaz-telofaz	Toplam Anormallikler (%± S.S)	Sayılan hücre sayısı	C-mitoz	Poliploidi	Binükleer Hücre	Toplam (%± S.S)
Kontrol-24 saat	500	1,4	2,6	3,4	9,2	16,6±1,6a	5010	0,11	0,12	-	0,23±0,18a
32.5	440	27,97	1,68	9,86	8,38	47,89±1,72b	5226	0,12	0,05	-	0,17±0,08a
65	392	19,71	4,03	9,57	9,78	43,09±0,72c	5193	0,02	-	-	0,02±0,07b
130	339	15,6	4,24	10,37	9,12	39,33±1,49c	5114	0,07	-	-	0,07±0,05b
Kontrol- 48 saat	500	1,4	3	3,2	8,4	16±1,22a	5118	0,04	-	-	0,04±0,03a
32.5	500	11,2	7,2	9,4	28,4	56,2±2,78b	5197	0,19	0,02	-	0,21±0,1b
65	450	13,48	6,74	23,01	16,91	60,14±2,22b	5075	0,35	-	-	0,35±0,16b
130	379	13,69	4,74	24,81	13,71	56,95±1,84b	5227	0,22	-	-	0,22±0,09b
Kontrol- 72 saat	500	12,4	8,4	5,8	7,2	33,8±1,11a	5056	0,18	0,05	-	0,23±0,11a
32.5	500	17,1	3,07	19,69	10,57	50,43±1,31b	5110	0,12	-	0,1	0,13±0,1a
65	416	19,94	2,14	5,21	19,84	47,13±3,34b	5189	0,04	-	0,02	0,06±0,11b
130	380	19,12	3,22	5,75	11,92	40,01±1,33c	5167	0,04	-	-	0,04±0,07b

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Limonium globuliferum gövde su ekstralarında yapılan çalışmada 25 g/L konsantrasyonunda anafaz-telofaz anomali oranında kontrol grubuna göre azalmalar görülmüştür. 50 g/L ve 100 g/L konsantrasyonlarında ise anafaz-telofaz anomali oranında artış bulunmuştur (72 saat 50 g/L konsantrasyonu hariç). *Limonium globuliferum* kök su ekstralarına ait tüm kromozom aberasyonu verileri ve bu verilerin istatistiki değerlendirmeleri Çizelge 3.12’de verilmiştir.

Limonium globuliferum yaprak su ekstralarında yapılan çalışmanın tüm süre uygulamalarında ve tüm konsantrasyonlarda anafaz-telofaz anomalilerinde ve diğer anomalilerde artış tespit edilmiştir. *Limonium globuliferum* kök su ekstralarına ait tüm kromozom aberasyonu verileri ve bu verilerin istatistiki değerlendirmeleri Çizelge 3.13’de verilmiştir.

Çizelge 3.11. *Limonium globuliferum* kök su ekstreleri kromozom aberasyonu sonuçları.

Konsantrasyon (g/L)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)					Diğer Anormallikler (%)				
		Yapışıklık	Anafaz köprüsü	Kalın kromozom	Bozulmuş anafaz-telofaz	Toplam Anormallikler (%± S.S)	Sayılan hücre sayısı	C-mitoz	Poliploidi	Binükleer Hücre	Toplam (%± S.S)
Kontrol-24 saat	500	1,40	2,6	3,4	9,2	16,6±1,16a	5010	0,11	0,12	-	0,23±0,18a
16.25	418	9,54	7,59	17,14	16,16	50,43±2,22b	5277	0,14	0,12	-	0,26±0,04a
32.5	254	6,9	12,42	19,30	13,83	52,46±2,99b	5164	0,16	-	-	0,16±0,03a
65	151	16,45	11,3	14,15	11,48	53,39±2,14b	5183	0,1	0,02	0,03	0,15±0,6a
Kontrol- 48 saat	500	1,4	3	3,2	8,4	16±1,22a	5118	0,04	-	-	0,04±0,03a
16.25	197	15,35	7,02	17,9	6,97	47,24±3,49b	5181	0,31	0,1	0,13	0,54±0,05b
32.5	162	19,25	5,24	13,96	15,68	54,12±4,01bc	5322	0,08	0,12	-	0,2±0,09a
65	290	13,83	10,86	15,3	15,3	58,99±3,25c	5245	0,35	-	-	0,35±0,14b
Kontrol- 72 saat	500	12,4	8,4	5,8	7,2	33,8±1,11a	5056	0,18	0,05	-	0,23±0,11a
16.25	400	11,98	7,77	18,75	16,05	54,55±3,1b	5411	0,14	-	-	0,14±0,02a
32.5	384	19,7	10,3	18,46	18,51	66,97±8,79c	5208	0,21	0,02	0,15	0,38±0,04b
65	350	20,71	9,82	15,78	22,52	68,83±1,46c	5241	0,25	0,02	0,18	0,45±0,08b

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Çizelge 3.12. *Limonium globuliferum* gövde su ekstraları kromozom aberasyonu sonuçları.

Konsantrasyon (g/L)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)					Diğer Anormallikler (%)				
		Yapışıklık	Anafaz köprüsü	Kalın kromozom	Bozulmuş anafaz-telofaz	Toplam Anormallikler (%± S.H)	Sayılan hücre sayısı	C-mitoz	Poliploidi	Binükleer Hücre	Toplam (%± S.H)
Kontrol-24 saat	500	1,4	2,6	3,4	9,2	16,6±1,6ab	5010	0,11	0,12	-	0,23±0,18a
25	330	2,32	1,2	2,52	6,57	12,61±1,66a	5157	0,14	0,02	-	0,16±0,04a
50	347	11,4	-	6,91	3,03	21,34±1,72b	5079	-	-	0,2	0,2±0,04a
100	142	5,86	2,34	0,74	7,94	16,88±2,44ab	5255	0,19	-	0,24	0,43±0,22b
Kontrol- 48 saat	500	1,4	3	3,2	8,4	16±1,22a	5118	0,04	-	-	0,04±0,03a
25	500	5,1	2	2,6	6,2	15,9±2,65a	5104	0,04	-	0,02	0,06±0,04a
50	168	3,01	6,02	5,42	6,63	21,07±1,09a	5223	0,06	-	0,04	0,1±0,04a
100	140	10,53	6,8	5,2	8,8	31,33±3,59b	5089	0,14	0,02	-	0,16±0,05a
Kontrol- 72 saat	500	12,4	8,4	5,8	7,2	33,8±1,11a	5056	0,18	0,05	-	0,23±0,11a
25	500	16	3,6	6,4	7	33±2,3a	5232	0,13	-	0,06	0,19±0,06a
50	500	7	1,2	5,4	5	18,6±2,15b	5230	0,44	-	-	0,44±0,14b
100	324	29,84	29	12,22	17,51	65,37±2,02c	5207	0,21	0,48	0,04	0,73±0,4b

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Çizelge 3.13. *Limonium globuliferum* yaprak su ekstreleri kromozom aberasyonu sonuçları.

Konsantrasyon (g/L)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)					Diğer Anormallikler (%)				
		Yapışıklık	Anafaz köprüsü	Kalın kromozom	Bozulmuş anafaz-telofaz	Toplam Anormallikler (%± S.S)	Sayılan hücre sayısı	C-mitoz	Poliploidi	Binükleer Hücre	Toplam (%± S.S)
Kontrol-24 saat	500	1,4	2,60	3,4	9,2	16,6±1,6a	5010	0,11	0,12	-	0,23±0,18a
25	362	20,71	4,79	15,88	15,95	57,33±1,29b	5187	0,66	-	0,12	0,78±0,11b
50	465	23,65	3,92	3,65	18,62	49,84±4,63b	5233	0,13	-	0,1	0,23±0,04a
100	435	25,01	4,47	5,56	18,33	53,37±1,87b	5196	0,14	-	0,12	0,26±0,03a
Kontrol- 48 saat	500	1,4	3	3,2	8,4	16±1,22a	5118	0,04	-	-	0,04±0,03a
25	215	10,22	7,33	14,48	18,42	50,43±2,17b	5089	0,16	-	0,33	0,49±0,17b
50	262	13,27	9	18,17	14,90	55,36±2,6b	5233	0,35	0,06	0,13	0,54±0,09b
100	233	13,63	10,48	21,4	15,74	61,25±1,41c	5154	0,39	0,08	0,15	0,62±0,06b
Kontrol- 72 saat	500	12,4	8,4	5,8	7,2	33,8±1,11a	5056	0,18	0,05	-	0,23±0,11a
25	500	14,4	4	10,2	14,6	43,2±1,65b	5193	0,19	-	0,04	0,23±0,05a
50	500	19,2	3,6	12,4	15,2	50,4±1,98c	5081	0,02	-	0,41	0,43±0,19b
100	430	20,2	4,2	13,2	16,2	53,8±1,59c	5150	0,06	-	0,32	0,38±0,11a

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

3.2. AMES Testine Ait Bulgular

AMES testi, kullanılan bitki ekstralarına ait farklı dozların mutajenik özelliğe sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla histidin üretemeyen *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 bakteri suşları kullanılmış olup, bu suşların histidin üretebilir hale gelip gelmediklerine bakılarak bitki ekstralarının mutajeniteleri belirlenmiştir. Histidin üretebilir hale gelen bakterilerin oluşturdukları kolonilerin sayısı, negatif kontrol grubunun (bitki ekstralarının çözücülerini) koloni sayısı ile karşılaştırılmıştır. Buna göre negatif kontrol grubunun koloni sayısını iki katına çıkaran konsantrasyon değeri mutajenik konsantrasyon olarak kabul edilmektedir. Koloni sayısında doza bağlı bir artış olma durumunda ise bu maddenin, zayıf mutajenik etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

3.2.1. Sitotoksik dozların belirlenmesi

Yapılan sitotoksik testleri sonucunda kullandığımız 6 konsantrasyon (10000, 1000, 100, 10, 1 ve 0.1 µg/plak) içerisinde *Limonium effusum* ve *Limonium globuliferum* kök ekstralarının 10000 µg/plak konsantrasyonları hariç, diğer ekstraların farklı konsantrasyonlarının tamamında sitotoksik etki görülmemiştir.

Sitotoksik etki gösteren ekstraların konsantrasyonları AMES deneylerinde kullanılmıştır. Bu sebepten *Limonium effusum* ve *Limonium globuliferum* kök ekstralarıyla yapılan denemelerde 10000 µg/plak dışındaki diğer beş konsantrasyon kullanılmıştır. Diğer ekstralarla yapılan denemelerde ise altı konsantrasyonun tamamı kullanılmıştır.

3.2.2. AMES deneyi bulguları

AMES testinde, *Limonium effusum* ve *Limonium globuliferum* bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen metanol, aseton:metanol (2:1) ve distile su ekstraları kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak bu ekstraların çözücülerini kullanılırken, pozitif kontrol grubu olarak da TA98 S9'suz çalışma için 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD), S9'lu çalışma için ise 2-aminofluoren (2AF), TA100 S9'suz

deney için Sodyum azid (SA) ve S9'lu için ise 2-aminoantrasen (2AA) kullanılmıştır. AMES testinin başlangıcında bitki ekstralarının sitotoksik dozları belirlenmiştir. Daha sonra deney belirlenen dozlarla S9 enzimi varlığında ve yokluğunda her iki suş ile üçer tekrarlı yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiki analizi, SPSS 15.0 programı Oneway ANOVA Dunnet- t testine göre yapılmıştır.

Yapılan testler sonucunda elde edilen bulgulara göre, aseton:metanol (2:1) ekstresi ile yapılan çalışmalarda her iki suşun S9 karaciğer enzimi fraksiyonunun varlığında ve yokluğunda koloni sayısını iki katına çıkaran bir konsantrasyon tespit edilememiştir. Aynı zamanda doza bağlı olarak koloni sayısında yine bir artış bulunamamıştır. Bu sonuçlar, aseton:metanol (2:1) ekstresinin kullanılan tüm dozlarının mutajenik etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Aseton:metanol (2:1) ekstresiyle elde edilen tüm bulgular ve istatistiki veriler Çizelge 3.14'te verilmiştir.

Metanol ekstralarından elde edilen bulgulara göre *L. globuliferum* yaprak TA98 suşu ile yapılan S9 enzimi yokluğundaki 10000 µg/plak konsantrasyonu negatif kontrol koloni sayısını yaklaşık iki katına çıkardığı için mutajenik konsantrasyon olarak kabul edilmiştir. *L. effusum* kök ekstresinde TA98 suşu ile yapılan S9 enzimi varlığı ve yokluğunda yapılan mutajenite testinde doza bağlı koloni sayısında artış gözlenmiştir. Konsantrasyon 0,1 µg/plak'tan 1000 µg/plak'a yükseldikçe koloni sayısı artmıştır. Buna göre de *L. effusum* kök metanol ekstresinin düşük toksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Diğer bazı konsantrasyonlarda da koloni sayısında istatistiki açıdan önemli artış ve azalmalar görülmüştür. Metanol ekstraları ile yapılan AMES testine ait bulgular ve istatistiki sonuçlar Çizelge 3.15'te verilmiştir. Distile su ekstraları ile yapılan çalışmanın sonuçlarına göre ise *L. effusum* kök ekstralarının TA98 S9 enzimi varlığında yapılan deneyde düşük toksik etkiye rastlanmıştır. Diğer bir ifadeyle metanol ekstralarında olduğu gibi yine bu ekstrede de TA98 suşunda konsantrasyona bağlı koloni sayısında artış tespit edilmiştir. Ayrıca *L. globuliferum* kök 0,1 µg/plak ve 1 µg/plak konsantrasyonları, gövde ve yaprak kısımlarının ise tüm konsantrasyonlarında mutajenik etki saptanmıştır. Koloni sayısı yaklaşık olarak beş kat artış göstermiştir. Distile su ile yapılan AMES testine ait tüm veriler ve istatistiki değerlendirmeler Çizelge 3.16'da verilmiştir.

Genel olarak bakıldığında TA98 veya TA100 suşlarıyla yapılan tüm çalışmalarda S9 enzimi varlığında mutajeniteye rastlanmamıştır. Sadece enzim varlığında doza bağlı koloni sayısında artış tespit edilmiştir. Bu sonuç da ökaryotlarda bulunan bu enzimin varlığında etkinin düşük toksik düzeyde olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.14. Aseton:metanol (2:1) ekstreleri ile yapılan AMES testinin sonuçları.

Materyal	Konsantrasyon (µg/plak)	TA98 S9'suz	TA98 S9'lu	TA100 S9'suz	TA100 S9'lu
		Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma
(-) Kontrol Aseton:metanol (2:1)		24,8±1,30	29±2,92	135,8±4,38	139,6±3,81
SA	10	2817,6±5,59*			
2AA	5	2880±19,45*			
2AF	200	2752±43,24*			
NPD	200	2514±39,75*			
<i>L. effusum</i> kök	1000	32±3,00	28,2±1,92	119,6±1,67	137,4±22,90
	100	25,6±3,51	26±3,16	136±2,12	138,6±8,88
	10	27,6±7,09	28,2±1,92	118,4±1,14	213,4±48,27*
	1	32,6±1,52	24,8±3,03	121,2±1,64	141±21,63
	0.1	28,4±5,81	24,8±2,17	246,2±3,27*	202,6±46,05*
<i>L. effusum</i> gövde	10000	24,8±3,56	24,6±3,05	140,8±3,56	121,4±1,82
	1000	27,4±2,61	25,4±3,21	198,4±1,14*	130±0,71
	100	21,8±2,49	26,4±1,67	163,4±3,36*	236±5,34*
	10	27,6±2,07	26±3,16	154,2±5,02	145,6±2,61
	1	32,6±2,07	27,6±2,41	195,8±15,55*	121,4±1,34
0.1	36,4±6,19	29,6±1,67	148,2±4,66	126,2±3,96	
<i>L. effusum</i> yaprak	10000	27,8±4,09	33±1,87	126,8±1,64	143±1,41
	1000	28,8±4,32	33,4±2,88	141,8±3,63	138±1,87
	100	28,8±4,60	30,4±2,97	142,8±2,17	131,8±2,49
	10	30,4±4,56	29,6±3,36	114±1,22*	117±3,24
	1	32,4±5,18	34,4±2,30	129,8±2,28	150,4±0,89
0.1	26,6±2,41	32,6±4,04	116,6±4,10*	127,4±1,95	
<i>L. globuliferum</i> kök	1000	25±6,89	24,2±1,92	145,8±16,93	187,2±29,55*
	100	27,2±4,92	27,2±1,92	138,6±5,13	125±11,34
	10	23,4±3,78	25,6±3,05	141,6±14,12	156,8±21,02
	1	26,4±3,29	27,4±2,07	122,8±16,78	144±15,83
	0.1	30,6±7,06	27,2±2,77	107,8±9,73*	136,4±11,06
<i>L. globuliferum</i> gövde	10000	28,4±8,62	32±5,57	109,6±12,12*	147±25,71
	1000	30,4±2,19	29,4±3,58	112,2±11,73*	135±10,27
	100	29,6±2,97	27,4±1,52	123,8±9,34	152±10,56
	10	27,2±4,15	27,6±2,07	141,6±17,07	160,8±24,14
	1	27,8±2,39	23,4±1,52	132,6±17,67	163±7,48
0.1	41±7,38*	24,4±3,51	134±7,38	166±14,30	
<i>L. globuliferum</i> yaprak	10000	36,2±2,77	24,4±1,95	168,2±19,75*	173,8±15,61*
	1000	26,6±1,14	23,2±1,92	128,2±6,94	139,4±19,06
	100	24,8±4,87	26,2±1,48	119,6±9,91	133±16,75
	10	27,6±1,67	25±2,92	127±16,94	143,4±11,06
	1	27±3,94	25±1,58	117,6±5,32	141,4±10,99
0.1	27,8±8,20	25±1,58	121,4±6,07	155,6±12,40	

* işareti Dunnet t testine göre istatistiki açıdan önemli değerleri göstermektedir (Ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli). Pozitif kontroller; SA: Sodyum azid, 2AA: 2-aminoantrasen, 2AF: 2-aminofluoren, NPD: 4-nitro-o-fenilendiamin.

