

TÜBAV BİLİM DERGİSİ

JOURNAL OF TUBAV SCIENCE



TURKISH SCIENCE RESEARCH FOUNDATION

TÜBAV BİLİM DERGİSİ

Türk Bilim Araştırma Vakfı (TÜBAV) desteğiyle TÜBAV BİLİM DERGİSİ adıyla Fen Bilimleri, Sağlık Bilimleri ve Sosyal Bilimler alanlarını kapsayan yılda 4 sayı olarak 2008 yılından itibaren yayın hayatını sürdüren, hakemli, uluslar arası Türkçe yayın yapmayı hedeflemiş bilimsel bir dergidir. 2013 yılında TÜBİTAK ULAKBİM Dergi PARK sistemine dahil edilmiştir. Yazarlarca, bu sistemimizi kullanarak gönderilen çalışmalar değerlendirilmektedir.

2021 • CİLT / VOLUME 14 • SAYI / NUMBER 2

Baş Editör / Editor in Chief

Prof. Dr. Halil İbrahim BÜLBÜL

Yönetim Adresi / Address of Directors

Türk Bilim Araştırma Vakfı (TÜBAV)
Taşkent Caddesi (1. Cadde)
No: 19/1, Bahçelievler 06500
ANKARA-TÜRKİYE

Yerel Süreli Yayın / Local Periodical

ISSN 1308-4933

Yayıncı / Publishers

TÜRK BİLİM ARAŞTIRMA VAKFI (TÜBAV)

Baş Editör

Prof. Dr. Halil İbrahim BÜLBÜL

Alan Editörleri

Prof. Dr. İlhami ÇOLAK, Nişantaşı Üniversitesi, TÜRKİYE, Mühendislik Alanı
Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU, Gazi Üniversitesi, TÜRKİYE, Mühendislik Alanı
Prof. Dr. Harun ÜLGER, Erciyes Üniversitesi, TÜRKİYE, Tıp Alanı
Prof. Dr. Bekir BULUÇ, Gazi Üniversitesi, TÜRKİYE, Eğitim Bilimleri Alanı
Prof. Dr. Yoshitaka NAKANISHI, Kumamoto Üniversitesi, JAPONYA, Mühendislik alanları
Prof. Dr. Vladyslav Pliuhin, O.O. Beketov National University of Urban Economy in Kharkiv, Ukraine, Mühendislik Alanları
Dr. Irshad Hussain, The Islamic University of Bahawalpur Pakistan, Pakistan, Bilgi ve İletişim Teknolojileri alanı

Yayın Kurulu

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Kamil AYDIN, Atatürk Üniversitesi
Prof. Dr. Ahmet AKSOY, Erciyes Üniversitesi
Prof. Dr. Ömer Faruk BAY, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. İlhami ÇOLAK, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. H. İbrahim ÜNAL, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Fatma ÜNAL, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Hüseyin DEMİR, Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Prof. Dr. Ömer EYERCİOĞLU, Gaziantep Üniversitesi
Prof. Dr. Ahmet ÖZDEMİR, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. İhsan KELEŞ, Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Prof. Dr. H. Serdar YÜCESU, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. B. Kemal YEŞİLBURSA, Abant İ. B. Üniversitesi
Prof. Dr. Güngör BAL, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Ziya ARGÜN, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Ertuğrul BALTACIOĞLU, M. Kemal Üniversitesi
Prof. Dr. Hüseyin Rıza BÖRKLÜ, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Recai COŞKUN, Sakarya Üniversitesi
Prof. Dr. Seyhan FIRAT, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. H. Yılmaz ARUNTAŞ, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Mustafa KURT, Ahi Evran Üniversitesi
Prof. Dr. Kemal ERŞAN, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. O. Ayhan ERDEM, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Erol KURT, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Dr. Mustafa ÜNAL, Erciyes Üniversitesi
Prof. Dr. Halil İbrahim BÜLBÜL, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Fatma AYZAZ, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. A. Fuat BOZ
Prof. Dr. Bekir BULUÇ
Prof. Dr. Erdal BEKİROĞLU, Abant İ. B. Üniversitesi
Prof. Dr. İbrahim SEFA, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Mustafa BÖYÜKATA, Bozok Üniversitesi
Prof. Dr. Dr. Şevki DEMİRBAŞ, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Hakan ATEŞ, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Erdal IRMAK, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Ahmet DURGUTLU, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Çetin GENÇER, Fırat Üniversitesi
Prof. Dr. İlyas ÇANKAYA, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
Prof. Dr. Necmi ALTIN, Gazi Üniversitesi
Doç. Dr. Mehmet DEMİRTAŞ, Gazi Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Süleyman ÜSTÜN, Manisa Celal Bayar Üniversitesi

TÜBAV BİLİM DERGİSİ

2021 • CİLT / VOLUME 14 • SAYI / NUMBER 2

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

KEYİF VERİCİ ÖZELLİĞİ İLE HALK ARASINDA KULLANILAN HYOSCYAMUS NIGER L.'NİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ Hüsnü Bayam & Handan Uysal.....	1-12
--	------

KEYİF VERİCİ ÖZELLİĞİ İLE HALK ARASINDA KULLANILAN *HYOSCYAMUS NIGER L.*'NİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Hüsnü BAYAM¹, Handan UYSAL²

husnubym@gmail.com¹, hauysal@atauni.edu.tr²

^{1,2}Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kriminalistik Ana Bilim Dalı, Erzurum,
Türkiye

Özet

Ülkemizde yaygın bulunan *Hyoscyamus niger L.* (ban otu)'nin keyif verici özelliği halk arasında bilinmektedir. Bu bitki kolay ulaşılabilir olması ve kullanımının yasal olarak suç olmamasından dolayı uyuşturucu olarak da kullanılmaktadır. Narkotik özellikli bitki türlerinin, canlılar üzerindeki etkileri kısa sürede gözlenemeyebilir. Ayrıca beklenen etkiler vücutta bulunan çeşitli koruma mekanizmalarıyla baskılanabilmektedir. Bu çalışmada, *H. niger*'in genotoksik etkili olup olmadığını belirlemek için insan periferik lenfositlerine *in vitro* Mikronükleus (MN) testi uygulanmıştır. Bitkinin uyuşturucu etkilere sebep olan madde içerikleri de Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, kullanılan bitkiye ait su ve metanol ekstraktlarının yüksek oranda atropin ve geranylgeraniol içerdiği saptanmıştır. Ayrıca her iki ekstraktın artan dozuna bağlı olarak mikronükleus oranının arttığı da tespit edilmiştir. Keyif verici olarak kullanılan *H. niger* bitkisinin insanlara verdiği zararlar düşünüldüğünde, resmi kurumlar tarafından yeni düzenlemeler yapılarak yasal tedbirlerin alınması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: uyuşturucu özellik gösteren bitkiler, alkaloidler, genotoksik etki

DETERMINATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF *HYOSCYAMUS NIGER L.*, WHICH IS USED BY THE PUBLIC WITH ITS PLEASURABLE FEATURE

Abstract

Hyoscyamus niger L. species, which are among the Solanaceae family, which are widely found in our country, have pleasant properties. This plant is also used as a drug because it is easily available and its use is not legally a crime. The effects of narcotic plant species on living things may not be observed in a short time. In addition, the expected effects can be suppressed by various protection mechanisms in the body. In this study, *in vitro* Micronucleus (MN) test was performed on human peripheral lymphocytes to determine whether *H. niger* is genotoxic. The substance contents of the plant that cause narcotic effects were determined by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS) method. According to the data obtained, it was determined that the water and methanol extracts of the plant used contain high rates of atropine and geranylgeraniol alkaloids. It was also found that the micronucleus ratio increased depending on the increasing dose of both extracts. Considering the harm caused by *H. niger* plant, which is used as a pleasure, to humans, new regulations should be made by official institutions and legal measures should be taken.

Keywords: plants with narcotic properties, alkaloids, genotoxic effect

Bu çalışma, birinci yazarın ikinci yazar danışmanlığında hazırladığı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

1. GİRİŞ

Beyin fonksiyonları üzerindeki etkileri ile ruhsal, bedensel ve davranışsal değişmelere sebep olup bağımlılığa neden olan keyif verici maddelere “uyuşturucu madde” denilmektedir. Medeniyetlerin başlangıcından günümüze kadar geçen zaman içerisinde dünyanın farklı yerlerinde uyuşturucu maddelerin keyif verici özelliğinin yanı sıra tıbbi amaçlarla ağrı kesici ve iyileştirici olarak kullanıldığı da bilinmektedir. Ancak günümüzde uyuşturucu maddeler gençler hatta ilkökul çağındaki çocuklar arasında bile merakla başlayıp farklı yaş gruplarında bağımlılık yaratacak kadar insanları tesiri altına almaktadır. Bu maddeler genel olarak merkezi sinir sistemine doğrudan veya dolaylı tesir ederek, bedenin doğal çalışma akışını, duygu, algı ve organları önemli ölçüde etkilerler. Uyuşturuculardan bahsederken yalnızca illegal olan uyuşturucular söz konusu değildir. Bu tanımlamaya aynı zamanda kullanımı yüksek boyutlara ulaşan, alış veriş serbest olup tüketimine toplumda izin verilen sigara, alkol ve bu potansiyele sahip çeşitli haplar da girmektedir. Bağımlılık yapabilen bu meşru maddelerin yüksek miktarlarda kullanılmasıyla meydana gelen tahripler, illegal uyuşturucuların sebep olduğu etkilere yakındır. Ancak kamuoyunda özellikle illegal uyuşturucular ve bunları kullanan kişiler gündemdedir.

Bütün uyuşturucularda bulunan ortak özellik, uzun süre kullanıldığında, fertlerin sağlığında, kişiliğinde ve buna bağlı olarak toplumsal ilişkilerinde olumsuz değişiklikler oluşturmasıdır. Ancak başlangıçta tıpkı sigara ve alkol kullanımı gibi kendince güzel duygulara ulaşma ve geçici rahatlama sağladığını unutmamak gerekir. Kişisel ve toplumsal yönden ekonomik ve sosyal çöküntü oluşturan uyuşturucu maddelerin genellikle bitkisel kaynaklı olduğu da bilinmektedir.

Uyuşturucu potansiyeli olan ve halk arasında keyif verici olarak kullanılan *Hyoscyamus niger* bu bitkilerden birisidir. Solanaceae familyasına ait olan türün Anavatanı kuzey yarım kürenin ılıman bölgeleridir. Ülkemizde de yaygın olarak tüm bölgelerde, 0-2300 m yüksekliğindeki ekili alanlar ile taşlı, kayalık, kurak yamaçlarda yayılım göstermektedir. Halk arasında güz tohumu, ban otu, bengildek, benk, gavur haşhaşı ve kara ban otu adlarıyla bilinen *H. niger* batı literatüründe de henbane ismiyle tanınmaktadır (Spoerke *et al.* 1987). Bu bitkinin boyu 25-80 cm olup çiçekleri sarımtırak ve kırmızımsı mor renktedir. Olgunlaştığı zaman bir kapak ile açılan meyvesinde yüzlerce tohum bulunduran tek yıllık otsu bir bitkidir (Baytop 1984). Genel görünüm olarak açık yeşil renkte olup, gövdesi ve kapsülünün etrafı beyaz ve uzun tüyler ile örtülüdür (Şekil 1).

Sunulan bu çalışmada, yol kenarları, sahil şeridi, park ve boş arazilerde doğal olarak yetişebilen, bu sayede kolay ulaşılabilen yabani bir bitki türü olan *H. niger*'in insanlarda genotoksik etkili olup olmadığı *in vitro* mikronükleus (MN) testi ile araştırılmıştır. Ayrıca *H. niger* tohumlarına ait metanol ve su ekstraktlarının içeriği de Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) ile belirlenmiştir.



Şekil 1. *H. niger*'in beyaz tüylerle kaplı kapsülleri

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitkinin Toplanması, Metanol ve Su Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmamız da kullanılmak üzere *H. niger* bitkisi Erzurum ilinden doğal ortamında ve Temmuz ayının 4. haftasında çiçeklenme dönemi içerisinde toplanmıştır. Toplanan bitki güneş görmeyen gölge ortamda kurutma kağıtları içine konulmuş, oda sıcaklığında (22–24°C), her gün kurutma kâğıtları değiştirilerek kurutulmuştur. Daha sonra *H. niger*'in tohumları (Şekil 2) ayıklanarak porselen havanda sıvı azot ile öğütülmüş ve toz haline getirilmiştir. Elde edilen toz, metanol içinde 24 saat oda sıcaklığında bekletilip süzgeç kâğıdından geçirilmiştir. Süzüntü 50°C sıcaklıkta soxhlet ekstraktörü ile yoğunlaştırılarak metanol ekstraktı (HN_{met}) elde edilmiştir.

Su ekstraktı için de yine öğütülerek toz haline getirilmiş *H. niger*'in tohumları üzerine 60-80°C sıcaklıkta saf su dökülüp oda sıcaklığı (22–24°C) seviyesine düşüncüye kadar bekletilmiştir. Soğuyan karışım süzgeç kâğıdından geçirilerek sulu bitki çözeltilisi elde edilmiştir. Çözeltide bulunan suyun uzaklaştırılması için liyofilizasyon metodu kullanılmıştır. Elde edilen su ekstraktı, HN_{su} olarak isimlendirilmiş ve kullanılıncaya kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2. Kurutulmuş *H. niger*'in tohumları

2.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Analizinin Yapılması

Çok bileşenli kimyasal ya da biyolojik örneklere ait karışımlardaki elementlerin belirlenmesinde ve bileşiklerin daha kolay tanımlanmasını sağlayan GC-MS yönteminde iki cihaz aynı anda ve bir arada çalışarak analiz yapmaktadır. Burada gaz kromatografisi (GC) örneklerdeki bileşenleri ayırırken, kütle spektroskopisi (MS) ise her bir bileşeni ayrı ayrı tanımlamaktadır. Araştırmamızda kullanılan *H. niger*'e ait metanol ve su ekstraktlarındaki bileşenlerin tanımlanması için Agilent 6890N Network GC sistem, 5977 kütle spektroskopisi dedektörü, Agilent 7693 serisi otosampler ve HP-5 MS kolon (30 m x 0,250 mm ID, film kalınlığı 0,25 Mm) kullanılarak; 1 ml/dk akış hızı, splitless enjeksiyon hacmi ve sıcaklık programı 50°C'de 1 dakika, 20°C yükselterek 100°C'de 1 dakika bekletilerek, dakikada 10°C yükselterek 180°C'de 1 dakika bekletilerek, dakikada 5°C yükselterek 220°C'de 5 dakika bekletilerek, dakikada 10°C

yükselterek 300°C'de 5,5 dakika bekletilerek uygulanan fırın sıcaklık programı ile analiz gerçekleştirilmiştir.

2.3. Mikronükleus Testinin Yapılması

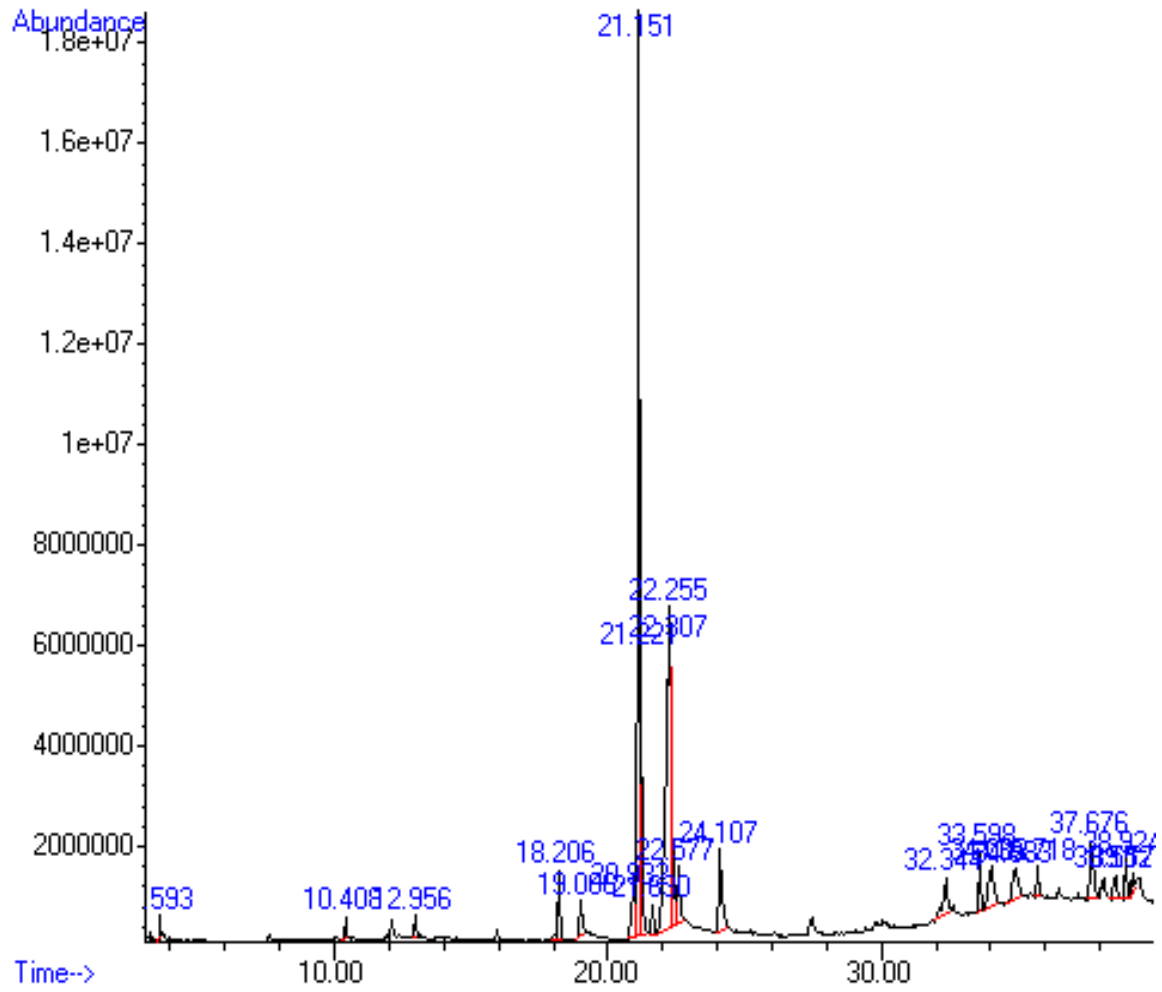
Mikronükleus çalışmaları için kan örnekleri sigara ve alkol kullanmayan, yakın zamanda enfeksiyon geçirmemiş, X ışını gibi herhangi bir fiziksel ajana maruz kalmamış, 26-28 yaşlarında sağlıklı üç farklı donörden alınmıştır (Bölge Eğitim Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (BEAH KAİK), 2018/12-113). İnsan periferik lenfositlerinde HN_{met} ve HN_{su}'ya bağlı mikronükleus frekansının belirlenmesi için Fenech (2000) ile Kirsch-Volders *et al.*, (1997) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla sağlıklı üç ayrı bireyden alınan 0,15 ml kan numunesi, 3 ml hazır besi yerine (kromozom medyum B) eklenmiş ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24. saatinde ön denemelerle belirlenen HN_{met} ve HN_{su} ekstraktlarının dört farklı dozu (10, 20, 30 ve 40 ppm) hücre kültür tüplerine ayrı ayrı eklenmiştir. 48. saatte ise sitokinezi engellemek için her tüpe son konsantrasyonu 3 µg/mL olacak şekilde sitokalsin-B ilave edilmiştir. 72. saatte tüpler santrifüj edilerek (1000 rpm) süpernatant atılmış ve ortama hipotonik solüsyon eklenmiştir. 37°C'de beş dakika bekletilen tüpler tekrar santrifüj edilerek pellet kısmı tespit çözeltisi ile fiske edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra kalan pelletten yayma preparatlar hazırlanmış ve giemsa ile boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (10x40) incelenmiş ve MN sayımı Countryman and Heddle (1976) tarafından belirlenen kriterlere göre binükleat hücrelerde (BNH) yapılmıştır. Ayrıca HN ekstraktlarının sitotoksik etkisinin belirlenmesi için rastgele 1000 hücre sayılarak nükleer bölünme indeksi de (NBI) hesaplanmıştır. Deney gruplarına ait sonuçlar, HN ekstraktlarının çözücüsü olan %1'lik DMSO negatif kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve istatistikî değerlendirmeler için de tek değişkenli varyans analizi (ANOVA) ile Tukey testi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Çalışma kapsamında, özellikle son yıllarda halk arasında keyif verici madde olarak kullanıldığı bilinen *H. niger* tohumlarına ait metanol ve su ekstraktlarının bileşenleri GC-MS analiz yöntemiyle tanımlanırken genotoksik etkileri de *in vitro* MN testi kullanılarak belirlenmiştir.