Çizelge 3.15. Metanol ekstreleri ile yapılan AMES testinin sonuçları.

Materyal	Konsantrasyon (µg/plak)	TA98 S9'suz	TA98 S9'lu	TA100 S9'suz	TA100 S9'lu
		Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma
(-) Kontrol Metanol		37±3,61	39,6±5,32	122,8±1,92	122±4,18
SA	10	2280,6±3,78*			
2AA	5	2301±6,52*			
2AF	200	2752±43,24*			
NPD	200	2514±39,75*			
<i>L. effusum</i> kök	1000	40,2±4,55	66±*2,74	96,6±4,72*	119,6±2,97
	100	32,6±1,67	58,2±*4,15	147,4±3,85*	139,4±4,39*
	10	31,4±1,14	56±7,52	146,4±1,34*	165,6±4,83*
	1	30±0,71	48,8±6,14	121,2±2,39	152,4±7,02*
	0.1	28±2,65	44,2±4,55	156,2±1,30*	154,8±6,87*
<i>L. effusum</i> gövde	10000	29,6±4,04	35,6±1,34	56,2±2,95*	58,4±4,10*
	1000	27,6±2,88	56,2±12,24	107,6±2,07*	155,4±1,52*
	100	31,4±2,51	50,8±6,06	125,6±2,88	152,4±3,58*
	10	30,8±2,39	46,6±6,11	137±3,87*	158,4±3,65*
	1	38,6±2,19	49±4,42	135,2±0,45*	162,4±3,29*
	0.1	29,8±5,07	49,6±3,85	130,8±1,64*	141,8±2,59*
<i>L. effusum</i> yaprak	10000	27,8±4,76	55,4±7,02	104,8±1,10*	119,4±4,72
	1000	25,2±0,84	54,2±8,53	134,8±1,64*	137,4±2,51*
	100	34,6±1,67	45,2±3,35	127,2±4,15	155±2,92*
	10	24,8±3,70	50±2,92	178±4,18*	148,2±8,93*
	1	27,4±3,29	51,6±2,70	118,2±3,03	171,2±6,14*
	0.1	35,2±3,11	50,4±2,88	126,2±2,95	164±3,32*
<i>L. globuliferum</i> kök	1000	24±1,87	65,2±4,87*	143±3,67*	122,6±3,51
	100	32,2±2,49	64±2,83*	139,6±3,21*	126,6±6,77
	10	31,4±1,14	61,2±4,38*	149±2,24*	141±4,85*
	1	38±1,58	67,6±4,98*	133,8±2,28*	122,6±3,65
	0.1	36±2,24	49,2±7,16	125,4±1,95	115,4±2,97
<i>L. globuliferum</i> gövde	10000	31,4±1,52	52,8±5,07	122±2,35	135,4±5,22*
	1000	37,8±2,28	58,2±3,56*	124,6±2,41	132,6±3,05*
	100	33,2±0,84	53,2±5,89	130,8±2,77*	129±3,08
	10	33,8±3,35	57,4±3,85	157,6±1,34*	142,6±3,78*
	1	31,4±5,98	55,2±4,82	214,4±1,34*	119,6±2,97
	0.1	32,6±2,70	51,2±8,07	170,8±2,17*	127,2±2,95
<i>L. globuliferum</i> yaprak	10000	86,4±5,32*m	49,2±8,11	153,8±1,64*	149,2±3,56*
	1000	31,6±1,82	55±8,40	122,4±2,61	133,2±3,90*
	100	31±3,54	59,2±6,06*	152,2±1,10*	129,8±3,11
	10	28,4±6,88	59,2±6,83*	121,2±1,79	131,4±2,51*
	1	30±4,47	47,2±7,66	134,4±2,70*	136,2±2,59*
	0.1	30,6±3,65	66±5,10*	125,8±1,64	139,6±3,29*

* işareti Dunnet t testine göre istatistiki açıdan önemli değerleri göstermektedir (Ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli). Pozitif kontroller; SA: Sodyum azid, 2AA: 2-aminoantrasen, 2AF: 2-aminofluoren, NPD: 4-nitro-o-fenilendiamin. m: mutajen

Çizelge 3.16. Distile su ekstreleri ile yapılan AMES testinin sonuçları.

Materyal	Konsantrasyon	TA98 S9'suz	TA98 S9'lu	TA100 S9'suz	TA100 S9'lu
		Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma	Ort. koloni sayısı ± Std. Sapma
(-) Kontrol distile su		28±3,08	33±3,61	115,6±0,89	123,2±1,64
SA	10	1622,8±11,63*			
2AA	5	2647±4,69*			
2AF	200	2752±43,24*			
NPD	200	2514±39,75*			
<i>L. effusum</i> kök	1000	22,2±2,17	37±3,81	147,4±1,52*	119,2±1,30*
	100	24,4±7,92	31,4±1,95	123±0,71*	124,4±1,52
	10	29,2±0,84	28,2±3,27	126,6±1,67*	123±2,00
	1	31,4±2,88	27,4±2,07	131,4±1,52*	126,4±0,89
	0.1	27,2±2,49	27,2±2,17	115,4±1,52	103±1,87*
<i>L. effusum</i> gövde	10000	35,4±2,70	32,8±1,64	205,8±2,17*	195,8±2,77*
	1000	25,4±5,08	30,2±2,39	135±1,87*	105,6±4,04*
	100	25,2±4,97	27,4±2,70	116,8±2,49	116,4±2,07*
	10	22,2±1,48	27,2±1,92	124,8±1,48*	113,6±2,07*
	1	28,8±2,59	25,6±2,70	113,4±1,67	112,2±0,84*
0.1	51,4±2,07*	29,4±2,41	118,2±2,28	107,8±1,92*	
<i>L. effusum</i> yaprak	10000	37,2±1,92	28±2,92	147,4±1,67*	160±1,58*
	1000	29,6±3,29	27±2,12	108,4±1,14*	125±2,55
	100	34,8±2,59	27±2,55	123,2±1,64*	122,2±1,30
	10	30,6±4,88	25,4±2,07	121,2±2,39	106±0,71*
	1	28,6±1,95	26±1,58	113,6±2,19	106±1,00*
0.1	35,4±2,30	30,2±1,92	117,4±1,82	109,6±0,55*	
<i>L. globuliferum</i> kök	1000	23,6±1,67	29,6±2,70	135,4±2,61*	122,2±2,77
	100	22,4±1,82	24,4±3,36	116±1,00	125,8±1,48
	10	21,6±0,55	25,4±2,30	109,6±1,82*	118,2±1,10*
	1	22,6±3,13	28,2±3,11	543,4±1,52*m	120±1,22
	0.1	30±2,24	24,6±1,82	622,2±2,39*m	123,2±1,79
<i>L. globuliferum</i> gövde	10000	24±2,24	25,2±3,19	479±1,00*m	167,6±2,51*
	1000	29,2±4,21	30,6±4,34	578,6±1,14*m	117,2±2,59*
	100	26,6±1,52	20±3,08	534±2,24*m	133,2±1,30*
	10	24,4±4,98	25±2,35	583,2±2,95*m	132±1,22*
	1	27,4±3,05	25,8±1,92	539,2±4,15*m	139,4±1,67*
0.1	26±4,74	28,6±3,97	596,8±2,05*m	125,4±1,82	
<i>L. globuliferum</i> yaprak	10000	25,4±2,97	25,2±2,59	513,6±2,97*m	170,8±0,84*
	1000	25,6±0,89	26,8±3,03	679,4±1,52*m	115±0,71*
	100	29,8±5,89	27,8±1,92	695,2±4,60*m	106±1,41*
	10	30,8±3,96	22,6±2,30	626,8±4,60*m	109,8±0,84*
	1	21,8±3,42	25,8±3,27	526,2±2,17*m	106,2±2,17*
0.1	28,8±3,35	24,8±1,48	587,6±5,03*m	110,6±3,29*	

* işareti Dunnet t testine göre istatistiki açıdan önemli değerleri göstermektedir (Ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli). Pozitif kontroller; SA: Sodyum azid, 2AA: 2-aminoantrasen, 2AF: 2-aminofluoren, NPD: 4-nitro-o-fenilendiamin. m: mutajen

3.3. MTT Testine Ait Bulgular

Mitokondriyal aktiviteyi ölçme amacına dayanan MTT testi, her bir ekstrenin farklı konsantrasyonlarında dört gün boyunca MDBK hücrelerine muamele edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µg/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plaklarda yapılan denemeler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Hücreler, 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca bitki ekstrelerine maruz bırakılmıştır. Hergün plakların absorbanslarının ELISA cihazında okunmasıyla sonuçlar elde edilmiştir. Her süre için ekstrelerin farklı konsantrasyonları ayrı ayrı denenmiştir. Negatif kontrol grubu olarak da ekstrelerin çözücüleri kullanılmıştır. Metanol ve aseton:metanol hücrelerin bulunduğu besiyeri ortamına % 0.1 geçmeyecek kadar ilave edilmiştir. Okunan absorbans değerlerinin ortalamaları alınmış ve bu ortalamalardan canlı hücrelerin sayısının kontrole göre oranını veren % proliferasyon değerleri hesaplanmıştır. % proliferasyon oranı, şu formülle hesap edilmiştir (Seo, 2005);

$$\% \text{ proliferasyon oranı} = (B-A) * 100 / A,$$

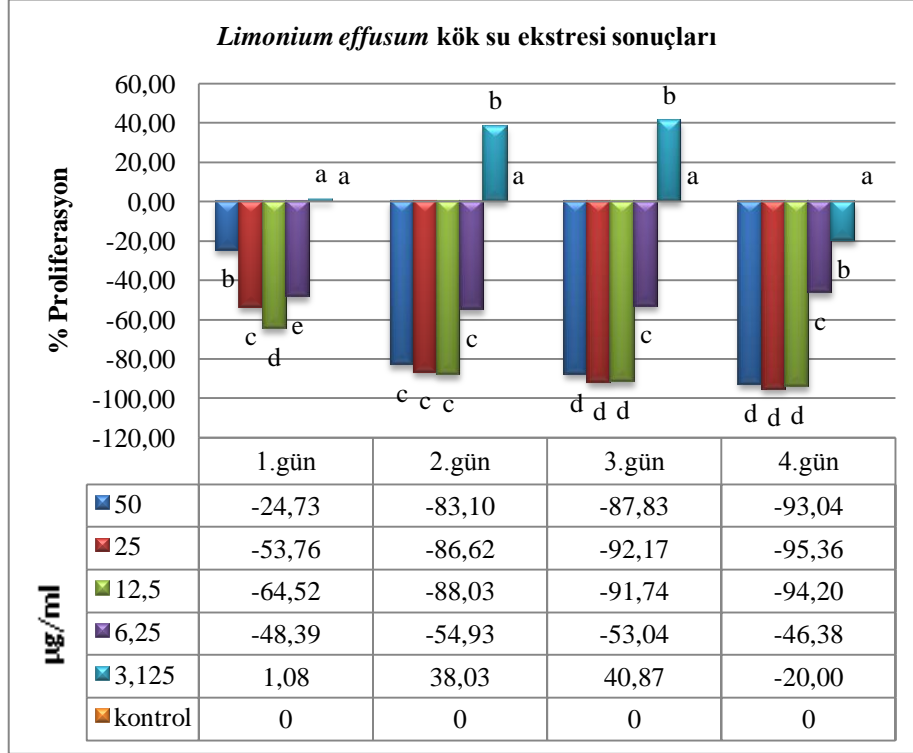
Burada A: kontrol grubu absorbans değeri B: örnek uygulanmış grupların absorbans değerini göstermektedir.

Elde edilen proliferasyon verilerin istatistiki analizi, SPSS 15.0 programında Oneway ANOVA varyans analizi Duncan çoklu dağılım test sistemi ile $p < 0.05$ önemlilik düzeyinde yapılmıştır.

Çalışma sonucunda *Limonium effusum* kök metanol ekstresinin 50 µg/ml konsantrasyonu hücre canlılığını en fazla artıran (% 347.62) konsantrasyon olarak bulunmuştur. Hücre canlılığını en fazla azaltan konsantrasyon ise *Limonium globuliferum* gövde su ekstresinin, 50 µg/ml konsantrasyonu olarak bulunmuştur. Genel olarak, uygulama süresi uzadıkça ve konsantrasyon arttıkça hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. Her iki türün yaprak su ekstreleri 6.25 ve 3.125 µg/ml konsantrasyonlarında üçüncü güne kadar azalan oranlarla hücre canlılığında artış göstermiştir. Genellikle diğer ekstrelerde görülen olumlu yönde etki bu şekilde düzenli değildir.

Limonium effusum kök su ekstresi verilerine göre 3.125 µg/ml konsantrasyonu 72 saat uygulamasına kadar artan oranlarla hücre canlılığını pozitif yönde etkilemiş iken diğer konsantrasyonlar ve süre uygulamaları ise

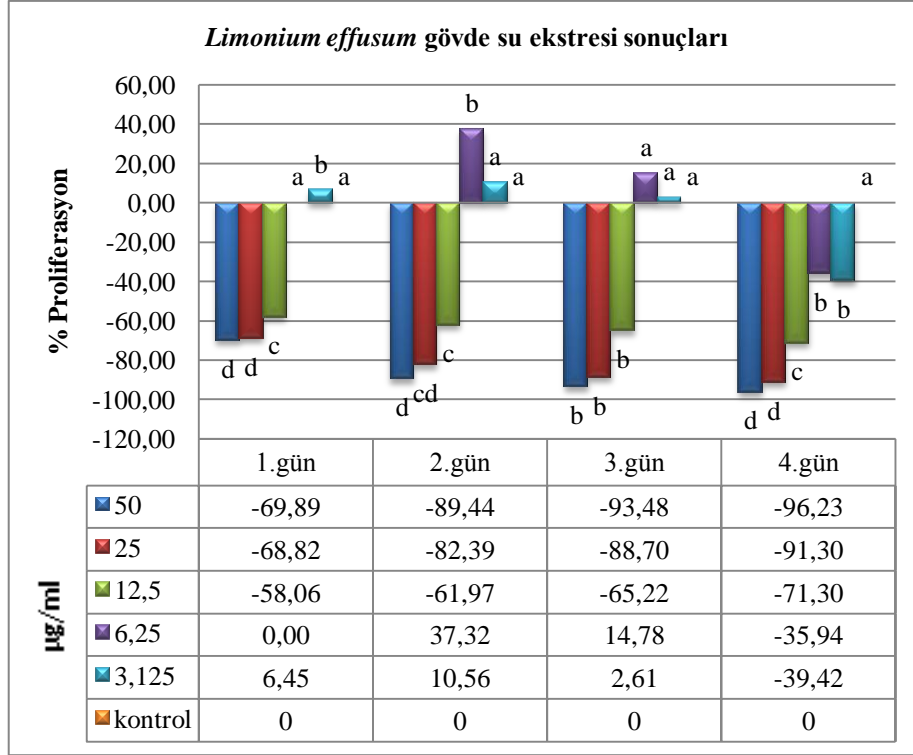
toksik etki göstermiştir. *Limonium effusum* kök su ekstresine ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.8’de verilmiştir.



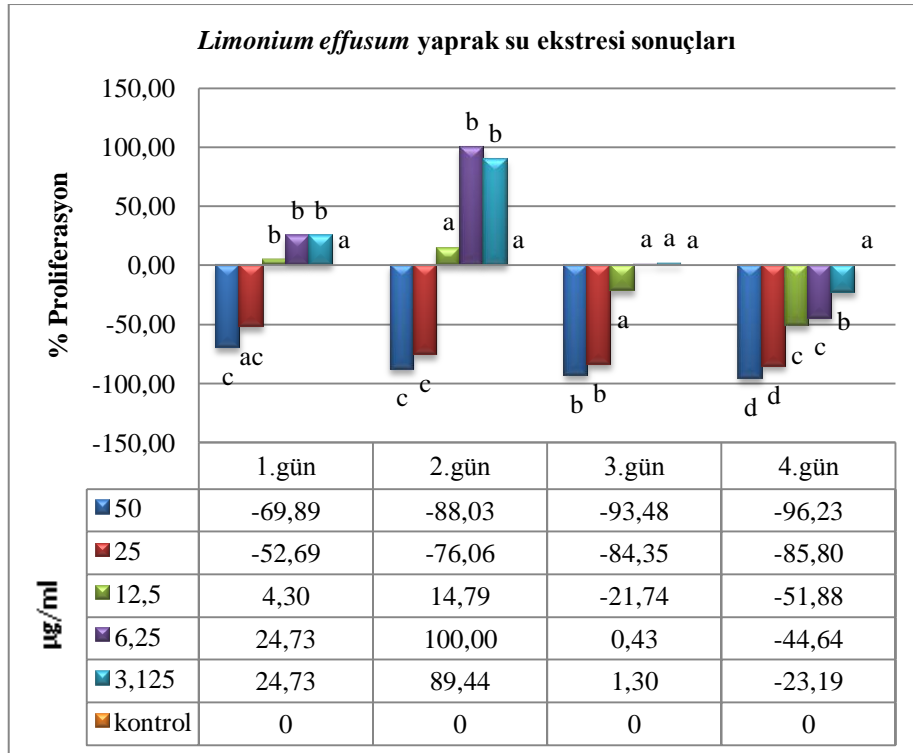
Şekil 3.8. *Limonium effusum* kök su ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

Limonium effusum gövde su ekstraları verilerine göre, hücrelerin canlılığını en fazla olumlu yönde etkileyen değer 6.25 µg/ml konsantrasyonunun ikinci gün uygulamasıdır. 50 µg/ml uygulaması ise oldukça toksik etki yaratmıştır. *Limonium effusum* gövde su ekstresine ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.9’da verilmiştir.