3.1. HN_{met} Ekstresine Ait GC-MS Analiz Sonuçları

GC-MS analizinde HN_{met}'e ait toplamda 22 farklı bileşen tespit edilmiş olup, %1'in üstünde çıkan kimyasal maddelerin sayısı 16'dır. En yüksek oranda tespit edilen maddeler; %26,361 linoleic acid, %23,749 linoelaidic acid, %8,367 cis-vaccenic acid, %7,095 oleic acid, %4,295 atropine, %4,164 olean-12-en-3-one, %3,533 (E)-24-propylidenecholesterol, %3,187 1-heptatriacontanol, %2,688 linoleic acid %2,657 β- monolinolein, %2,395 9-octadecenoic acid, %2,121 hexadecanoic acid %1,793 cetylic acid, %1,569 ethylisallocholate, %1,382 3-hydroxyspirost-8-en-11-one, %1,046 squalene'dir (Tablo 1). HN_{met}'e ait GC-MS kromatogramı da Şekil 3'de verilmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi HN_{met}'e ait, farklı % oranları ve farklı alıkonma zamanları ile stearik asit, linoelaidik asit, heksadekanoik asit, palmitik asit, oleik asit, cis-vaccenic asit ve linolenik asit gibi bileşenler bitkisel yağ asitleridir. Cetlik asit ise bir alkoldür. Tablo 1'de 22. pikde görülen 3-hydroxyspirost-8-en-11-one isimli bileşen, bir alkaloid ve sekonder metabolitlerden bir bitki toksini olarak tanımlanmıştır. Tablo 1. 15.pikte gözlenen skualen ise genotoksik etkili bir diğer sekonder metabolittir. Ayrıca HN_{met} ekstraktında bir çeşit tropan alkaloidi olan ve uyuşturucu özelliğe sahip atropin de % 4,295 oranında bulunmuştur (Tablo 1, Pik 13).