Limonium effusum yaprak su ekstraları verilerine göre de hücrelerin canlılığını pozitif olarak etkileyen en yüksek değer 6.25 µg/ml konsantrasyonudur. Bu ekstrenin geneline bakıldığında düşük konsantrasyonlar pozitif yönde yüksek konsantrasyonlar negatif yönde etki göstermiştir. *Limonium effusum* yaprak su ekstresine ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.9. *Limonium effusum* gövde su ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

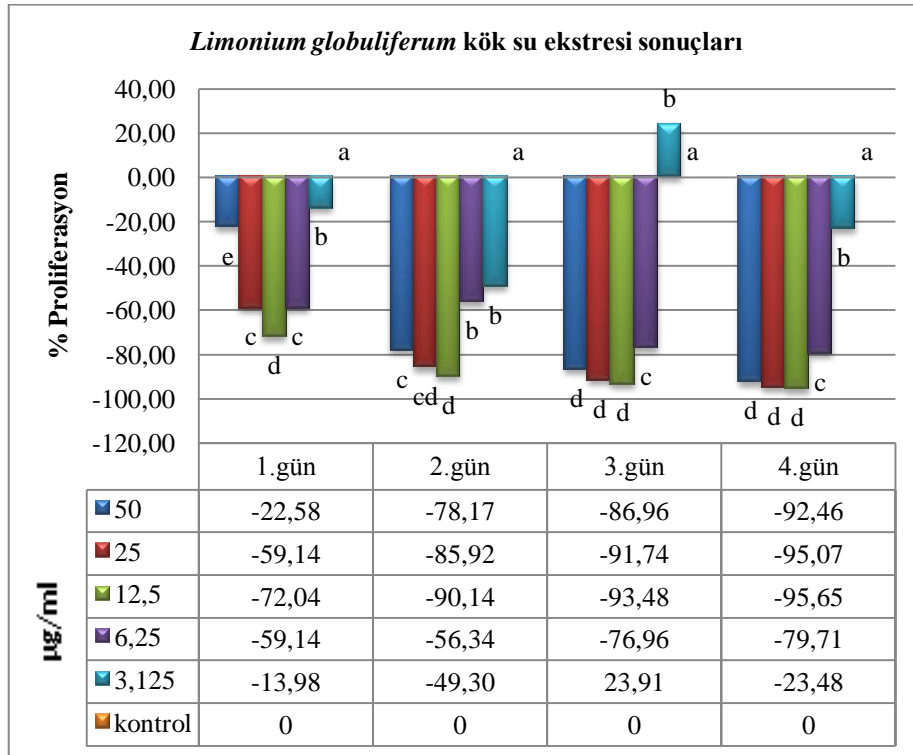


Şekil 3.10. *Limonium effusum* yaprak su ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

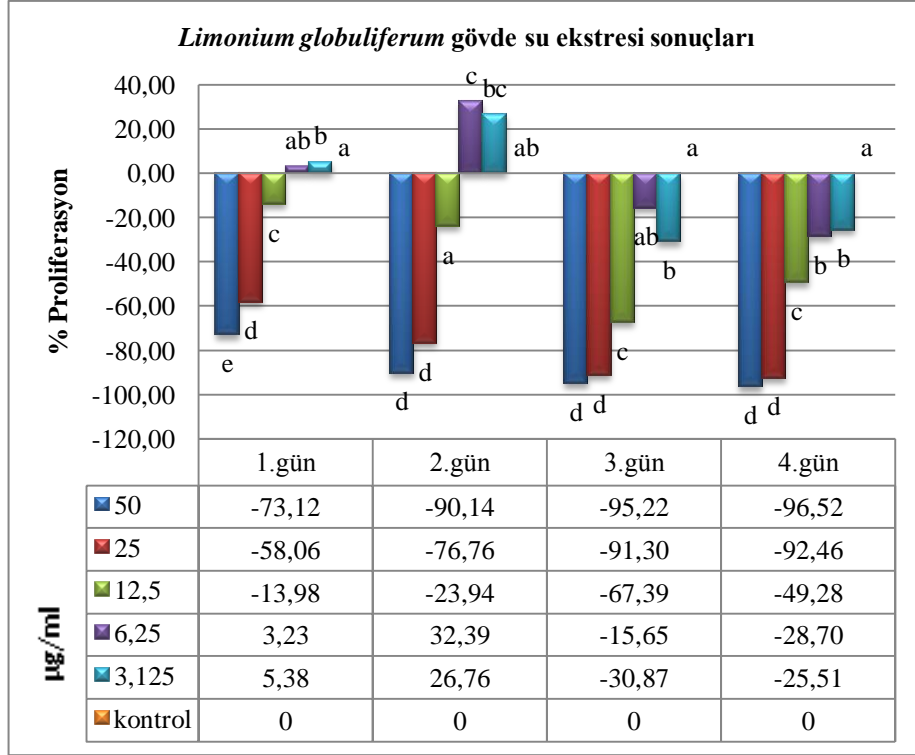
Limonium globuliferum kök su ekstresi verilerine göre 3.125 µg/ml konsantrasyonu 72 saat uygulaması hücre canlılığını pozitif yönde etkilemiş iken diğer konsantrasyonlar toksik etki göstermiştir. Bu ekstre genel olarak uygulama süresi arttıkça yüksek oranda toksik etki göstermiştir. *Limonium globuliferum* kök su ekstresine ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.11’de verilmiştir.

Limonium globuliferum gövde su ekstresinden elde edilen bulgulara göre, 48 saat uygulamasına kadar 3.125 µg/ml ve 6,25 µg/ml konsantrasyonları süre uygulaması arttıkça hücre canlılığını artırmıştır. Diğer konsantrasyonlarda ise süre uygulamasına paralel bir şekilde canlılık oranları azalmıştır. *Limonium globuliferum* gövde su ekstresine ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.12’de verilmiştir.

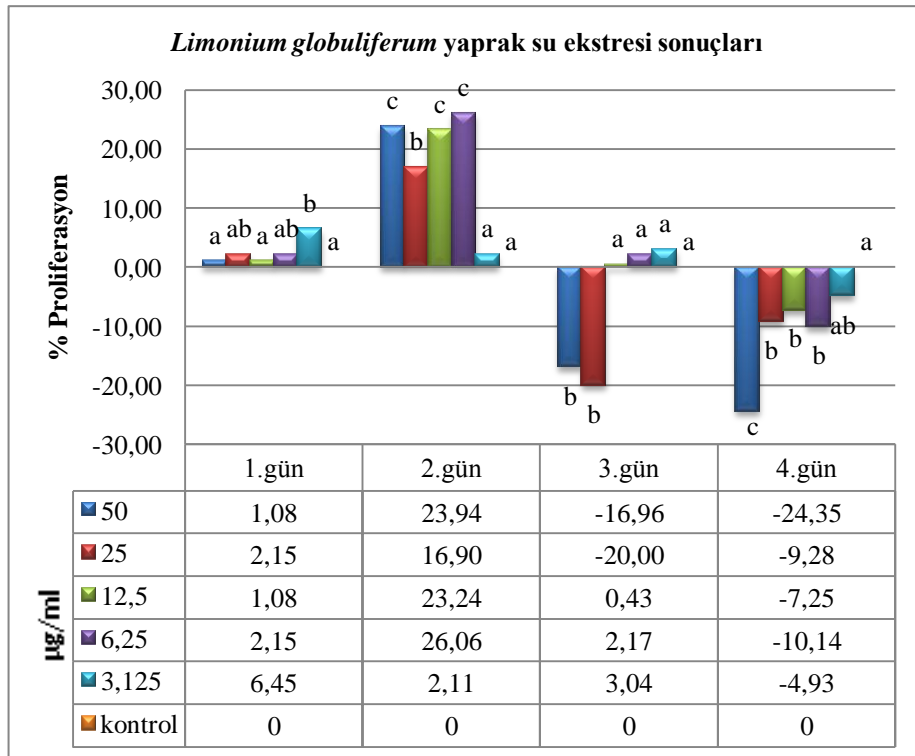
Hücre canlılığını en fazla olumlu yönde etkileyen ekstre *Limonium globuliferum* yaprak su ekstresidir. Özellikle 48 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlar canlılığı artırmıştır. Sadece 72 saat uygulamasında toksik etki görülmüştür. *Limonium globuliferum* yaprak su ekstresine ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.13’te verilmiştir.



Şekil 3.11. *Limonium globuliferum* kök su ekstresinin % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)



Şekil 3.12. *Limonium globuliferum* gövde su ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

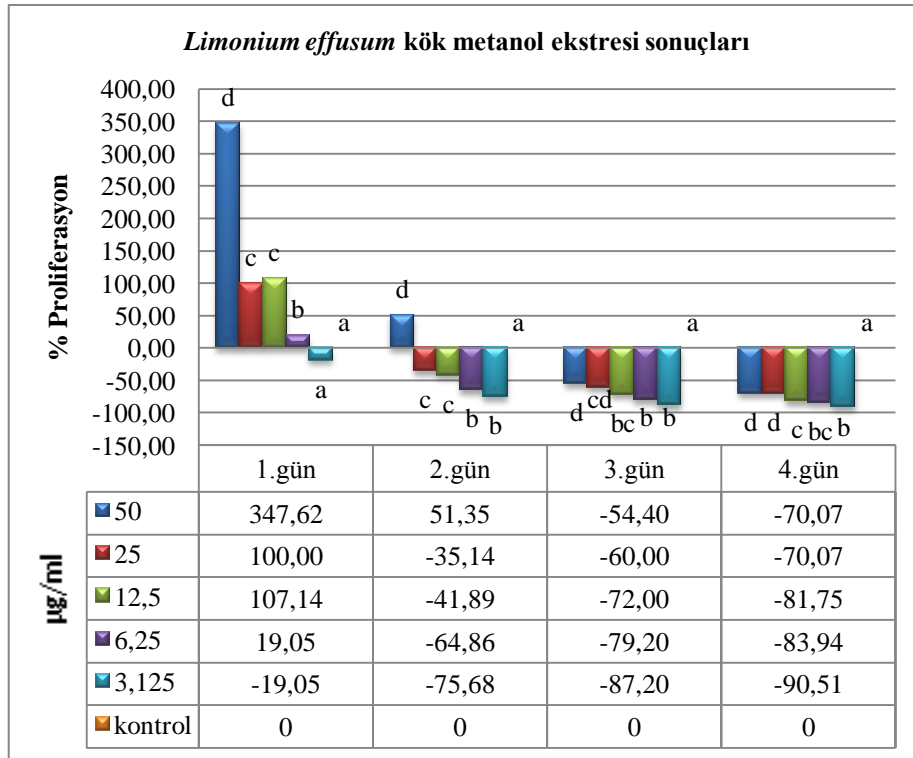


Şekil 3.13. *Limonium globuliferum* yaprak su ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

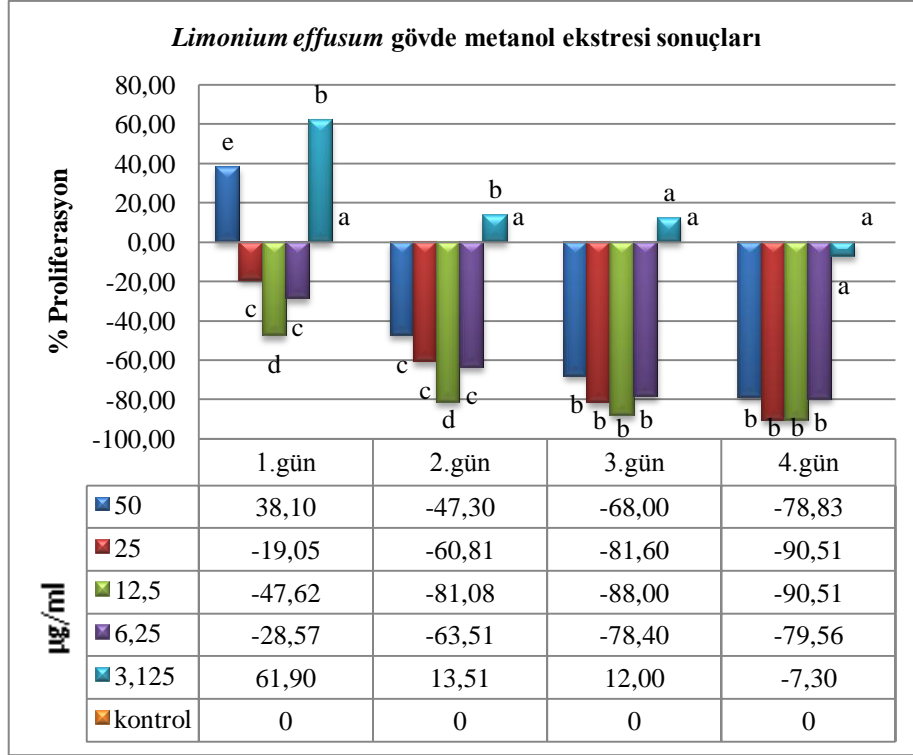
Limonium effusum kök metanol ekstresi ise, özellikle 24 saat uygulamasının yüksek konsantrasyonlarında canlılığı bariz bir şekilde artırmıştır. Bu ekstre konsantrasyon ve süre artışına uyumlu bir şekilde canlılık oranlarında azalmalar görülmüştür. *Limonium effusum* kök metanol ekstresine ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.14'te verilmiştir.

Limonium effusum gövde metanol ekstresinde de kök ekstresine benzer bir şekilde konsantrasyon ve süre artışına paralel canlılık verilerinde oranlı azalmalar görülmüştür. Özellikle 3.125 µg/ml konsantrasyonu canlılığı 4. gün hariç artırmıştır. 50 µg/ml konsantrasyon ise sadece 24 saat süresinde artış göstermiştir. Diğer konsantrasyonlar ise toksik bulunmuştur. *Limonium effusum* gövde metanol ekstresine ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.15'te verilmiştir.

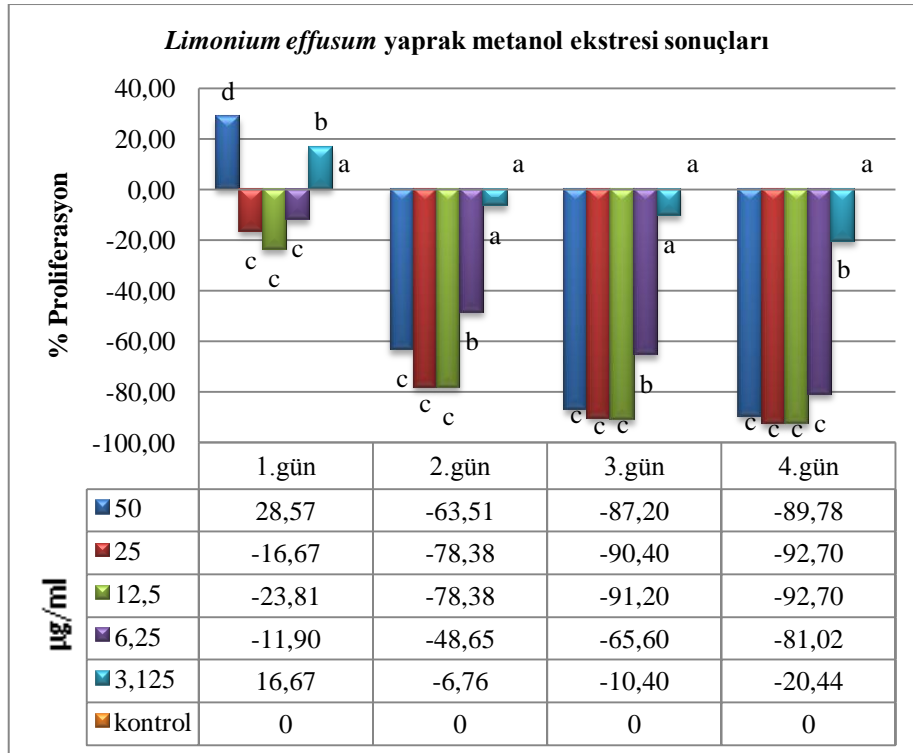
Limonium effusum yaprak metanol ekstresi verileri de aynı bitkinin gövde verilerine benzerlik göstermektedir. İki ekstre arasındaki tek fark, 3.125 µg/ml konsantrasyonunun canlılığı sadece 1. gün artırmıştır. *Limonium effusum* yaprak metanol ekstresine ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.16'da verilmiştir.



Şekil 3.14. *Limonium effusum* kök metanol ekstrelerinin % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)



Şekil 3.15. *Limonium effusum* gövde metanol ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

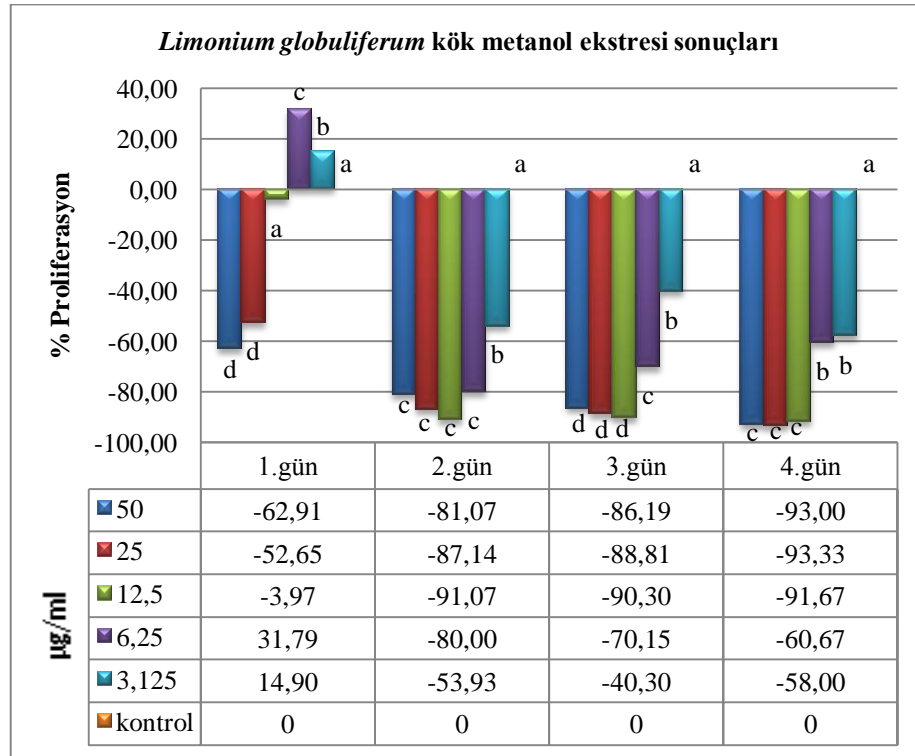


Şekil 3.16. *Limonium effusum* yaprak metanol ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

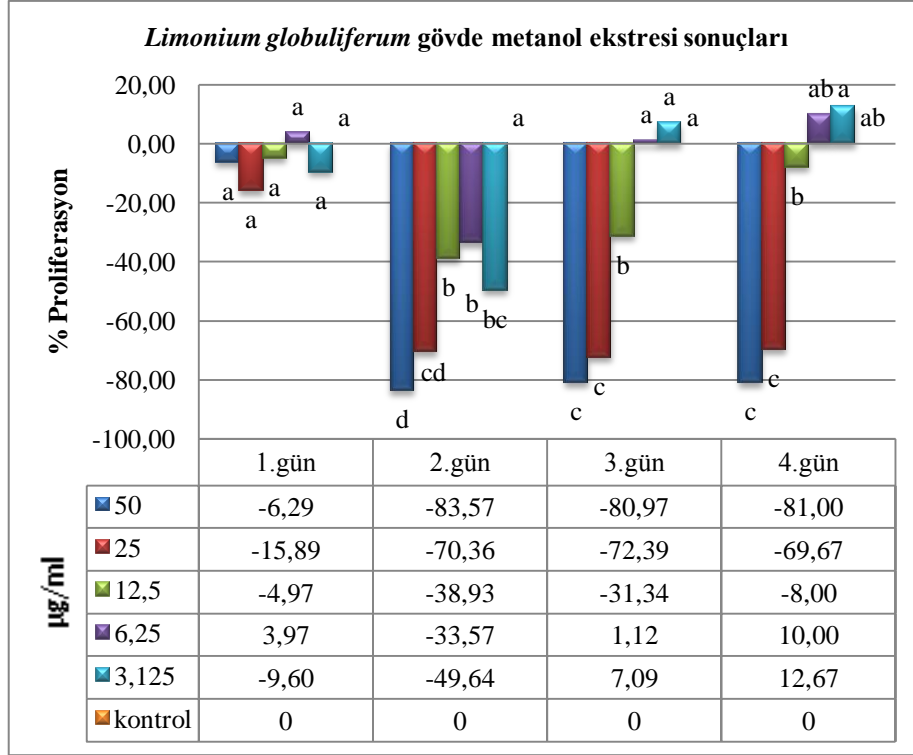
Limonium globuliferum kök metanol ekstresi verilerine göre 3.125 ve 6.25 µg/ml konsantrasyonları 24 saat uygulaması hücre canlılığını pozitif yönde etkilemiş iken diğer konsantrasyonlar toksik etki göstermiştir. Bu ekstreye ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.17’de verilmiştir.

Limonium globuliferum gövde metanol ekstresi verilerine göre 24 saat uygulaması hariç 50 ve göre 25 µg/ml konsantrasyonları yüksek toksik etki göstermiştir. Bunun yanında 3.125 ve 6.25 µg/ml konsantrasyonları özellikle 96 saat uygulamasında hücre canlılığını artırıcı etki göstermiştir. Bu ekstreye ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.18’de verilmiştir.

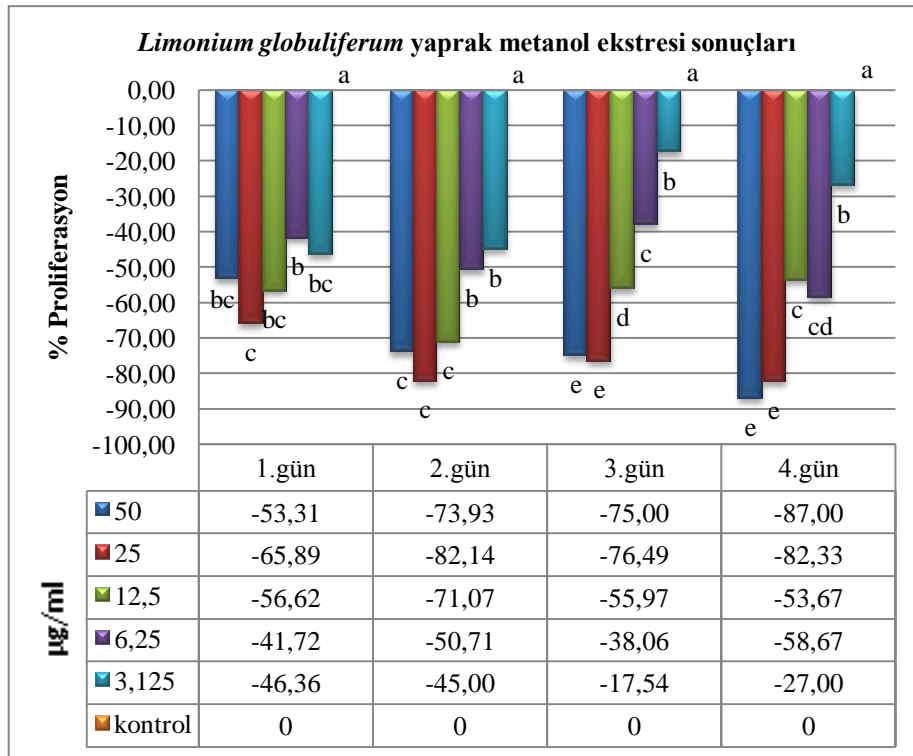
Limonium globuliferum yaprak metanol ekstresi, kullanılan yüksek dozlar başta olmak üzere tüm süre ve doz uygulamalarında bariz toksik etki göstermiştir. Bu ekstreye ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.19’da verilmiştir.



Şekil 3.17. *Limonium globuliferum* kök metanol ekstrelerinin % proliferasyon verileri.
a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)



Şekil 3.18. *Limonium globuliferum* gövde metanol ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

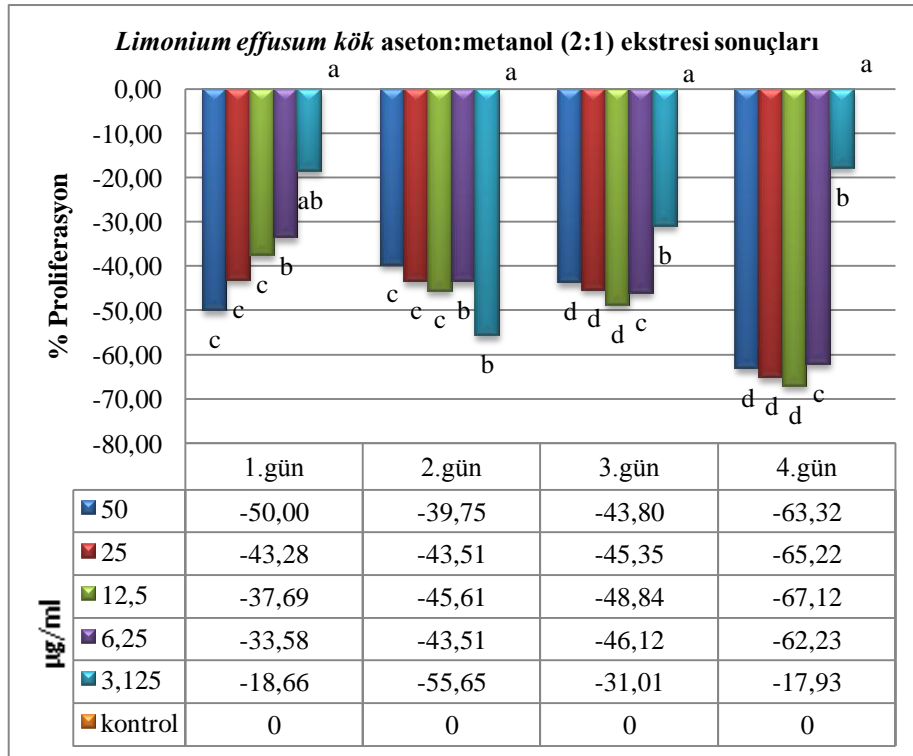


Şekil 3.19. *Limonium globuliferum* yaprak metanol ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

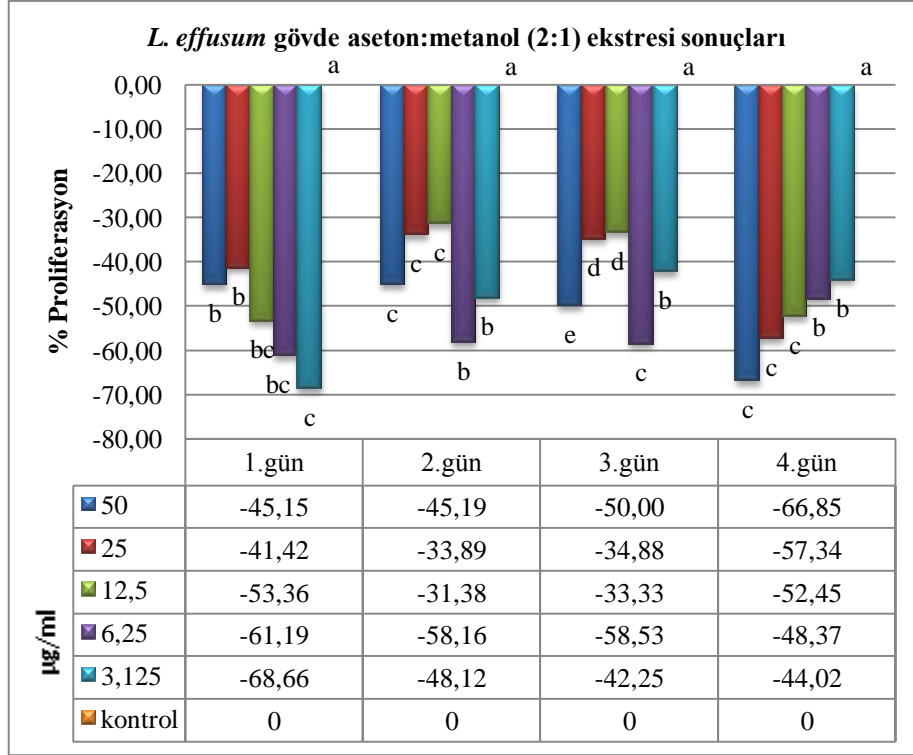
Limonium effusum kök aseton:metanol (2:1) ekstresi tüm süre ve konsantrasyon uygulamalarında toksik etki göstermiştir. En fazla toksik etki 96 saat uygulamasında görülmüş olup %67 düzeylerinde bulunmuştur. Bu ekstreye ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.20’de verilmiştir.

Limonium effusum gövde aseton:metanol (2:1) ekstresinde de yüksek toksik etki tüm dozlarda ve sürelerde görülmüştür. Birinci gün uygulamasında konsantrasyon artışına bağlı toksik etki azalırken, dördüncü günde bu durumun tam tersine döndüğü görülmüştür. Bu ekstreye ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.21’de verilmiştir.

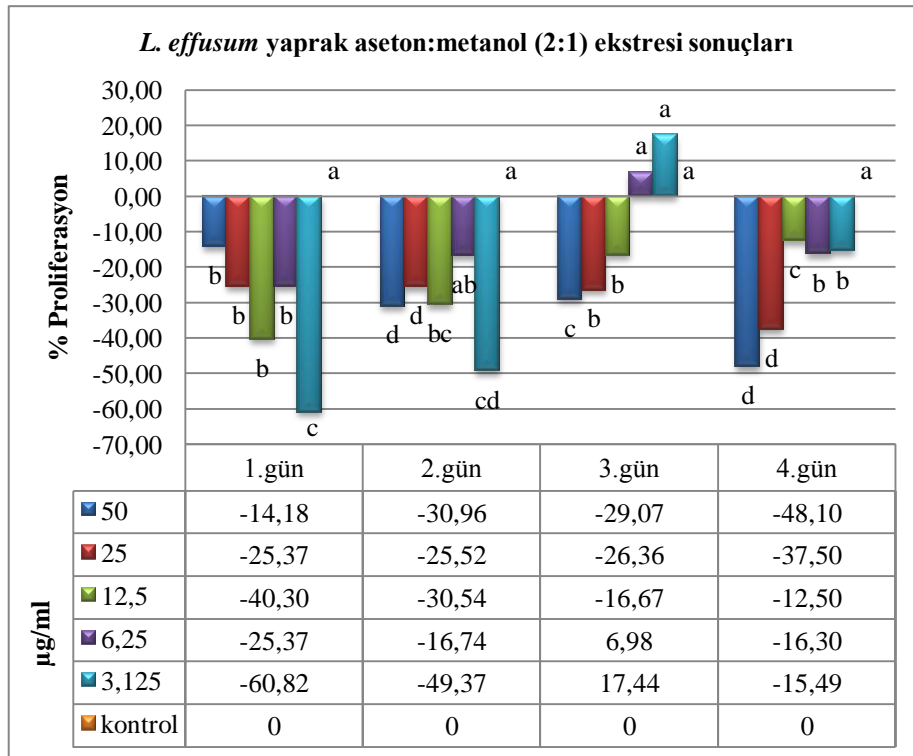
Limonium effusum yaprak aseton:metanol (2:1) ekstresinde yine birinci gün uygulamasında konsantrasyon artışına bağlı toksik etki azalırken, dördüncü günde bu durumun tam tersine döndüğü görülmüştür. Ayrıca 72 saat uygulamasında 3.125 ve 6.25 µg/ml konsantrasyonları hücre canlılığını artırıcı etki göstermiştir. Bu ekstreye ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.22’de verilmiştir.