Şekil 3. HN_{mel}'e ait GC-MS kromatogramı

Tablo 1. GC-MS Analizi ile Tespit Edilen HN_{met}'e ait Bileşenler

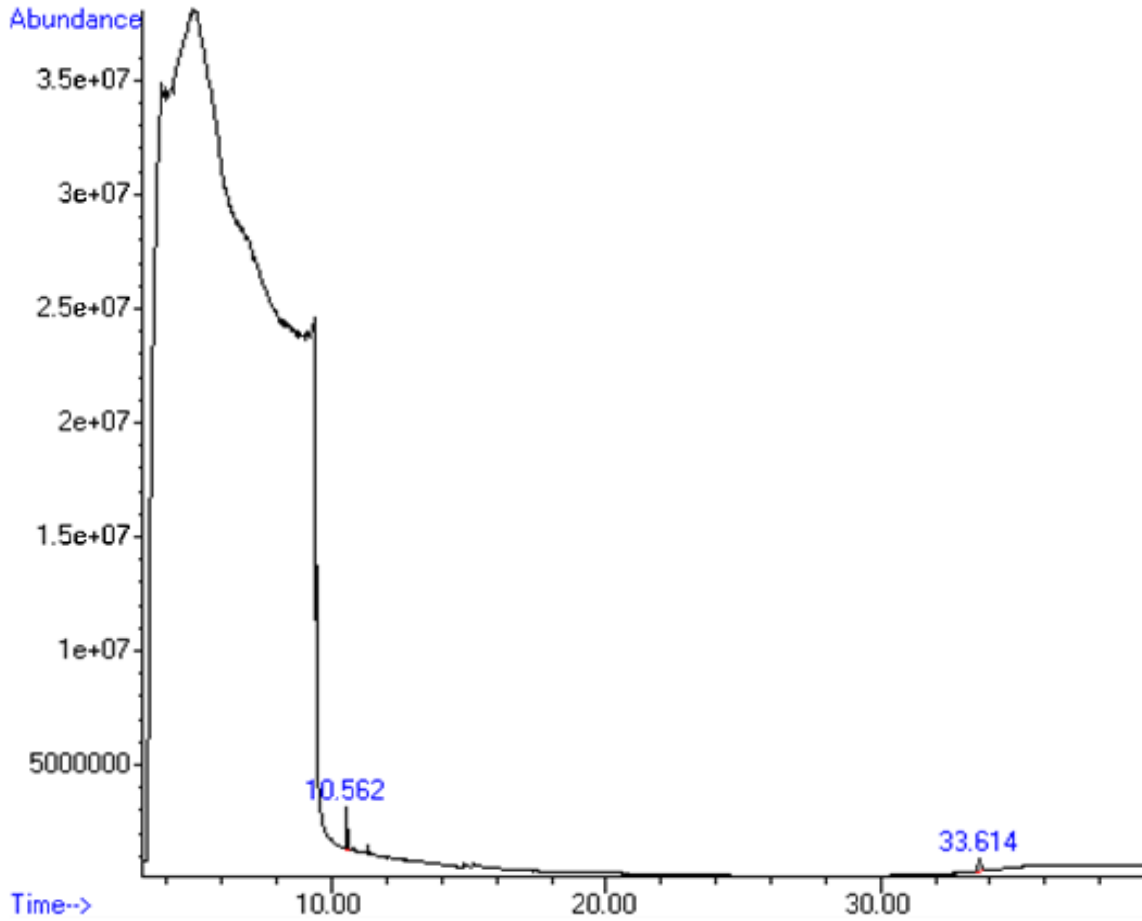
Pik	Alkonma Zamanı	% Oran	Bileşenler
1	3,593	0,509	Dimethyl sulfoxide
2	10,408	0,461	1-ethyl dodecyl trifluoroacetate
3	12,956	0,560	3-trifluoroacetoxy tetradecane
4	18,206	2,121	Hexadecanoic acid
5	19,006	1,793	Cetylic acid
6	20,932	2,688	Linoleic acid
7	21,151	26,361	Linoleic acid
8	21,221	7,095	Oleic acid
9	21,630	0,782	Stearic acid
10	22,255	23,749	Linoelaidic acid
11	22,307	8,367	Cis-vaccenic acid
12	22,577	2,395	9-octadecenoic acid
13	24,107	4,295	Atropine
14	32,344	2,657	β -monolinolein
15	33,598	1,046	Squalene
16	34,002	4,164	Olean-12-en-3-one
17	34,883	3,187	1-heptatriacontanol
18	35,718	0,747	Cedryl propylether
19	37,676	3,533	(E)-24-propylidenecholesterol
20	38,552	1,382	3-hydroxyspirost-8-en-11-one
21	38,924	1,569	Ethylisallocholate
22	39,178	0,539	3-hydroxyspirost-8-en-11-one
Toplam	-	100,00	22

3.2. HN_{su} Ekstresine Ait GC-MS Analiz Sonuçları

GC-MS analizi ile HN_{su} ekstraktında %56,849 dimethyl sulfoxide ve %43,151 trans-geraniogeraniol olmak üzere iki farklı bileşen tanımlanmıştır (Tablo 2). HN_{su}'ya ait GC-MS kromatogramı da Şekil 4'de verilmiştir. Bu ekstrakt içinde en yüksek oranda bulunan geraniogeraniol, genotoksik etkili ve sekonder metabolitlere ait bir diterpen çeşididir (Tablo 2 ve Şekil 4).

Tablo 2. GC-MS Analizi ile Tespit Edilen HN_{su}'ya ait Bileşenler

Pik	Alınma Zamanı	% Oran	Bileşenler
1	10,562	56,849	Dimethyl sulfoxide
2	33,614	43,151	Trans-Geraniogeraniol
Toplam	-	100,00	2



Şekil 4. HN_{su}'ya ait GC-MS kromatogramı.

3.3. HN_{met} Ekstresine Ait MN Sonuçları

HN_{met} uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan MN frekansına ait değerler, distile su ve DMSO negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Bu değerler distile su için $0,7 \pm 0,17$, DMSO için $0,8 \pm 0,39$ olarak bulunmuştur. Distile su ve DMSO kontrol grupları arasındaki fark önemli değildir ($p > 0,05$). Tablo 3'de görüldüğü gibi 10 ppm HN_{met} uygulamasında 1'li 5 MN sayılırken en yüksek uygulama grubu olan

40 ppm'de bu sayı 20 MN olarak belirlenmiştir. Ayrıca kontrol gruplarında ikili MN gözlenmezken tüm HN_{met} uygulama gruplarında ikili MN'de oluşmuştur (Tablo 3). HN_{met} uygulaması sonucu elde edilen MN yüzdeleri de sırasıyla 0,7±0,48; 0,9±0,10; 1,6±0,60 ve 2,4±0,20 iken bu oran DMSO kontrol grubu için 0,8±0,39 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3). HN_{met} uygulama gruplarına ait MN yüzdeleri DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sonuçlar 10 ve 20 ppm HN_{met} uygulaması için önemsizken ($p>0,05$), diğer iki uygulama grubunda (30 ve 40 ppm) doz artışına bağlı olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Elde edilen verilere göre, NBİ değerleri de hesaplanmıştır. Bu değerler, distile su ve DMSO kontrol grubu için sırasıyla 1,52±0,11 ve 1,54±0,17'dir. Distile su ve DMSO kontrol grupları arasındaki fark önemli değildir ($p>0,05$). Ancak en düşük ve en yüksek HN_{met} uygulama gruplarında (10-40ppm) 1,04±0,01 ve 1,03±0,01 olarak hesaplanan NBİ değerleri, her iki kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0,05$).