Şekil 3.20. *Limonium effusum* kök aseton:metanol (2:1) ekstrelerinin % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)



Şekil 3.21. *Limonium effusum* gövde aseton:metanol (2:1) ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

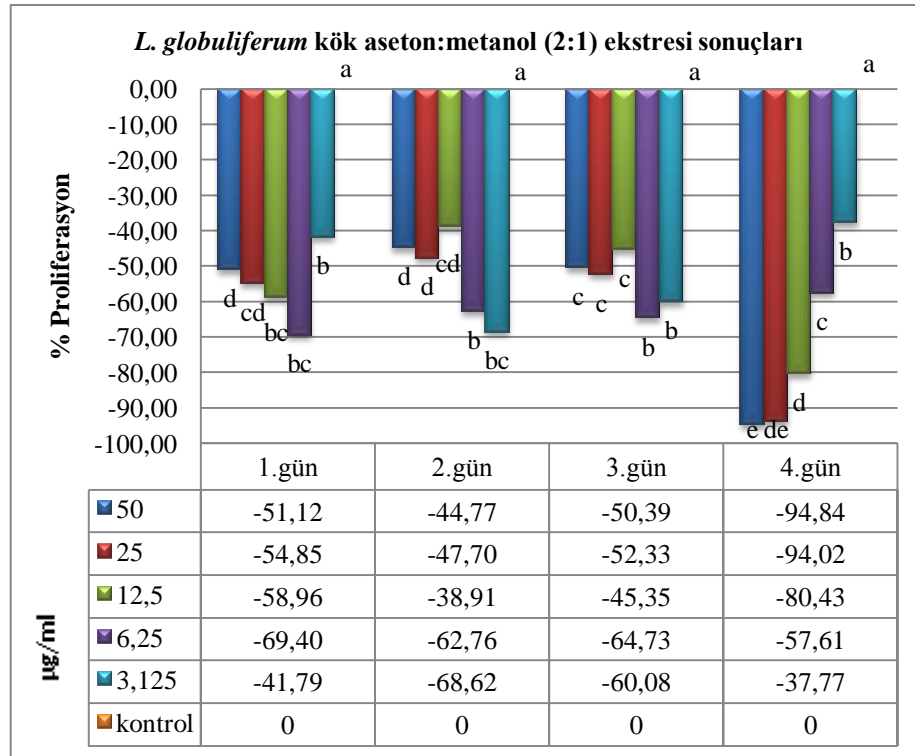


Şekil 3.22. *Limonium effusum* yaprak aseton:metanol (2:1) ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

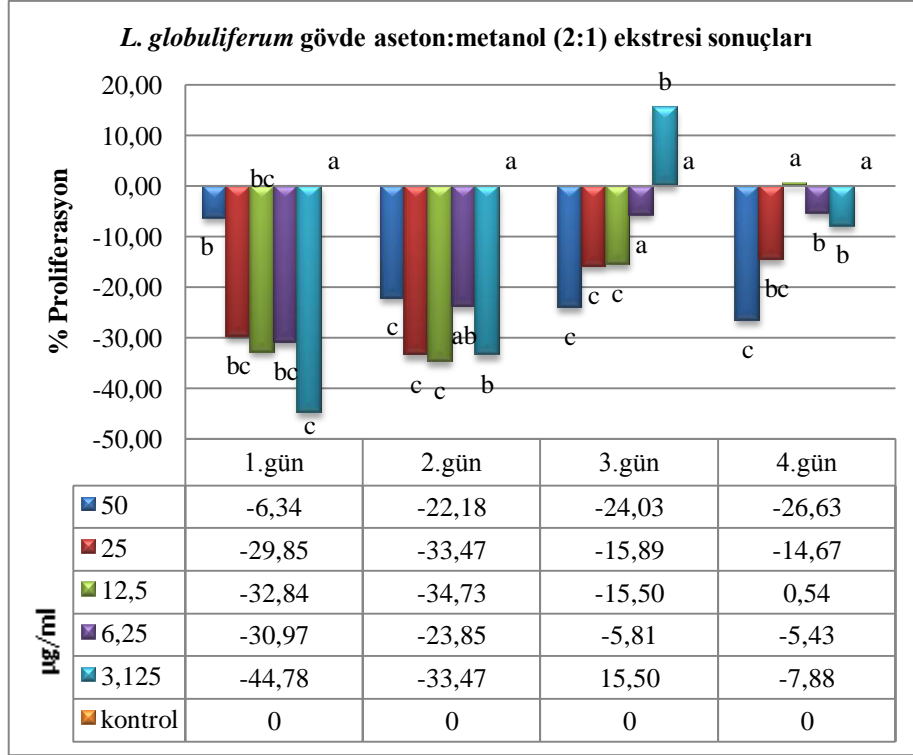
Limonium globuliferum kök aseton:metanol (2:1) ekstresinde de hemen hemen tüm aseton:metanol ekstralarında olduğu gibi 1. gün ve 4. gün uygulamalarındaki dozlara bağlı toksik etki zıt yöndedir. Yani ilk günde yüksek dozlar düşük toksisite gösterirken, düşük dozlar yüksek toksik etki göstermiş olup 4. günde bu durum tam tersi yönde gelişmiştir. Bu ekstreye ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.23'te verilmiştir.

Limonium globuliferum gövde aseton:metanol (2:1) ekstresinde *Limonium effusum* yaprak aseton:metanol ekstresinde olduğu gibi 72 saat uygulamasında 3.125 µg/ml konsantrasyonu canlılığı artırmıştır. En fazla toksik etki 24 saat uygulamasında yine 3.125 µg/ml konsantrasyonunda görülmüştür. Bu ekstreye ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.24'te verilmiştir.

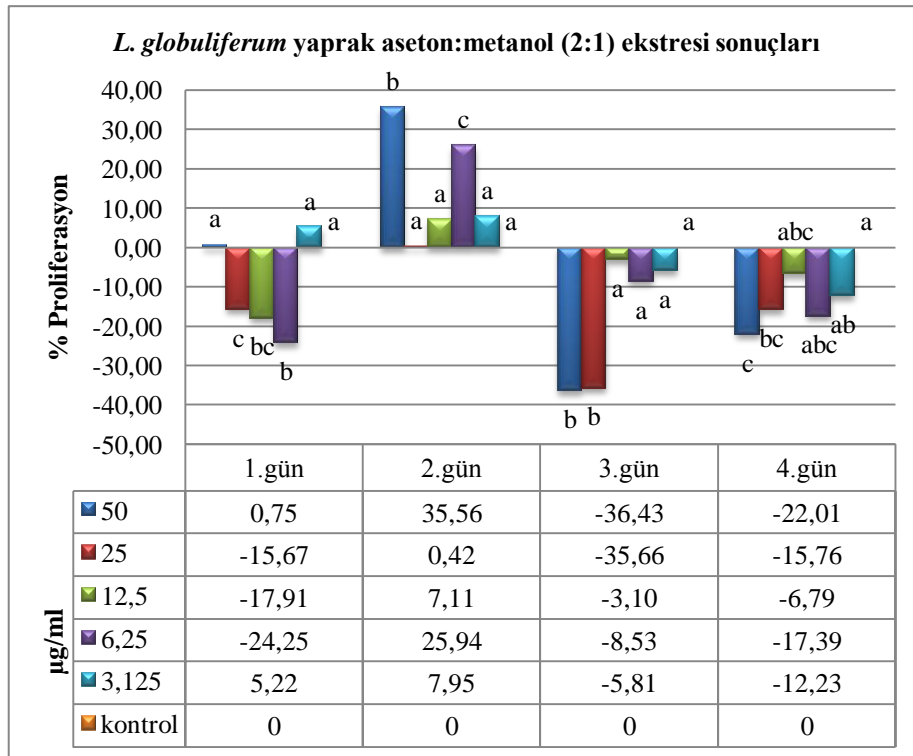
Limonium globuliferum yaprak aseton:metanol (2:1) ekstresinde 48 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlar canlılığı artırıcı etki gösterirken, en yüksek toksik etki 72 saat uygulamasında 50 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarında görülmüştür. Bu ekstreye ait tüm hücre canlılığı verileri Şekil 3.25'te verilmiştir.



Şekil 3.23. *Limonium globuliferum* kök aseton:metanol (2:1) ekstralarının % proliferasyon verileri. a-e : p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)



Şekil 3.24. *Limonium globuliferum* gövde aseton:metanol (2:1) ekstrelerinin % proliferasyon verileri. a-e : p < 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)



Şekil 3.25. *Limonium globuliferum* yaprak aseton:metanol (2:1) ekstrelerinin % proliferasyon verileri. a-e : p < 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Bitkilerin, ultraviyole ışık, böcek saldırıları, bakteriler ve virüsler gibi çevresel stres uyarıcılarına karşı bazı kimyasalları biyosentezleme potansiyellerinin olduğu bilinmektedir. Örneğin bitkiler, ultraviyole ışık muamelesiyle türevlenen serbest radikalleri yok etmek için flavanoid ve karotenoidleri sentezlemektedirler. Bu gibi prensipler baz alınarak, şiddetli streslere maruz kalan bitkilerin, belirli nitelik ve miktarlarda biyolojik olarak aktif fitokimyasalları üretmeleri zorunludur hipotezi kurulabilir (Murakami, 2005) .

Tıbbi bitkilerin kullanımı, her zaman insanlık kültürünün bir parçası olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya popülasyonunun %80'ine varan bir kesiminin, bazı sağlık hizmetleri açısından geleneksel tıbbi sistemlere güvendiklerini bildirmektedir. Bununla birlikte birçok tıbbi bitkinin özellikle mutajeniteleri ve karsinojeniteleri gibi toksikolojik özelliklerini gösteren raporlar da vardır (Alade, 2009). WHO, gelişmekte olan ülkeleri, non-toksik oldukları kanıtlanan geleneksel bitki preparasyonlarını, sağlık programlarına ilave etmeleri yönünde teşvik etmektedir (WHO, 1985).

Bazı medikal bitkilerin aşırı terapötik avantajları olmasına rağmen medikal bitkilerin bazı içerikleri potansiyel olarak toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olabilmektedir. (Gadano ve ark., 2006).

Biyolojik aktiviteye sahip doğal ürünlerin in vitro değerlendirilmesi için bilimsel stratejiler, son zamanlarda değişmektedir. Birçok sayıdaki geleneksel doğal ürünlere ilgi her geçen gün artmaktadır. (Kurokawa ve ark., 1993; Cordell, 1995; Vlietinck ve ark., 1995; Taylor ve ark., 1996). Bununla birlikte geçmişteki çalışmalar göstermiştir ki yiyecek olarak veya geleneksel tıbbi amaçlı kullanılan birçok bitki in vitro sistemlerde mutajenik etkiye sahiptir. (Schimmer ve ark., 1988; Higashimoto ve ark., 1993; Kassie ve ark., 1996).

Doğal olan her şey güvenilirdir inancına zıt bir şekilde yaygın olarak kullanılan bazı tıbbi bitkiler akut toksisiteye ve uzun dönemde de toksik etkiye sebep olmaktadır. Toksik etki, sara oluşturuvcu bileşikler, kardiyak toksinler ve karsinojeniteye sebep olan gastrointestinal toksinlerin varlığında, ishal, alerjenlere aşırı duyarlılık, bulantı veya kusmadan, organ-hedefli toksisite; immunotoksisite,

embriyo/fetüs ve prenatal toksisite, mutajenite/genotoksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisiteye kadar uzanmaktadır (Smolinske, 2005).

Tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin mutajenik veya toksik etki yaratabileceğinin rapor edilmesiyle, bitkilerin organizmalar üzerinde oluşturduğu negatif etkileri araştırmak daha da önemli hale gelmiştir.

Bu amaçla bu çalışmada da ülkemize ait endemik olan *Limonium effusum* ve endemik olmayan *Limonium globuliferum* türlerinin mutajenik ve sitotoksik etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışma bakteriyel (AMES testi), bitkisel (*Allium* testi) ve hayvansal hücreler (MTT analizi) kullanılarak yapılan üç test sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu testlerin mutajeniteyi ve sitotoksisiteyi belirlemek için kullanılabilirliğı geçmiş çalışmalarda rapor edilmiştir (Fiskesjo, 1997; Bakare ve Wale-Adeyemo, 2004; Babatunde ve Bakare, 2006; Alade ve ark, 2009; Mahavorasirikul ve ark. 2010; Bayor ve ark., 2007).

Bu çalışmada kullanılan *Limonium* cinsine ait türlerden *Limonium tataricum* ve *Limonium brasiliensis* bitkilerinin uluslararası zehirli bitkiler listesine girdiğı bildirilmiştir (Wagstaff, 2008).

Lellau ve Liebezeit (2003), Plumbaginaceae familyasına ait olan iki tür *Armeria maritima* Mill. ve *Limonium vulgare* Mill. etanol ekstreleri ile *Artemia salina* ve *Daphnia manga* üzerine sitotoksisite incelemesi yapmışlardır. Bu çalışmaya göre *Limonium vulgare*, *Artemia salina* ve *Daphnia manga* üzerine toksik etki oluşturmuştur. Bunun yanında *Armeria maritima* toksik etki yaratmamıştır. Yine aynı bitkilerle yapılan tümör indüksiyonu inhibisyonu testi (TIIT) ve tümör gelişiminin inhibisyonu testi (TGIT) çalışmalarına göre de *Armeria maritima* tümör inhibisyon etkisi göstermemiştir. *Limonium vulgare* ile yapılan denemelerde ise şüpheli tümör inhibisyonu gözlenmiştir.

Plumbago zeylanica'nın (Plumbaginaceae) kök su ve alkolik ekstrelerinin karidesler üzerine letal etkilerine bakılmış ve bu ekstrelerin toksik oldukları Krishnaraju ve ark. (2006) tarafından rapor edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan iki tür Plumbaginaceae familyasına dahildir ve bu familyanın birer üyesi olan *Limonium* türlerinin de kendine özgü içerikleri mevcuttur. Avaz (2010) tarafından tespit edilen epigallocatechin, gallocatechin, mentol, timol, karvakrol, kafeik asit ve harmon, kubain, flavonol, kumarinler ve

kinonları, rutin, rutinose, myrcetin, sitrik asit, ellagic, myrcetin 3-O-a-L, kuercetin, taninler ve kumarinler bu bileşenlerden bazılarıdır. Bunun yanında Plumbaginaceae familyasına özgü olan naftokuinonların önemli bileşenlerinden biri olduğu farklı çalışmalarda rapor edilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, mitokondriyal fonksiyonların bozulması ve DNA'ya timin bağlanmasının inhibisyonuna dayanan sitotoksik etkiler Plumbaginaceae familyasındaki türlere özgü bileşenlerden biri olan naftokuinonların en önemli sitotoksik özelliklerindedir (Aithal ve ark., 2009; Babula ve ark., 2009)

Allium test toksisite ve mutajeniteyi hedefleyen bir testtir. Büyümenin inhibisyonu ölçülerek toksisite kolaylıkla gözlenebilirken mutajenite kromozom kırıklarının oranıyla ilişkilidir. *Allium cepa* kök ucu hücreleri, sitolojik testler için mükemmel bir sistem oluşturmaktadır (Fiskesjö, 1985).

Allium testinde, kontrol grubu olarak su kullanılıyorsa sudaki toksik etki yaratan Cu ve Ca gibi iyonlar uzaklaştırılması gerekliliği vurgulanmıştır (Fiskesjö, 1985). Bu gereklilikten dolayı bu çalışmada da kontrol grubu olarak distile su kullanılmıştır.

Allium cepa'nın kromozomları ve hücre bölünmesi üzerinde çevresel etmenlerin toksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde etkili konsantrasyon değerinin belirlenmesinin önemli olduğu bildirilmiştir (Fiskesjö, 1985). Kontrol grubuna göre mitotiki indeksi yarıya indiren konsantrasyon değeri sitotoksik sınır değeri olarak kabul edilmektedir (Sharma, 1983). Çalışmamızda da bitkilerin distile su ekstralarının *Allium* testi ile kök büyümesinin inhibisyonu üzerine etkisi incelenmiş olup *Limonium effusum*'un kök, gövde ve yaprak ekstrallerinden elde edilen EC50 konsantrasyonları sırasıyla 20, 65 ve 50 g/L olarak tespit edilmiştir. *Limonium globuliferum* için ise bu konsantrasyonlar sırasıyla 32.5, 50 ve 50 g/L olarak bulunmuştur. Konsantrasyon artırıldıkça *Limonium effusum* gövde ekstresi hariç, kök büyümesinde doza bağlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Kök büyümesini en fazla inhibe eden konsantrasyon *Limonium globuliferum* kök ekstresinin 50 g/L'lik konsantrasyonunda görülmüştür.

Allium testinde kök büyüme inhibisyonu varsa, her zaman bölünen hücre sayısında azalma vardır (Fiskesjö, 1997; Bakare ve Wale-Adeyemo, 2004;

Babatunde ve Bakare, 2006). *Allium cepa*'da kök büyümesinin inhibisyonu ekstre içindeki bazı ağır metaller yüzünden olabilir. *Azadirachta indica*, *Mangifera indica*, *Cymbopogon citratus* and *Morinda lucida* ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda çinko (Zn), bakır (Cu), mangan (Mn), demir (Fe), kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb) içerdikleri rapor edilmiş olup (Al-Moaraf ve ark., 2004; Haider ve ark., 2004) bitkilerin içeriklerinde bulunan bu metallerin *Allium cepa* kök büyümesinde inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Boroffice, 1990; Fiskesjo, 1997; Lerda, 1992). Çalışmamızda kullandığımız *Limonium* türlerinin de içeriğinde bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), krom (Cr) ve demir (Fe) bulunduğu bildirilmiştir (Xiuyun, 1991). Bu elementlerin varlığı bazı konsantrasyonlarda oluşan toksik etkiye neden olmuş olabilir.

Allium testi ile yapılan mitotik indeks ve mitotik safha yüzdesi belirleme çalışmalarına göre kök büyüme inhibisyonu çalışmasında olduğu gibi doza bağlı bir artış veya azalış olmamıştır. Özellikle bazı ekstrelerde mitotik indeks artmış olsa dahi, profaz sonrası mitoz safhalarının çok azaldığı tespit edilmiştir. Plumbaginaceae familyasında bulunan *Plumbago zeylanica* türünün total ekstresi ile yapılan *Allium* testi çalışmasında en yüksek konsantrasyon olan 10 mg/ml dozunda, mitotik indeks % 14, kök uzunluğu ortalaması 0.23 cm tespit edilmiş olup kontrol grubuna göre bu değerlerin toksik etki yarattığı bulunmuştur. (Alade, 2009). Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre ise, hiçbir ekstrede mitotik indeks %14'e düşmemiştir. Fakat kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında bu çalışmada elde edilen değerlerden bazılarının da toksik etki yarattığı görülmüştür. Toksik etki yaratan değerler Çizelge 3.2-3.7'de verilmiştir. En düşük mitotik indeks değeri *L. effusum* gövde ekstresinde bulunmuş olup yaklaşık olarak % 19 düzeylerindedir. Yine kök büyüme inhibisyonu çalışmasında da en düşük değer 0.95 cm olarak bulunmuş olup kontrol değerine (3.85 cm) bakıldığında oldukça sitotoksik etki yaratan bir değer olduğu söylenebilir.

Allium testi ile yapılan kromozom aberasyon belirleme çalışmalarına göre yapışıklık, anafaz köprüleri, kalgın kromozom ve bozulmuş anafaz-telofaz anomalilerine özellikle yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere yüksek oranda rastlanmıştır. C-mitoz, poliploidi ve binükleer hücre anomalileri çok nadir görülmüştür. *Limonium effusum* kök, 24 saat 40 g/L ve 48 saat 20 g/L

uygulamalarında yeterli anafaz-telofaz safhası görülemediği için sayım yapılamamıştır. Diğer ekstrelerin farklı konsantrasyonlarının büyük çoğunluğunda doza bağlı olarak anomali yüzdelerinde artış görülmüştür. Bunun yanında da *Limonium globuliferum* gövde ekstresinin 24, 48 ve 72 saat uygulamalarının 25 g/L konsantrasyonlarında anomali yüzdelerinde düşüşler gözlenmiştir.

Yapışıklığın, inter-kromozomal kromatin fibrillerin birbirine girmesi sonucu olarak kromozomlar arasında subkromatid bağlantıların oluşmasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Mc Gill ve ark., 1974). Yapılan çalışmalarda en sık gözlenen kromozom aberasyonunun yapışıklık olduğu bildirilmiştir (Ateeq ve ark. 2002). Yapışık kromozom oluşumu yüksek toksisiteyi göstermektedir ve geri dönüşüzdür. Bu etki hücrenin ölümüne yol açabilir. Kromozom ve kromatid kırılmaları ile oluşan kromozom yapışması kromatidlerin birbirlerinden ayrılmasını engellemekte ve köprülerle birbirlerine bağlı kalmalarına neden olmaktadır (Badr ve ark., 1992). Kromozom köprülerine, kromozom ve kromatid kırılmaları yol açabilir. Geri kalmış kromozom anomalileri anöploidi riskini ifade etmektedir. Hücrede iğ ipliklerinin inaktivasyonunu takiben yoğunlaşmış kromozomların rastgele dağılması olarak tanımlanan C-mitoz, zayıf toksik etkiye sahiptir ve geri dönüşümlüdür (Fiskesjö, 1997).

Kromozom aberasyonları (KA), kırılma veya kromozom parça değişimlerinin bir sonucu olarak kromozom yapısını değiştirmektedir. Kromozom aberasyonlarının birçoğu letaldir, fakat bazı aberasyonlar ise devamlı organizmada yaşar ve ya somatik yada kalıtsal genetik etkilere yol açar (Swierenga ve ark., 1991). Vinkristin ve vinblastin gibi alkaloidlerin, *Borreria filiformis* su ekstrelerinde gözlenen kromozom aberasyonlarından sorumlu oldukları rapor edilmiştir (Ene ve Osuala, 1990). İğ iplikleri bozuklukları test edilen bitkilerdeki alkaloid içeriğinin varlığından dolayıdır. (Fasola ve Egunyomi, 2005). *Limonium* cinsi içeriğinde de alkaloidlerin bulunduğu geçmiş çalışmalarda rapor edilmiştir (Zhen-fa ve Liang, 1991). Ayrıca Plumbaginaceae familyasındaki türlere özgü temel alkaloidlerden biri olan naftokuinonların (plumbagin) ve türevlerinin de yüksek oranda bulunduğu ve sitotoksik etkileri yukarıda bildirilmiştir. Ayrıca plumbagin soğan kök hücrelerinde mitotik inhibitör gibi rol almaktadır. Bu inhibisyon etkisi de poliploidi, mikronukleus, anafaz köprüsü, yapışıklık ve kalgın

kromozomlar gibi mitotik anomalilerle ifade edilmektedir (Krishnaswamy ve Purushothaman, 1980). Çalışmamızda oluşan anomalilerin kontrol grubuna göre yüksek oranlarda bulunması bu sebepten ileri gelebilir. Soğan hücrelerindeki iğ ipliği bozukluklarının indüksiyonu, hücre bölünmesinin sonraki safhalarında anöploidi ve mikronükleus oluşumlarına sebep olabilir. Bu genellikle, anafaz safhasında kromozomların düzensiz dağılımından ileri gelmektedir. Dolayısıyla bazı kromozomlar diğerlerine göre kutuplara daha önde gider. Geri kalmış kromozomlar, ya kaybolurlar ya da kendi çevrelerini nüklear zarla çevirip mikronükleusları oluşturabilirler (Grant, 1978). Bu çalışmada da kalgın veya geri kalmış olarak adlandırılan kromozomların oranları da kontrol grubuna oranla daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Fakat mikronükleus oluşumuna rastlanmamıştır.

İnsan lenfositleri, CHO, V79 ve *Allium* test organik merkür bileşikleriyle karşılaştırıldığında birbirlerine yakın toksisite sonuçları verdikleri görülmüştür. *Allium* testinin algler gibi bazı organizmalarla yapılan testlerde de ters sonuçlar verdiği görülmüştür. *Allium* EC50 testi AMES testi ile de farklı sonuçlar vermektedir (Fiskesjö, 1985).

AMES testi ayrıca *Salmonella*/microsome test sistemi olarak da adlandırılmaktadır (Maron ve Ames, 1983). Bu test, ekstrelerin neden olduğu olası gen mutasyonlarının belirlenmesinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Metabolik aktivasyonun varlığında veya yokluğunda herhangi bir bakteri suşundaki pozitif sonuç, bir maddeyi mutajen olarak tanımlamak için yeterlidir (Zeiger, 2001). Bu analizin temel prensibi, *Salmonella typhimurium* bakterisi, histidin aminoasiti bakımından fakir bir besiyerinde (His-) çoğaltıldığında His operonundaki geriye dönen mutasyonların (His+) belirlenmesidir (Singh, 2009).

Limonium türlerinin distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) ekstrelerinin mutajenitesini belirlemek üzere yapılan AMES testi sonuçlarına göre kullanılan ekstrelerin büyük çoğunluğu mutajenik etki göstermemiştir. Fakat metanol ekstreleriyle yapılan çalışmada TA98 suşu S9 enzimi varlığında ve yokluğunda *L. effusum* kök ekstrelerinde doza bağlı koloni sayısında artış gözlenmiştir. Bu sonuç bu ekstrelerin Mortelmans ve Zeiger (2000)'a göre zayıf mutajenik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca yine metanol *L. globuliferum* yaprak ekstresinin 10000 µg/plak uygulamasında, koloni sayısı

kontrol grubuna göre iki kattan fazla artış göstermiştir. Bu sonuç da bu ekstrenin bu konsantrasyonunun mutajenik olduğunu göstermektedir.

Çalışmada kullanılan distile su ekstreleri sonuçlarına göre ise yine metanol ekstresinde olduğu gibi *Limonium effusum* kök su ekstresinde TA98 suşu S9 enzimi varlığında doza bağlı artış tespit edilmiştir. Bu sonuç bu ekstrenin zayıf mutajen olduğunu göstermiştir. *Limonium globuliferum* su ekstrelerinde, kök ekstresinin 1 ve 0,1 µg/plak konsantrasyonları, gövde ve yaprak ekstrelerinin TA100 suşu S9'suz çalışmasında ise tüm konsantrasyonlarında koloni sayısında kontrole göre iki kattan fazla artış gözlenmiş ve bu çözeltilerin mutajenik oldukları belirlenmiştir. Plumbaginaceae familyasının etken maddelerinden biri olan plumbagin ile yapılan AMES çalışmalarında, TA98 ve TA100 suşlarının S9'suz denemelerinde hiçbir mutajenik etkiye rastlanmamıştır. S9 enzimi ile yapılan bazı çalışmalarda ise tutarsız etki gösterdiği bildirilmiştir (Matsushima ve ark., 1986; Durga ve ark., 1992; Hakura ve ark., 1994; Edenharder ve Tang, 1997). *Escherichia coli* WP2/pKM101 ve WP2uvrA/pKM101 suşları ile yapılan S9'suz çalışmalarda mutajenik olmadığı, AQ634 suşunun S9'suz deneylerinde ise mutajenik olduğu sonucuna varılmıştır. (Farr ve ark., 1985; Watanabe ve ark., 1998). Naftokuinonların hidroksil türevleri, *S. typhimurium* TA2637 ve TA98 suşlarında mutajenik bulunmuş fakat TA100 suşunda mutajenik olmadığı tespit edilmiştir. Naftokuinonların diğer bazı türevlerinin ise mutajeniteyi artırıcı veya düşürücü etki yaptığı yine aynı çalışmacılar tarafından rapor edilmiştir. (Matsushima ve ark., 1986).

Farklı naftokuinon türevlerin farklı sonuçlar vermesi kullandığımız türlerin içeriklerinin tamamıyla ortaya konulmasını zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla ülkemizin de bir zenginliği olan bu endemik türlerin içeriklerinin bir başka çalışma ile belirlenmesi, alternatif tıp uygulamalarında da kullanılan bu bitkilerin önemini ve farmakolojik etkilerini ortaya koyma açısından önem arz etmektedir.

Plumbago zeylanica (Plumbaginaceae) kök metanol ekstrelerinin 25, 50 ve 100 µg/plak konsantrasyonlarında AMES testi pre-inkübasyon metoduyla TA97, TA100, TA102 ve TA104 suşlarıyla mutajeniteleri araştırılmış ve herhangi bir toksik etkiye rastlanmamıştır (Aqil ve ark., 2008). Bu çalışmada kullanılan 1000, 100, 10, 1 ve 0,1 µg/plak konsantrasyonlarındaki metanol kök ekstrelerinden

TA100 suşu ile benzer sonuçlar elde edilirken, TA98 suşu ile *Limonium globuliferum*'da paralel bir sonuç elde edilmiş, fakat *Limonium effusum* kök ekstresinde zayıf mutajenite belirlenmiştir.

Bunun yanında *Plumbago auriculata*'nın Lam. (Plumbaginaceae) diklorometan ve metanol ekstralarında yapılan AMES testi sonuçlarına göre TA98 suşunda mutajenik etkiye rastlanmamıştır (Elgorashi E.E., 2003). Bu bulgu ise bu çalışmada elde edilen verilerle farklılık göstermektedir.

Modifiye edilmiş AMES testi çalışmasında *Plumbago zeylanica* kök ekstraları 10, 5, 1, 0,1 mg/ml konsantrasyonlarda, mutajeniteyi ifade eden biyokimyasal karakterlerde herhangi bir değişim oluşturmamıştır fakat aynı çalışmada yapılan *Allium* testinde aynı konsantrasyonların kök büyümesini inhibe edici ve mitotik indeksi azaltıcı etki oluşturduğu belirlenmiştir (Alade, 2009). Fiskesjö (1985) de, *Allium* EC50 testinin AMES testi ile farklı sonuçlar verdiğini rapor etmiştir. Bu bulgular bu çalışmadaki bulgular ile uyumludur.

Schimmer ve ark. (1988) kuercetin içeren dört farklı bitkinin etanolik ekstraları ile yaptıkları AMES mutajenite testi çalışmasında, TA98 suşu S9 varlığında mutajeniteyi yüksek düzeyde tespit etmişlerdir. Aynı zamanda kuercetin içeriği ile mutajenite arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan *Limonium effusum* kök metanol ekstresi S9 enzimi varlığında ve yokluğunda zayıf mutajenite bulunurken, *Limonium globuliferum* yaprak metanol ekstresinin, 10000 µg/plak konsantrasyonunda da mutajenik etkiye rastlanmıştır. Avaz (2010)'ın yaptığı FTIR analizlerinde iki metanol ekstresinde de kuercetin içeriği bildirilmiştir. Kuercetin içeriği açısından iki çalışmanın bulguları paralellik göstermektedir.

L. effusum ve *L. globuliferum* türlerinin distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) ekstralarına maruz bırakılan MDBK hücre hatlarının, proliferasyon yüzdelere bakılarak oluşan sitotoksik etkiyi belirlemek için kullanılan üçüncü test MTT test yöntemidir. MTT (Tetrazolium mavisi) kolorimetrik analizinin, ekstraların varlığında ve yokluğunda hücre kültürlerinin canlılığının redüksiyonunu değerlendirmek için kullanıldığı geçmiş çalışmalarda rapor edilmiştir. (Betancur-Galvis ve ark., 1999). Hücre proliferasyonunun,

mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesiyle hücre canlılığını ölçmek için kullanışlı bir metod olan MTT analiziyle belirlenebileceği bildirilmiştir (Mossman, 1983).

Ali ve ark. (2007), *Limonium sokotranum* yapraklarının distile su, metanol ve kloroform ekstralarının, insan amniyotik epitelyum hücre hattı olan FL-hücresi üzerine etkisini araştırmışlar ve distile suda 615.1 µg/ml, metanolde 522.1 µg/ml konsantrasyonlarının orta düzeyde toksik etki oluşturduğunu belirtmişlerdir. *Limonium* cinsinin geleneksel olarak antifungal olarak kullanılmasının sitotoksik etkilerinden kaynaklanabileceğini yine aynı çalışmacılar vurgulamıştır. Bu çalışmada da *Limonium effusum* ve *Limonium globuliferum* ekstralarının en yüksek konsantrasyonu 50 µg/ml olarak kullanılmış olup, *Limonium effusum* distile su yaprak ekstresi 24 saat uygulamasında 50 ve 25 µg/ml dozları toksik etki yaratmıştır. *Limonium effusum* metanol yaprak ekstresi 24 saat uygulamasında ise 50 µg/ml hücrelere pozitif bir etki oluşturmuşken 25 µg/ml düşük düzeyde toksik bulunmuştur. *Limonium globuliferum* distile su yaprak ekstresi 24 saat uygulamasında tüm konsantrasyonlar pozitif etki oluştururken, metanol ekstresinde bu duruma zıt bir şekilde tüm konsantrasyonlar toksik etki göstermiştir. Bu çalışma ile Ali ve ark. (2007)'nin çalışması arasında elde edilen toksisite düzeyleri ve konsantrasyonları arasında bariz fark vardır.

Santhakumari ve ark. (1980), tavuk embriyo fibroblast kültürlerinde plumbagin (naftokuinon) etkilerini araştırmışlardır. En baskın etkinin, hücre büyümesini ve proliferasyonunu durdurması ve hücreleri metafazda toplayıp mitotik indeksi azaltması olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmacılar, plumbagin düşük konsantrasyonlarda, hücrenin mitoz girişinin engellenmesiyle bir iğ ipliği zehiri gibi davranış gösterdiklerini, bunun yanında yüksek konsantrasyonlarda, nükleotoksik ve sitotoksik etkiler gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca reaktif oksijen türlerini, apoptozisi ve hücre döngüsünü engellemeyi indüklediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da kullanılan ekstraların büyük çoğunluğu, özellikle 3.ve 4. gün muamelelerinde hücre proliferasyonunu olumsuz yönde etkilemiştir. Ayrıca belirtilen nükleotoksik ve sitotoksik etkileri, çalışmanın *Allium* testi kromozom aberasyonlarının belirlenmesi ve mitotik indeksin belirlenmesi aşamasında elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Mitotik aktivitede konsantrasyonların çoğunda azalma görülmüş olup, anomali yüzdeleri ise

konsantrasyon artışına uyumlu şekilde artış göstermiştir. İki çalışmadan da elde edilen bulgular başka bir çalışmayla daha desteklenmektedir. Bu çalışmada ise *Plumbago auriculata*'nın DNA hasarına ve kromozom aberasyonlarına yol açmasından dolayı yüksek oranda toksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Taylor ve ark., 2003).

Murine makrofaj RAW 264.7 hücreleri üzerine *Limonium tetragonum* (Thunb.) bitkisinin total etanol ekstresinin etkisi incelendiğinde hücrelerin canlılığının kontrol grubuna göre % 114.92 düzeyinde arttığı belirtilmiştir (Yang ve ark., 2009). Bu çalışmada da hücre canlılığını bu düzeyde artıran ekstreler *L. effusum* yaprak distile su ekstresi 6.25 ve 3.125 µg/ml konsantrasyonları, kök metanol 25 ve 12.5 µg/ml konsantrasyonlarıdır. Kök metanol 50 µg/ml konsantrasyonu ise belirtilen değerin yaklaşık üç katı bir artış göstermiştir (% 347.62).