Tablo 3. HN_{met} Uygulama Gruplarına ait MN Yüzdeleri, NBİ ve İstatistiksel Analiz Sonuçları

Uygulama Grupları	Konsantrasyon	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			MN Yüzdesi	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
			1'li	2'li	3'lü		
Distile su	-	1000	7	-	-	0,7±0,17 ^b	1,52±0,11 ^a
DMSO	%1	1000	8	-	-	0,8±0,39 ^b	1,54±0,17 ^a
HN _{met}	10 ppm	1000	5	1	-	0,7±0,48 ^b	1,04±0,01 ^b
	20 ppm	1000	7	1	-	0,9±0,10 ^b	1,01±0,01 ^b
	30 ppm	1000	12	2	-	1,6±0,60 ^a	1,01±0,03 ^b
	40 ppm	1000	20	2	-	2,4±0,20 ^a	1,03±0,01 ^b

BNH: Binükleuslu hücre. (Aynı sütunda bulunan farklı harflere ait değerler arasındaki fark, DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemlidir)

3.4. HN_{su} Ekstresine Ait MN Sonuçları

Genotoksik aktivitesi araştırılan diğer bir ekstre *H. niger* tohumlarına ait su ekstresidir. HN_{su} ekstresi periferik kan kültürlerine yine 4 farklı konsantrasyonda (10-40 ppm) uygulanmıştır. Bu ekstreye ait uygulama gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak MN sayısının arttığı ve en yüksek uygulama grubu olan 40 ppm'de 1'li (16 MN) ve 2'li (5 MN) olmak üzere toplam 21 MN olduğu tespit edilmiştir. En düşük HN_{su} uygulama grubunda (10 ppm) ise toplam 11 MN sayılmıştır. Bunlardan 7 tanesi 1'li MN (Şekil 5) ve 4 tanesi 2'li MN'dir (Şekil 6). Ayrıca incelenen MN preparatlarında kontrol gruplarında 2'li MN gözlenmezken, uygulama gruplarında 2'li MN'ler 4 ve 5 tane olmak üzere her konsantrasyonda gözlenmiştir (Tablo 4). MN sayılarına göre, DMSO kontrol grubunda 0,8±0,39 olarak belirlenen %MN ise 10, 20, 30 ve 40 ppm HN_{su} uygulama gruplarında sırasıyla 1,5±0,57; 1,5±0,45; 2,0±0,49 ve 2,6±0,47 olarak hesaplanmıştır. HN_{su} uygulama gruplarına ait %MN değerleri, DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman aradaki fark 10 ve 20 ppm uygulama grupları hariç 30 ve 40 ppm için önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

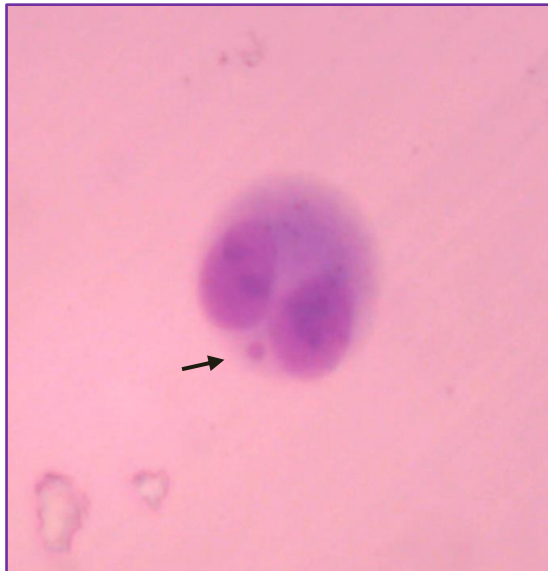
Bu uygulama grubuna ait NBİ değerleri de 10 ppm'den 40 ppm'e doğru sırasıyla 1,03±0,01; 1,03±0,01; 1,03±0,01 ve 1,03±0,02'dir. Tablo 4 incelendiği zaman HN_{su} ekstresinin konsantrasyon artışına bağlı olarak nükleer bölünmenin azaldığı da belirlenmiştir. HN_{su} uygulama grubuna ait NBİ değerleri

DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman tüm konsantrasyonlar için aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

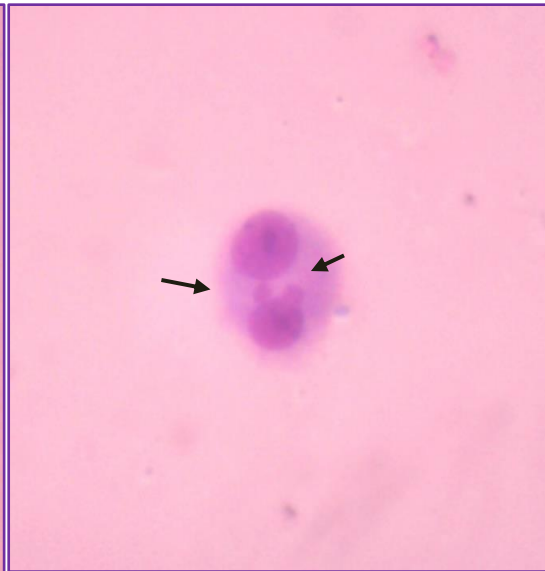
Tablo 4. HN_{su} Uygulama Gruplarına ait MN Yüzdeleri, NBİ ve İstatistiksel Analiz Sonuçları

Uygulama Grupları	Konsantrasyon	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			MN Yüzdesi	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
			1'li	2'li	3'lü		
Distile su	-	1000	7	-	-	0,7±0,17 ^c	1,52±0,11 ^a
DMSO	%1	1000	8	-	-	0,8±0,39 ^{bc}	1,54±0,17 ^a
HN _{su}	10 ppm	1000	7	4	-	1,5±0,57 ^b	1,03±0,01 ^b
	20 ppm	1000	13	1	-	1,5±0,45 ^b	1,03±0,01 ^b
	30 ppm	1000	12	4	-	2,0±0,49 ^a	1,03±0,01 ^b
	40 ppm	1000	16	5	-	2,6±0,47 ^a	1,03±0,02 ^b

BNH:Binükleuslu hücre. (Aynı sütunda bulunan farklı harflere ait değerler arasındaki fark, DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemlidir)



Şekil 5. Tek MN taşıyan binükleat hücre



Şekil 6. 2'li MN taşıyan binükleat hücre

4. SONUÇ

İnsanlık tarihi boyunca sakinleştirici özelliği ile vücudu rahatlatan, ağrı duyusunu gideren/hafifleten, uyuşukluk ile kendini iyi hissetme duygusu veren, halüsinojenik olan, halk arasında kafa yapıcı olarak da tanımlanan ve fiziksel bağımlılığa neden olabilecek özellikteki bitkiler, keyif verici madde olarak toplumda kullanılmıştır. Bitkilerin bu gibi etkilerinin yanı sıra kolay ulaşılabilir olmaları ve kullanımlarının suç unsuru oluşturulmaması, gençler arasında narkotik madde olarak kullanılmalarına da sebep olmaktadır. Bu bitkilerin bilinçsizce tüketilmesi durumunda zehirlenmeler ve ölümlerle sonuçlanan vakalara rastlanılmıştır (Erkal vd 2006; Karadaş vd 2012). Yeryüzünde yaygın olarak bulunan Solanaceae familyasının üyelerinden *H. niger*, hemen her mevsim yetişen, astım, ishal, karın ağrısı ve idrar kaçırmaya karşı geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan zehirli bir bitkidir (Yiğenoğlu 2007; Kaya et al. 2016).

Ülkemizin her bölgesinde yaygın olarak bulunan *H. niger*, içerdiği alkaloidler ile kuvvetli ağrı kesici ve uyuşturucu özellik göstermektedir. Kaya et al. (2016) tarafından bu bitkinin halk arasında teskin edici, titreme ve çarpıntı giderici, uyku kaçırıcı olarak kullanıldığı, ayrıca müshil ve kremlerin terkininde de yer aldığı bildirilmiştir. Anadolu'nun çeşitli yörelerinde diş ağrısını gidermenin yanı sıra tütsü olarak da kullanılan *H. niger* tohumları, alkaloid endüstrisi için de oldukça önemli bir bitki türü olarak bilinmektedir (Kültür Bakanlığı 1988). Bu bitki, *D. stramonium* L. (boru otu) gibi halüsinojenik etkisinden dolayı insanlar tarafından suistimal edilmeye müsaittir ve bilinmeden kullanıldığında zehirlenmelere yol açmaktadır (Kök ve Güraksın 1993). GC-MS çalışmamız sonucu *H. niger*'in tohumlarına ait su ekresinde en yüksek oranda geraniolgeraniol (%43,151) bulunduğu gözlenmiştir (Tablo 2). Bu kimyasal madde, bir çeşit diterpen alkaloid olup (Isaka et al. 2011) sekonder metabolitlerin bir çeşidi olan terpenlerin sentezi, E ve K vitaminlerinin biyosentezi gibi biyolojik reaksiyonlarda rol oynamaktadır (Nishiyama et al. 2010). Geraniolün aynı zamanda genotoksik etkili olduğu ve somatik mutasyonları uyardığı da Çelik (2020) tarafından bildirilmiştir. Yine aynı bitkinin metanol ekresinde tespit edilen atropin (%4,295) de kuvvetli bir alkaloiddir (Tablo 1). Solanaceae familyasına dahil olan *Datura metel* (hint dikenleri), *D. innoxia* (akzambak/tüylü tatula), *Scopolia carniolica* (henbane çanı), *Atropa belladonna* (güzel avrat otu) ve *Brugmansia pitteri* (melek trompet çiçeği) gibi türlerde de atropin ve bir başka tropan alkaloidi olan skopolamin diğer bileşenlere göre oldukça yüksektir (Ciechomska et al. 2019). Spina and Taddei (2007)'ye göre, halüsinojenik etkiye sebebiyet veren atropin ve skopolamin, bu familyaya ait herhangi bir türün tohumlarını oral yolla alan kişilerde önce keyif verici ve uyuşturucu etkili daha sonra ölümcül bile olabilmektedir.

Bendich (1993)'e göre, vücuda ekzojen kaynaklı serbest radikal girişi olabilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız *H. niger*'in metanol ve su ekstraktlarında bulunan ve GS-MS yöntemiyle belirlemiş olduğumuz "çeşitli tropan alkaloidleri de ekzojen serbest radikal kaynaklarıdır ve bu alkaloidler örneğin atropin, skopolamin ve nikotin (Caccetta et al. 2001) oksidatif stres yaratabilecek faktörlerdir" diyebiliriz. Vücut içerisinde oksidanların artan yoğunluğunun toksisite ve genotoksisiteye yol açarak çeşitli hasarlara neden olduğu bilimsel bir gerçektir. Meydana gelebilecek bu tür vakaların önlenmesi için vücut içerisinde doğal olarak bulunan oksidan/antioksidan sistemin antioksidanlar lehine çalışması bir diğer ifadeyle oksidan kapasitenin dengede tutulabilmesi gereklidir. Ancak vücutta oksidan maddelerin artışına dayalı olarak olası hasarların neler olabileceği ve bunların hücre, doku ve sistemler bazındaki yansımaları son yıllarda bu konu üzerinde yapılan araştırmalara ilgiyi artırmıştır. Solanaceae familyasına ait türlerde en fazla bulunan bileşiklerden birisi olan alkaloidler de oksidatif strese sebep olabilmektedir (Hassine et al 2013; Indhumathi et al 2014; Diaz 2015). Bu bileşikler insanlar da dahil olmak üzere memelilerde oldukça güçlü biyolojik aktivite gösterirler. Öyle ki, hem narkotik anlamda uyarıcı hem de alınan doza ve alım süresine bağlı olarak ölüme bile neden olabilirler. Alkaloidler, bir organizmaya nüfuz ettikten sonra Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) oluşumuna yol açarak geniş kapsamlı hücrel hasarlar ile oksidatif stres oluşturabilmektedirler (Karla et al. 1991; Chowanski et al. 2016).

Çalışmamız kapsamında *H. niger*'e ait metanol ve su ekstraktları insan lenfosit hücrelerine farklı dozlarda uygulanmıştır. 10 ppm HN_{met} uygulama grubu dışında diğer tüm uygulama gruplarında (20-40ppm) doz artışına bağlı olarak MN sayısında gözlenen artış, bu ekstraktın genetik materyalde hasara sebep olduğunu göstermektedir. Ayrıca NBİ değerlerinde gözlenen düşüş de yine bu bitkiye ait sitotoksik etkinin göstergesidir. Bu konuda yaptığımız literatür taramalarında *in vitro* çalışmalara rastlanılmamıştır. Ancak daha önce yapılan *in vivo* bir çalışmada, tıpkı *H. niger*'de olduğu gibi Solanaceae familyasına ait

ve keyif verici/narkotik özelliği olan *Nicotiana rustica* (Maraş otu) kullanıcılarından alınan kan örneklerinde de MN oluşumu gözlenmiştir (Nağaş 2006). Ayrıca yine aynı çalışmada MN oluşumunun doz-süre etkileşimine bağlı olarak artış gösterdiği de bildirilmiştir. Sunduğumuz bu *in vitro* çalışmada da hem HN_{met} (Tablo 3) hem de HN_{su} (Tablo 4) ekstraktları doz-süre etkileşimi ile MN oluşumunu artırmıştır. *H. niger* ekstraktının farklı uygulama süresi (24, 48 ve 72 saat) ve artan konsantrasyonları Hep-2 (larinks karsinoma hücresi), AMN-3 (Ahmed-Mohamed-Nahi-2003 hücre hattı) ve RD (rabdomiyosarkom/yumuşak doku tümörü) gibi kanser hücre hatlarında Ismeel (2011) tarafından sitotoksik etkili bulunmuştur. Benzeri bulgular fareler üzerinde yapılan farklı bir çalışmada da gözlenmiş ve *H. niger* ekstraktlarının fareler için de genotoksik etkili olduğu, bunun göstergesi olan MN oluşumunun konsantrasyon artışı ile pozitif korelasyon gösterdiği Ismeel (2011) tarafından ifade edilmiştir. Daha önce yapılan bu araştırmaların sonuçları bizim elde ettiğimiz sonuçlarla son derece uyumludur.