Limonium tetragonum bitkisinin 200 µg/ml konsantrasyonlarının, fare dalak ve timus hücrelerindeki proliferatif etkilerine bakılmış ve metanol ekstresinin dalak hücreleri üzerine proliferatif etkisi % 32.46, diklorometan ekstresinin ise % 235.09 bulunmuştur. Timus hücrelerinde ise metanol ekstresi % 17.34 ve diklorometan ekstresi % 174.62 düzeyinde hücre proliferasyonuna etkide bulunduğu gösterilmiştir (Seo, 2005). Bu yapılan çalışmada ise *L. effusum* metanol ekstrelerinin kullanılan yüksek konsantrasyonları hücre proliferasyonunu artırırken, *L. globuliferum* metanol ekstreleri, kök ve gövdenin düşük konsantrasyonları hariç, hücre proliferasyonunu düşürmüştür.

Singh ve ark. (2007) insan kanser hücre hatları (A549, Bowes, HCT15, Lovo, MCF7, T24S and U87) üzerine *Plumbago zeylanica* toprak üstü kısımlarının sitotoksitesini araştırmış ve diklorometan ve etil asetat ekstrelerinin kanser hatları üzerine sitotoksik olduğunu bulmuşlardır. Bitkinin iki aktif bileşiği olan β-sitosterol and β-sitosterol 3β-glucopyranoside 6'-O-palmitate orta derecede sitotoksik iken plumbagin yüksek oranda toksik etki yarattığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada MTT testi ile elde edilen sonuçlar da birbirinden farklılık arz etmektedir. Bu sonuçlar, bitkilerin farklı bölgelerinden ve farklı çözücülerle elde edilen ekstrelerinin içeriklerinin farkından kaynaklanmaktadır. Bu açıdan *L.*

effusum ve *L. globuliferum* türlerinin içerdiği bileşenlerinin tespiti önem arz etmektedir.

MTT analizi normal hücre hatlarının dışında çoğunlukla kanserli hücre hatlarında çalışılmış ve özellikle kök ekstralarının kanser hücre hatları üzerine kuvvetli sitotoksik etkileri belirtilmiştir. Mahavorasirikul ve ark. (2010) *Plumbago zeylanica*'nın etanol ekstrelerinin 50 µg/ml konsantrasyonunun, CL-6, HepG2, Hep-2 kanser hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi incelendiğinde sırasıyla bu hücelere ,%20, 40 ve 60 düzeylerinde sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bir başka çalışmada ise *Plumbago zeylanica* yaprak metanol ekstralarının, insan kanser hücre hatları DLD-1, MCF-7 ve M14 ile sitotoksitesini araştırılmış ve elde edilen bulgulara göre düşük toksik aktiviteye rastlanmıştır. Bu düşük aktivite de köklerde bulunan plumbagin (naftokuinon) içeriğinin yapraklarda bulunmaması ile yorumlanmıştır (Bayor ve ark., 2007). Bu çalışmada kanserli olmayan bir hücre hattı (MDBK) kullanılmış olup, kullanılan metanol kök ve yaprak ekstralarında özellikle uzun süre uygulamalarında toksik etki saptanmıştır.

Sonuç olarak, endemik *Limonium effusum* ve endemik olmayan *Limonium globuliferum* türlerinin distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) kök, gövde ve yaprak ekstraları bu çalışmada kullanılmış olup bu ekstraların AMES testi ve MTT testi ile mutajenite ve sitotoksitesini araştırılmıştır. Bunun yanında, distile su ekstralarının *Allium* testi ile sitotoksitesini ve mutajeniteleri belirlenmiştir. Yapılan *Allium* testi çalışmalarına göre kök büyüme inhibisyonu çalışmasında konsantrasyon artışına bağlı sitotoksitesini miktarında da artış gözlenmiştir. *Limonium effusum*'un kök, gövde ve yaprak ekstralarından elde edilen EC₅₀ konsantrasyonları sırasıyla 20, 65 ve 50 g/L olarak tespit edilmiştir. *Limonium globuliferum* için ise bu konsantrasyonlar sırasıyla 32.5, 50 ve 50 g/L olarak bulunmuştur. *Limonium effusum* kök ekstralarında 1.gün uygulamasında, gövde ekstrasında 1. ve 3. gün muamelesinde ve yaprak ekstrasında ise 1. ve 2. gün muamelelerinde mitotik indekste azalmalar görülmüştür. *Limonium globuliferum*'da ise kök ekstralarında farklı süre uygulamalarının tümünde, gövde ekstrasında 3. gün uygulamasında ve yaprak ekstrasında 1. ve 2. Gün uygulamalarında mitotik indekste bir azalma görülmüştür. *Allium* testi ile elde

edilen bu sitotoksisite sonuçları diğer bir sitotoksisite test yöntemi olan MTT ile de elde edilmiştir. Yani distile su, metanol ve aseton:metanol (2:1) ekstralarının tümünde bazı dozlar hariç sitotoksik etkiye rastlanmıştır. *Allium* testi kromozom aberasyonu analizinde de tüm ekstraların, iğ iplikleri bozulmalarına dayanan anomaliler olan, yapışıklık, kutup bozuklukları, geri kalmış kromozom ve anafaz köprüsü bozukluklarına yüksek oranda sebep oldukları görülmüştür. Yapılan AMES testi analizine göre ise *Limonium effusum* kök metanol ve distile su ekstralarında düşük mutajenik etki görülürken, *Limonium globuliferum* yaprak metanol ekstresi 10000 µg/plak ve distile su kök ekstresi 1 ve 0.1 µg/plak ile gövde ve yaprak distile su ekstralarının tüm dozlarında mutajenik etkiye rastlanmıştır. Bununla birlikte kullanılan diğer ekstralar ve dozların tamamı mutajenik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile *Limonium effusum* ve *Limonium globuliferum* türlerinin, mutajenik ve sitotoksik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Fakat sadece *in vitro* testlerle bu bitkilerin içerikleri, toksik veya mutajenik diye belirtilemeyeceği literatürlerde de verilmiştir. Bu açıdan bu ekstraların mutajenik veya sitotoksik potansiyelleri *in vivo* çalışmalarla da desteklenmelidir. *In vivo* çalışmalara duyulan bir başka ihtiyaç sebebi de *in vitro* çalışmaların hassasiyetlerinin yüksek oluşudur. Diğer bir taraftan, çalışılan türlerin içeriklerinin ve toksik etkileri oluşturan etken maddelerin belirlenmesi, ülkemizde bulunan genomların değerinin belirginleştirilmesi bakımından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Aardema, M.J. (2006), SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test III. Using CHO cells, *Mutat. Res.*, **607**, 61.
- Aithal, B.K., Kumar, M.R., Rao, B.N., Udupa, N. ve Rao, B.S. (2009), Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells, *Cell Biology International*, **33**, 1039-1049.
- Murakami, A., Ishida, H., Kubo, K., Furukawa, I., Ikeda, Y., Yonaha, M., Aniya, Y. ve Ohigashi, H. (2005), Suppressive Effects of Okinawan Food Items on Free Radical Generation from Stimulated Leukocytes and Identification of Some Active Constituents: Implications for the Prevention of Inflammation-associated Carcinogenesis, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **6**, 437-448.
- Akman, M. (1983), *Bakteri Genetiği*, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, 2. Baskı, Sivas.
- Alade A., Olufunsho A., Gbenga A. ve Herbert A.B.C. (2009), Mutagenic screening of some commonly used medicinal plants in Nigeria, *Journal of Ethnopharmacology*, **125**, 461–470.
- Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R. ve Peticone, P. (1998), DNA Strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells *in vitro*, *Mutat. Res.*, **429**, 239- 48.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R, Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T, Norppa, H., Suhaker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D. ve Aitio, A. (2000), IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, *Mutat. Res.*, **463**, 11-172.
- Ali, A.M., Umar-Tsafe, N., Mohamed, S.M., Inayat-Hussain, S.H., OO, K.T., Yusoff, K., Osman, A.N. ve Din, L.B. (2001), Apoptosis induction in CEMSS T-Lymphoblastic leukemic cell line by goniotalamin, *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys.*, **5**, 227-235.
- Ali, N.A.A., Mothana, R., Ghaleb, N., ve Lindequist, U. (2007), Screening of traditionally used endemic soqotraen plants for cytotoxic activity, *Afr. J. Trad. CAM*, **4(4)**, 529–531.

- Alley, M.C , Scudiero, D.A., Monks, A , Hursey, M.L., Czerwinski, M. J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. ve Boyd, M.R. (1988), Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res*, **48**,589-601.
- Al-Moaruf, O.A., Muibat, O.B., Asiata, O.I., Isiaka, A.O., Nureni, O.O. (2004), Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants, *Journal of Food Chemistry*, **85**, 67–71.
- Anonim (2006), *Limonium* bitkisinin kullanım alanları. <http://www.hekimce.com>
- Anonim (2008), Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Aromatik ve Tıbbi Bitkiler. http://www.tarim.gov.tr/uretim/Bitkisel_Uretim,Aromatik_Tibbi_Bitkiler.html.
- Anonim (2011), *Limonium* cinsinin sistematik hiyerarşisi. <http://biow.tubitak.gov.tr/present/taxonForm1.jsp?taxon=4396>
- Anonim (2011), MDBK hücre hattına ait bilgiler. http://hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=90050801&collection=ecacc_gc
- Aqil, F., Zahin, M. ve Ahmad, I. (2008), Antimutagenic activity of methanolic extracts of four ayurvedic medicinal plants, *Indian Journal of Experimental Biology*, **46**, 668-672.
- Ateeq, B., Farah, M.A., Ali, M.N. ve Ahmad, W. (2002), Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test, *Mutation Research*, **514**, 105-113.
- Avaz, S. (2010), *Afyonkarahisar'da doğal olarak yetişen Limonium Mill. türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri*, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Babatunde, B.B. ve Bakare, A.A. (2006), Genotoxicity screening of wastewaters from Agbara Industrial estate Nigeria evaluated with the *Allium* test, *Pollution Research*, **25**, 227–234.
- Babula, P., Adam, V., Kizek, R., Sladky, Z. ve Havel, L. (2009), Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death, *Environmental and Experimental Botany*, **65**, 330-337.

- Badr, A., Ghareeb, A. ve El-Din, H.M. (1992), Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells of *V. faba* roots, *Egyptian Journal of Applied Science*, **7**, 457-468.
- Bağcı, H. (1985), *Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları*, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 25-55.
- Bakare, A.A. ve Wale-Adeyemo, A.R. (2004), The potential mutagenic and cytotoxic effects of leachates from domesticwastes and Aba-Eku landfill Nigeria on *Allium cepa*, *Journal of Nature Environment Pollution Technology*, **3**, 455–462.
- Barile, F.A., (2008), *Principles of Toxicology Testing*, CRC Press Taylor & Francis Group, St. John's University, Queens, New York.
- Barquintero, J.F., Barrprios, L., Caballin, M.R., Miro, R. ve Ribas, A. (1993), Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation, *Mutat. Res.*, **286**, 275-279.
- Bayor, M.T., Ayim, J.S.K., Phillips, R.M., Shnyder, S.M. ve Wright, C.W. (2007), The evaluation of selected Ghanaian medicinal plants for cytotoxic activities, *Journal of Science and Technology*, **27(3)**, 16-24.
- Betancur-Galvis, A., Saez, J., Granados, H. ve Salazar, A. (1999), Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts, *Mem. Inst.*, **94**, 531-535.
- Bingwen, W., Rong, Z. ve Si-qing, S. (1994), *Limonium bicolor* Mechanism of hemostatic effect, *Journal of Xi'an Medical University*, **15(1)**, 59.
- Boroffice, R.A. (1990), Cytogenetic effects of zinc and chromium on the of onion (*Allium cepa*) root tip, *Nigerian Journal of Natural Science*, **1(2)**, 75–79.
- Browne, R.M. (1988), The *In Vitro* Assessment of the Cytotoxicity of Dental Materials; Does It Have a Role?, *Int. Endod. J.*, **21**, 50-58.
- Carmichael, J., Mitchell, J.B., DeGraff, W.G., Gamson, J., Gazdar, A.F, Johnson, B.E., Glatstein, E. ve Minna, J.D. (1988), Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay, *Br. J. Cancer*, **57**,540-547.

- Cerna, M., Pastorkovea, A., Smid, J., Dobias, L. ve Rossner P. (1998), The Use of YG Bacterial Tester Strains for monitoring of Drinking water mutagenicity, *Toxicology Letters*, **96**, 335- 339.
- Chaung, S.S., Lin, C.C. ve Lin, J. (2003), The hepatoprotective effects of *Limonium sinense* against carbon tetrachloride and beta-D-galactosamine intoxication in rats, *J. Phytother. Res.*, **17(7)**, 784.
- Chen Xinmin, Z. (1991), *Limonium bicolor* on chemical constituents, *Chinese herbal medicine*, **22(9)**, 390.
- Chetalat, A. A., Albertini, S. ve Gocke, E. (1996), The Photomutagenicity of Floroquindones in Test for Gene Mutation, Chromosomal Abbeation, Gene Conversiyon and DNA Breakage (Coment Assay), *Mutagen*, **5 (11)**, 497- 504.
- Clare, M.G. (2006), SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test II. Using human lymphocytes, *Mutat. Res.*, **607**, 37.
- Cordell, G.A. (1995), Changing strategies in natural products chemistry, *Phytochemistry*, **40**, 1585-1612.
- Davis, P.H., Mill, R.R. ve Tan, K. (1982), *Limonium* Miller In: Davis, P. H., Mill, R. R. & Tan, K. (eds.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement)* Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, 7, 465-477.
- Davis, J.M. (1996), *Basic Cell Culture. A Practical Approach*, Oxford University Press, New York.
- Dean, B.J., Brooks, T.M., Hodson-Walker, G. ve Hutson, D.H. (1985), Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals, *Mutation Research*, **153**, 57-77.
- Debnath, A.K., Compadre, R.L., Debnath, G., Shusterman, A. J. ve Hansch, G. (1991), Strure Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Hetemaromatik Nitro compounds. Correlation with Moleculer orbital Energies and Hydrophobicity, *Journal of Medicinal Chemistry*, **34 (2)**, 786- 797.
- Desesso, J.M., Lavin, A.L, Hsia, S.M. ve Mavis, R.D. (2000), Assesment of the corcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide, *Food and chemical Toxicology*, **38**, 1021- 1041.

- Doğan, A., Doğan, A.L., Canpınar, H. ve Demirpençe E. (2004), Hidroksiürenin lökositlerin mikrobisid fonksiyonlarına etkileri, *Türk Biyokimya Dergisi*, **29(3)**, 232-236.
- Durga, R., Sridhar, P. ve Polasa, H. (1992), Antimutagenic activity of plumbagin in Ames *Salmonella typhimurium* test, *Ind. J. Med. Res. Sect B*, **96**, 143-145.
- Durusoy, M. ve Kambur, S. (2003), The Application of the UMU test system for screening mutagenicity of surface water, *Türk Biyokimya Dergisi*, **28(1)**, 3-7.
- Eagelton, J., Man, S. (2006), Safety and toxicity evaluation of Chinese herbal medicine, <http://www.shen-nong.com/eng/cm/cm9.html>.
- Edenharder, R. ve Tang, X. (1997), Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds, *Food Chem. Toxicol.*, **35(3-4)**, 357-372.
- Elçi, S., (1994), *Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri*, Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi Yayınları, Elazığ.
- Elgorashi, E.E., Taylor, J.L.S., Verschaeve, L., Maes, A., Van Staden, J. ve De Kimpe, N. (2003), Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects, *Toxicol. Letters*, **143**, 195-207.
- Farr, S.B., Natvig, D.O. ve Kogoma, T. (1985), Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **164(3)**, 1309- 1316
- Fasola, T.R. ve Egunyomi, A. (2005), Nigerian usage of bark in phytomedicine, *Journal of Plants People and Applied Research*, 73–77.
- Feigal, R.J., Yeşilsoy, C., Messer, H.H. ve Nelson, J. (1985), Differential Sensitivity of Normal Human Pulp and Transformed Mouse Fibroblasts to Cytotoxic Challenge, *Arch Oral Biol*, **30**, 609–613.
- Fender, H., ve Wolf, G. (1998), Cytogenetic investigations in employees from waste disposal sites, *Toxicology Letters*, **96**, 149- 154.

- Fiskesjö, G. (1981), *Allium* test on copper in drinking water, *Vatten*, **17(3)**, 232-240.
- Fiskesjö, G. (1983), Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*, *Physiologica plantarum*, **59**, 508-511.
- Fiskesjö, G. (1985), The *Allium* as a standard in environmental monitoring, *Hereditas*, **102**, 99-102.
- Fiskesjö, G., (1997), *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytologic parameters, In: Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Eds.), *Plants for Environmental Studies*. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, New York, 308–333.
- Forman, D. ve Ames, B. (1991), The Ames Test and the causes of cancer, *Reprinted from the British Medical Journal*, **303**, 428- 429.
- Freshney, R.I. (1986), *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, IRL Press Limited, Oxford.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. ve Siede, W. (1995), *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Gadano, A.B., Gumi, A.A. ve Carballo, M.A. (2006), Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family, *Journal of Ethnopharmacology*, **103**, 246–251.
- Gatehouse, D.G, Rowland, I.R., Wilcox, P., Callander, R.D. ve Foster, R. (1990), *Bacterial mutation assay, Basic Mutagenicity Ukems recommended procedures* (Ed: Kirkland, D.J.), The Bath Press, Avon, Great Britain, UK.
- Genç, S., Akhisaroğlu, M., ve Genç, K. (2002), Eritropoetin'in PC12 hücre hattında Amiloid-Beta peptid ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi, *Turkish Journal of Geriatrics*, **5(1)**, 1-6.
- Grant, W.F. (1978), Chromosome Aberrations in plants as a monitoring system, *Environmental Health Perspectives*, **27**, 37–43.
- Grant, W.F. (1982), Chromosome aberration assays in *Allium*, *Mutat Res.*, **99**, 273-291.

- Haack., T., Erdinger, L. ve Boche, G. (2001), Mutagenicity in Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100 of nitrore and respective hydroxylamine compounds., *Mutat Res.*, **491**, 183-193.
- Haider, S., Naithani, V., Barthwal, J. ve Kakkar, P. (2004), Heavy metal content in some therapeutically important medicinal plants, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **72**, 119–127.
- Hakura, A., Mochida, H., Tsutsui, Y. ve Yamatsu, K. (1994), Mutagenicity and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames Salmonella tester strains. *Chem. Res.Toxicol.*, **7(4)**, 559-567.
- Hanks, C.T., Wataha, J.C. ve Sun, Z. (1996), *In Vitro* Models of Biocompatibility: A Review, *Dent. Mater.* **12**, 186-193.
- Hass, B.S., Heflich, R.H., Shaddock, J.G. ve Casciana, D.A. (1986), Comparison of mutagenicities in a Salmonella reversion assay mediated by uninduced hepatocytes and hepatocytes from rats pretreated for 1 or 5 days With Aroclor 1254, *Environmental Mutagenesis*, **7**, 391-403.
- Higashimoto, M., Purintrapiban, J., Kataoka, K., Kinouchi, T., Vinitketkumnuen, U., Akimoto, S., Matsumoto, H. ve Ohnishi, Y. (1993), Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three species and a medicinal plant in Thailand, *Mutat. Res.*, **303**, 135-142.
- Holst, C.M. ve Oredsson, S.M. (2005), Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines, *Toxicology in vitro*, **19**, 379-387.
- Hong, X.Y., Li, F. ve Hongtao, Z. (2004), Artificial cultivation of *Limonium bicolor* bright future, *Plant Journal*, **1**, 12.
- Izzo, A.A. ve Ernst, E. (2001), Interactions between herbal medicines and prescribed drugs, *Drugs*, **61**, 2163–2175.
- Jinming, G. (2003), *Phytochemicals*, Beijing: Science Press, 214. *Free Papers Download Center*.
- Josephy, P.D., Gruz, P. ve Nohmi, T. (1997), Recent advances in the construction of Bacterial genotoxicity Assays, *Mutat. Res.*, **386**, 1-23.

- Ka-Lin, C, ve Li, N. (2004), *Limonium bicolor* polysaccharide Structural Characterization of the inhibition of Hela Cells, *J. High school-like Chimica Sinica*, **25(11)**, 2034.
- Kallus, T. (1984), Evaluation of the Toxicity of Denture Base Polymers after Subcutaneous Implantation in Guinea Pigs, *J. Prosthet. Dent.*, **52**, 126-134.
- Kang, U.J., Fisher, L.J., John, T.H., O'Malley, K.L. ve Gage, F.H. (1993), Regulation of Dopamine Production by Genetically Modified Primary Fibroblasts, *J. Neurosci.*, **13**, 5203–5211.
- Kasamatsu, T., Kohda, K. ve Kawazoa, Y. (1996), Comparison of chemically Induced DNA Breakage in cellular and subcellular Systems using the comet assay, *Mutat. Res.*, **389**, 1-6.
- Kassie, F., Parzefall, W., Musk, S., Johnson, I., Lamprecht, G., Sontag, G. ve Knasmueller, S. (1996), Genotoxic effects of crude juices from *Brassica* vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells, *Chem. Biol. Interact.*, **102**, 1-16.
- Klaassen, C. D. (2008), *Casarett and Doull's Toxicology*, Seventh Edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division, Kansas City, Kansas.
- Krishnaraju, A.V., Rao, T.V.N., Sundararaju, D., Vanisree, M., Tsay, H. ve Subbaraju, G.V. (2006), Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test), *International Journal of Applied Science and Engineering*, **4(2)**, 115-125.
- Krishnaswamy, M. ve Purushothaman, K.K. (1980), Plumbagin: A study of its anticancer, antibacterial and antifungal properties, *Ind. J. Exp. Biol.*, **18(8)**, 876-877.
- Kuo, Y., Lin, L.C. ve Tsai, W.J. (2002), Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type-1, *J. Antimicrob Agents Chemother.*, **46(9)**, 2854.
- Kurokawa, M., Ochiai, H., Nagasaka, K., Neki, M., Xu, H., Kadota, S., Sutardjo, S., Matsumoto, T., Namba, T. ve Shiraki, K. (1993), Antiviral

- traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus, and measles virus in vitro and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice, *Antiviral Research*, **22**.
- Lellau, T.F. ve Liebezeit, G. (2003), Cytotoxic and antitumor activities of ethanolic extracts of salt marsh plants from the lower Saxonian Wadden sea, southern North sea, *Pharmaceutical Biology*, **41(4)**, 293-300.
- Lerda, D. (1992), The Effect of Lead on *Allium cepa* L., *Mutation Research*, **281**, 89–92.
- Lin, L.C. ve Chou, C.J. (2000), Flavonoids and phenolics from *Limonium sinense*, *Planta Med.*, **66(4)**, 382.
- Lin, L.C. ve Kuo, C.J. (2000), Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids a new flavanone from the root of *Limonium sinense*, *J. Planta Med.*, **66(4)**, 333.
- Mahavorasirikul, W., Viyanant, V., Chaijaroenkul, W., Itharat, A. ve Na-Bangchang, K. (2010), Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **10**, 55.
- Majone, F., Burentti, R., Fumagalli, O., Gabriella, M. ve Levis, A.G. (1990), Induction of micronuclei by mitomycin C and colchicine in the marine Mussel *mytilus galloprovincialis*, *Mutat. Res.*, **244**, 147- 151.
- Maron, D. M. ve Ames, B. N. (1983), Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215.
- Matsushima, T., Muramatsu, M., Yagame, O., Araki, A., Tikkanen, L. ve Natori, S. (1986), “Mutagenicity and chemical structure relations of naturally occurring mutagens from plants”, In: Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J., eds., Progress in Clinical and Biological Research. Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: *Genetic Effects and Applied Mutagenesis; 4th International Conference on Environmental Mutagens*, New York, Alan R. Liss, Inc., 133-140.
- McGill, M., Pathak, S. ve Hsu, T.C. (1974), Effect of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickiness, *Chromosoma*, **47**, 157-167.

- Mjör, I.A., Hensten-Pettersen, A. (1983), The Biological Compatibility of Alternative Alloys, *Int. Dent. J.*, **33**, 35-40.
- Mohamed, S.M., Ali, A.M., Rahmani, M., Wiart, C., Dhaliwal, J.S. ve Yusoff, K. (2000), Apoptotic and necrotic cell death manifestations in leukemic cells treated with methylgerambullin a sulphone from *Glycosmis calcicola*, *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys*, **4**, 253-261.
- Mortelmans, K. ve Zeiger E. (2000), The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutation Research*, **455**, 29-60.
- Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.*, **65**, 55-63.
- Murray, A.P., Rodriguez, S., Frontera, M.A., Tomas, M.A. ve Mulet, M.C. (2004), "Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze", *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, **59c**, 477-480.
- Nakamura, K., Veno, H. ve Sayato, Y. (1992), Evaluation of mutagenicity of municipal River Water concentrated using XAD Resin Column Method, *Water Sciences Technology*, **25 (11)**, 293- 299.
- O'Hare, S. ve Atterwill, C.K. (1995), *Methods in Molecular Biology, In Vitro Toxicity Testing Protocols*, Chapter 16, 43, Humana Press Inc., Totowa, NJ, U.S.A.
- Oda, Y., Makamura, S., Oki, I., Kato, T. ve Shinagausa, H. (1985), Evaluation of the new system (UMU test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutat. Res.*, **147**, 219-229.
- Oliver, J. (2006), SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test V. Using L5178Y cells, *Mutat. Res.*, **607**, 125.
- Ostling, O. ve Johanson, K.J. (1984), Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 291- 298.
- Parry, J.M. ve Parry, E.M. (2006), The use of the *in vitro* micronucleus assay to detect and assess the aneugenic activity of chemicals, *Mutat. Res.*, **607**, 5.

- Poppenga, R.H. (2002), Herbal medicine: Potential for intoxication and interactions with conventional drugs, *Clinical Techniques in Small Practice*. **17**: 6-18.
- Quillardet, P. ve Hofnung, M. (1985), The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, *Mutat. Res.*, **147**, 65-78.
- Rasmussen, L.H., Jensen, L.S. ve Hansen, H.C. (2003), Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark, *J. Chem. Ecol.*, **29**, 771–778.
- Roy-Byrne, P.P., Bystritsky, A., Russo, J., Craske, M.G., Sherbourne, C.D. ve Stein, M.B. (2005), Use of herbal medicine in primary care patients with mood and anxiety disorders, *Psychosomatics*, **46**, 117–122.
- Ruben, R.L. ve Neubauer, R.H. (1987), Semiautomated colorimetric assay for *in vitro* screening of anticancer compounds, *Cancer Treat Rep.*, **71(12)**, 1141-1149.
- Russell, P.J. (1998), *Genetics*, The Benjamin, Cummings, Publishing company, Inc., Canada, USA.
- Sirohi, S.K., Pandey, N., Goel, N., Singh, B., Mohini, M., Pandey P. ve Chaudhry, P.P. (2009), Microbial Activity and Ruminal Methanogenesis as Affected by Plant Secondary Metabolites in Different Plant Extracts, *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, **1(1)**, 52-58.
- Saad, B., Dakwar, S., Said, O., Abu-Hijleh, G., Al Battah, F., Kmeel, A. ve Aziازه, H. (2006), Evaluation of medicinal plant hepatotoxicity in co-cultures of hepatocytes and monocytes, *eCAM.*, **3**, 93-98.
- Santhakumari, G., Saralamma, P.G. ve Radhakrishnan, N. (1980), Effect of plumbagin on cell growth & mitosis, *Indian J. Exp. Biol.*, **18**, 215–218.
- Schimmer, O., Haeefele, F. ve Kruger, A. (1988), The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, *Mutat. Res.*, **206**, 201-208.

- Schimmer, O., Hafele, F., ve Krüger, A. (1988), The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **206(2)**, 201-208.
- Schmalz, G. (1994), Use of Cell Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials-Advantages and Limitations, *J. Dent.*, **22(2)**, 6-11.
- Schramke, H. (2006), The mouse lymphoma thymidine kinase assay for the assessment and comparison of the mutagenic activity of cigarette mainstream smoke particulate phase, *Toxicology*, **227**, 193.
- Sessa, R.A., Bennett, M.H. ve Lewis, M.J. (2000), Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species, *J. Biol. Chem.*, **275**, 877–884.
- Sharma, C.B.S.R. (1983), Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals, *Current Science*, **52**, 1000-1002.
- Simaan, J.A. (2009), Herbal medicine, what physicians need to know, *Lebanese Medical Journal*. **57**: 215-217.
- Singh, A. (2009), *Bioactivity of famine food plants from the family: Amaranthaceae*, Degree of Master of Technology (Biotechnology), Durban University of Technology, Department of Biotechnology and Food Technology, Durban, South Africa.
- Singh, N.P., Mccoy, M.T., Tice, R.R. ve Schneider., E.L. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells., *Experimental cell Research*, **175**, 184- 191.
- Singh, V. K., Govil, J. N., Ahmad, K., Sharma, R. K. (2007), Cytotoxicity of five plants used as anticancer remedies in Vietnamese traditional medicine, *Natural products I*, **15**, 137-147.
- Smolinske, S.C. (2005), DABAT Herbal Product Contamination and Toxicity, *J. Pharm. Pract.*, **18**, 188-208.
- Sofowora, A. (1999), *The state of medicinal plants research in Nigeria*, In: Proceeding of workshop held at Ile-Ife, Nigeria, 1–373.
- Spier, R.E. ve Griffiths, J.B. (1985), *Animal Cell Biotechnology I*, Cell Biology Experimental Aspects. Academic Press Inc., London.

- Sram, R.J., Rossner, P., Peltonen, K., Podrazilova, K., Mrackova, G., Demopoulos, N.A., Stephanou, G., Vlachodi Mitropoulos, D., Darroudi, F. ve Tates, A.D. (1998), Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameter in 1, 3- butadiene-exposed workers, *Mutat. Res.*, **419**, 145- 154.
- Steff, L.B. (2007), Herbal hepatotoxicity, *Clinics in Liver Disease*. **11**: 577-596.
- Subhashini, J., Mahipal, S.V.K. ve Reddanna, P. (2005), Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro*, *Cancer Letters*, **224(1)**, 31-43.
- Surralles, J., Falck, G. ve Norppa, H. (1998), In vivo cytogenetic damage revealed by Fish analysis of cadmium in G₀ and S phase of their cell cycles, *Mutat. Res.*, **412**, 109- 114.
- Swierenga, S.H.H., Heddle, J.A., Sigal, E.A., Gilman, J.P.W., Brillinger, R.L., Douglas, G.R. ve Nestmann, E.R. (1991), Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories. IV. Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures, *Mutation Research*, **246**, 301–322.
- Taylor, R. S. L., Manandhar, N. P., Hudson, J. B. ve Towers, G. H. N. (1996), Antiviral activities of nepalese medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **52**, 157-163.
- Taylor, J.L.S., Elgorashi, E.E., Maes, A., Van Gorp, U., De Kimpe, N., Van Staden, J. ve Verschaeve, L. (2003), Investigating the safety of plants used in South African traditional medicine: testing for genotoxicity in the micronucleus and alkaline comet assays, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **42**, 144–154.
- Timbrell, J. (2002), *Introduction to toxicology*, Third Edition, Taylor & Francis, London, UK.
- Topaktaş, M. ve Speid, G. (1990), Sister chromatid exchange (SCE) testinin mutajenite ve kan serojenitenin belirlenmesinde kullanılması, *Ç.Ü. Sağlık Bil. Der.*, **5**, 73-84.

- Trosko, J.E. (1997), Challenge to the simple paradigm that “carcinogens” are “mutagens” and to the in vitro and in vivo assays, used to test the paradigm, *Mutat. Res.*, **373**, 245- 249.
- Vrijssen, R., Michotte, Y. ve Boeye, A. (1990), Metabolic activation of quercetin mutagenicity, *Mutat. Res.*, **232**, 243- 248.
- Vural, N. (1984), *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Ecz. Fak. Yayınları, 56, Ankara, 32- 81.
- Wagstaff, D.J. (2008), *International Poisonous Plants Checklist*, CRC Press Taylor & Francis Group, NW, USA.
- Walker, G.C. (1985), Inducible DNA repair systems, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 425-457.
- Wang, K., Shindoh, H., Inoue, T. ve Horii, I. (2002), Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines, *Journal of Toxicological Sciences*. **27**: 229-237.
- Watanabe, K., Sakamoto, K. ve Sasaki, T. (1998) Comparisons on chemically-induced mutation among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 uvrA/pKM101: Collaborative study II., *Mutat. Res.*, **412(1)**, 17-31.
- WHO (1985), The WHO traditional medicine programme: policy and implementation. *International Traditional Medicine Newsletter 1*, 1-5.
- William S. B. ve Edward J. K. (1978), Testing the Environment for Dispersed Mutagens: Use of Plant Bioconcentrators Coupled with Microbial Mutagen Assays, *Environmental Health Perspectives*, **27**, 61-67.
- Williams, G.M. (1977), Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures, *Cancer Res.*, **37**, 1845.
- Xiuyun, L. ve Xian, Y.J. (1991), *Limonium bicolor* and other four kinds of herbal medicine to stop bleeding in the determination of trace elements, *J. Northwest Pharmaceutical Journal*, **6(1)**, 16.
- Yang E., Yim E., Song, G., Kim, G. ve Hyun, C. (2009), Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts, *Interdisc. Toxicol.*, **2(4)**, 245–249.

- Seo, Y., Lee, H., Ah Kim, Y., Youn, H.J. ve Lee, B. (2005), Effects of Several Salt Marsh Plants on Mouse spleen and Thymus Cell Proliferation Using MTT Assay, *Ocean Science Journal*, **40(4)**, 209-212.
- Zeiger, E. (2001), Mutagens that are not carcinogenic: faulty theory or faulty tests, *Mutation Research*, **492**, 29–38.
- Zhen-fa, X. ve Liang, Z. (1991), *Limonium sinense* in mice with hemorrhagic anemia - *Limonium sinense* main component analysis, *Journal of Shantou University (Natural Science Edition)*, **6(1)**, 78.
- Zhenheng, W. ve Hafei, Z. (2005), *Limonium bicolor* comprehensive utilization of resources, *J. Chinese Journal of Practical Medicine*, **18(7)**, 1077.
- Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y. ve Lee, E.J. (2004), Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly, *Life Sciences*, **74**, 935-968.
- Zhu, G. ve Jiu-rong, Y. (1994), *Limonium sinense* chemical constituents, *Chinese herbal medicine*, **25(8)**, 398.
- Zia S. ve Khan, M.A. (2004), Effect of light, salinity, and temperature on seed germination of *Limonium stocksii*, *Can. J. Bot.*, **82**, 151–157.