Bitkilerin faydalarının yanı sıra zararlı, tehlikeli ve öldürücü özelliklerinin bilinmesine karşın, bunların yetiştirilmesi, taşınması, alınması, satılması ve kullanılması gibi eylemlerde, haşhaş ve kenevir bitkileri dışında; adli olarak sınırlandırma, denetim, kontrol veya yasaklayıcı bir tedbir bulunmamaktadır. *H. niger* ve bunun gibi bitkilerin insanlara verdiği/verebileceği zararlar düşünüldüğünde, resmi kurumların harekete geçip yasal tedbirleri almaya başlaması son derece elzemdir.

KAYNAKLAR

- Baytop, T., 1984. Türkiye’de bitkiler ile tedavi. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, (3255), 182-183.
- Bendich, A., 1993. Symposium; antioxidants, immune response, and animal function. Journal of Dairy Science, (76), 2789-2794.
- Caccetta, R.A., Burke, V. and Mari, T.A., 2001. Red wine polyphenols, in the absence of alcohol, reduce lipid peroxidative stress in smoking subjects, Journal of Free Radical Biology and Medicine, 30(6), 636-642.
- Chowanski, S., Adamski Z., Marciniak, P., Rosinski, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Falabella, P., Scano L., Ventrella, E., Lelario F., Sabino A. and Bufo A., 2016. Review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. Journal of Toxins, 8(60), 14-28.
- Ciechomska, M., Woźniakiewicz, M., Machlowska, K., Klepacki, P. and Kościelniak, P., 2019. Differentiation of Solanaceae psychoactive plants based on GC-MS analysis supported by chemometric tools. Microchemical Journal, (150), 104098.
- Countryman, R.I. and Heddle J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. Journal of Elsevier Mutation Research, (41), 321-332.
- Çelik H., 2020. *Drosophila melanogaster*'de Doz-Süre Etkileşimine Bağlı Olarak Terpenlerin *İn Vivo* Toksik ve Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Diaz, G.J., 2015. Toxicosis by plant alkaloids in humans and animals in Colombia. Journal of Toxins. (7), 5408–5416.
- Erkal, H., Özyurt, Y. ve Arıkan, Z., 2006. Yaşlı hastada *Hyoscyamus niger* sonrası antikolinergik sendrom. Turkish Journal of Geriatrics, 9(3), 188-191.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. Journal of Mutation Research, 455(1-2), 81-95.
- Hassine, T., Mansour, A. and Hammami, S., 2013. Case report of fatal poisoning by *Nicotina tabacum* in cattle in Tunisia. Revue de Medecine Veterinaire, (164), 141-144.
- Indhumathi, T., Mohandass, S. and Shibi, A., 2014. Acute toxicity study of ethanolic extract of *Solanum incanum* L. fruit. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, (7), 98–100.
- Isaka, T., Hasegawa, M. and Toshima H., 2011. Biomimetic cyclization of epoxide precursors of indole mono-sesqui and diterpene alkaloids by lewis acids. Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 75(11),110511,1-10.

- Ismeel, A.O., 2011. Cytogenetic and Cytotoxic Studies on the Effect of Phytoinvestigated Active Compounds of *Hyoscyamus niger*. Doctoral Thesis, Biotechnology Science Institute, Baghdad.
- Karadaş, S., Güler, A., Şahin, M. ve Behçet L., 2012. 32 haftalık gebede banotu zehirlenmesi. Van Tıp Dergisi, 19(1), 36-38.
- Karla, J., Chaudhary, A.K. and Prasad, K., 1991. Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers, International Journal of Experimental Pathology, (72), 1-7
- Kaya, A., Satıl, F. and Aslan, M., 2016. Seed morphology of the genus *Hyoscyamus* L. in Turkey and its systematic significance. Journal of Acta Microscopica, 25(2), 48-55.
- Kirsch-Volders, M.K., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P., 1997. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. Mutation Research, 392(1), 19-30.
- Kök, A.N., ve Güraksın A., 1993. *Hyoscyamus Niger* (Ban Otu: Deli Bat Bat Otu) Zehirlenmesi. Adli Tıp Dergisi, 9(1-4): 91-95.
- Kültür Bakanlığı, 1988. Türk Halk Hekimliği Sempozyumu Bildirileri, Ankara.
- Nağaş, S., 2006. Maraş Otu Kullanımının MN Düzeyine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Nishiyama, Y., Iwasa, K., Okada, S., Takeuchi, S., Moriyasu, M., Kamiguchi, M., Koyama, J., Takeuchi, A., Tokuda, H., Kim, H.S., Wataya, Y., Takeda, K., Liu, Y.N., Wu, P.C., Bastow, K.F., Akiyama, T., and Lee, K.H., 2010. Geranyl derivatives of isoquinoline alkaloids show increased biological activities. Journal of Heterocycles, 81(5), 1193-1229.
- Spina, S.P. and Taddei, A., 2007. Teenagers with Jimpson weed (*Datura stramonium*) poisoning. Canadian Journal of Emergency Medicine, 9(6), 467-469.
- Spoerke, D.G., Hall, A.H., Dodson, C.D., Stermitz, F.R., Swanson, C.H. and Jr-Rumack, B.H., 1987. Mystery root ingestion. Journal Emergency Medicine, (5), 385-388.
- Yiğenoğlu, A., 2007. Eser Element Tayini ile Ban Otu Bitkisinin Yetiştigi Bölgenin Tahmini. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.