ALPHA-AMYRİN MOLEKÜLÜNÜN POTANSİYEL GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK SİTOTOKSİK VE ANTİOKSİDATİF ETKİLERİNİN *in vitro* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Gülay BULUT

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALPHA-AMYRİN MOLEKÜLÜNÜN POTANSİYEL GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK SİTOTOKSİK VE ANTİOKSİDATİF ETKİLERİNİN *in vitro* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Gülay BULUT

0009-0000-1213-563X

Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Gülay BULUT tarafından hazırlanan "ALPHA-AMYRİN MOLEKÜLÜNÜN POTANSİYEL GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK SİTOTOKSİK ve ANTİOKSİDATİF ETKİLERİNİN *in vitro* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI

Başkan : Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI İmza
0000-0002-4177-3478
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN İmza
0000-0002-5892-3735
Kırıkkale Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ İmza
0000-0002-1459-5485
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali KARA
Enstitü Müdürü
../../….

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22/01/2024

Gülay BULUT

TEZ YAYINLANMA

FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
……/…../2024

İmza
Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

Gülay BULUT
…../…/2024

İmza
Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ALPHA-AMYRİN MOLEKÜLÜNÜN POTANSİYEL GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK SİTOTOKSİK VE ANTİOKSİDATİF ETKİLERİNİN *in vitro* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Gülay BULUT

Bursa Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI

Bitkilerden elde edilen ikincil metabolitlerin kullanımı, çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle bilimsel araştırmalarda giderek daha popüler hale gelmiştir. Bu maddeler, reaktif oksijen türlerini nötralize ederek radikal hasarı önlemede ve hastalıkları tedavi etmede onları etkili kılan güçlü antioksidan özellikler sergiler. Önceki çalışmalar, bitki kaynaklarından, özellikle bitki reçinelerinden izole edilen sekonder metabolit pentasiklik triterpenoid Alpha-Amyrin'in antidiyabetik, hepatoprotektif ve antioksidatif aktivitelerini araştırmış olsa da, bunun genotoksik/antigenotoksik profili hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Bu tez, Alpha-Amyrin'in potansiyel genotoksik/antigenotoksik ve antioksidan etkilerini in vitro olarak araştırmayı amaçladı. Bu amaçla için Alpha-Amyrin'in antioksidan kapasitesi DPPH ve CUPRAC testleri kullanılarak belirlendi. Ek olarak Alfa-Amirinin genotoksik/antigenotoksik aktivitesi, insan lenfosit hücrelerinde Tek Hücreli Jel Elektroforezi (THJE, COMET) ve mikronükleus (MN) analizleri kullanılarak değerlendirildi.

DPPH testi Alpha-Amyrin için 2125 µM'lik bir IC_{50} değeri ortaya koyarken, CUPRAC testi 0,01627 µM Trolox eşdeğerliği/µM değerini gösterdi. Çalışmada 100 ve 400 µM dozda Alpha-Amyrin, genotoksik ajan olarak 500 µg/ml dozda Etil Metansülfonat (EMS) ve 10 µM dozda Paklitaksel (PAX) kullanıldı. Ayrıca EMS ve PAX ile kombinasyon halinde 400 µM Alpha-Amyrin kullanıldı. Alpha-Amyrin'in her iki dozunda da istatistiksel anlamlı bir genotoksik etki göstermediği belirlendi ($p>0,05$). Kombinasyon içeren deney gruplarında Alpha-Amyrin'in EMS tarafından indüklenen genetik hasarı düşürdüğü, PAX'ın genotoksik etkisini artırdığı gözlendi ($p>0,05$).

Anahtar Kelimeler: Genotoksisite, Alpha-Amyrin, Mikronükleus, Komet, Antigenotoksisite

2024, x + 97 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL GENOTOXIC/ANTIGENOTOXIC, CYTOTOXIC, AND ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF ALPHA-AMYRIN MOLECULE THROUGH *in vitro* METHODS

Gülay BULUT

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of General Biology

Supervisor: Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI

The use of secondary metabolites from plants has become increasingly popular in scientific research owing to their various biological activities. These substances exhibit strong antioxidant properties that make them effective in preventing radical damage and treating diseases by neutralizing reactive oxygen species. Although previous studies have investigated the antidiabetic, hepatoprotective, and antioxidative activities of the secondary metabolite pentacyclic triterpenoid Alpha-Amyrin, isolated from plant sources, particularly plant resins, limited information is available on its genotoxic/antigenotoxic profile. This thesis aimed to investigate the potential genotoxic, antigenotoxic, and antioxidant effects of Alpha-amyrin in vitro. To this end, the antioxidant capacity of Alpha-Amyrin was determined using DPPH and CUPRAC assays. Additionally, the genotoxic and antigenotoxic activity of Alpha-Amyrin was evaluated using Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE, COMET) and Micronucleus (MN) assays in human lymphocyte cells. The DPPH test revealed an IC_{50} value of 2125 µM for Alpha-Amyrin, while the CUPRAC test showed a value of 0.01627 µM (Trolox/g). In this study, 100 and 400 µM doses of Alpha-Amyrin, 500 µg/ml of Ethyl Methanesulfonate (EMS), and 10 µM of Paclitaxel (PAX) were used as genotoxic agents. Additionally, 400 µM Alpha-Amyrin was administered in combination with EMS and PAX. The results showed that single doses of genotoxic agents significantly increased the frequency of MN and the rate of DNA damage in lymphocytes. However, a non-statistically significant relative decrease in the DNA damage rates of EMS and PAX was observed in the combination dose groups.

Key words: Genotoxicity, Alpha-Amyrin, Micronuclei, Comet, Antigenotoxicity

2024, x + 97 pages.

TEŞEKKÜR

Lisans, yükseklisans öğrenim hayatım ve tez çalışmalarım süresince kıymetli bilgi, birikim ve tecrübesi ile her daim yol gösterip destek olup, sabrı ve özverisini esirgemeyen, hayata karşı bakış açısı ve duruşunu örnek aldığım, varlığıyla yoluma ışık tutup güç veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI'na

Tez projemin hayata geçirilmesi, deney sürecim ve yükseklisans öğrenim sürecim boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Araş. Gör. Dr. Mehmet SARIMAHMUT'a

Laboratuvar çalışmalarım boyunca ihtiyacım olan malzemelerin temininde yardımcı olan bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Özgür VATAN'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi, yardım ve desteklerini esirgemeyen, moral ve destekleriyle motive eden arkadaşlarım Merve DEMİRBAĞ, Dinara AKRAMOVA, Ece VARDAR ve Sude GÜNGÖR'e,

Yüksek lisans eğitimim ve çalışma hayatım boyunca her türlü nazımı çeken, çalışma saatlerimin ayarlanması ve okula devam edebilmem hususunda desteğini esirgemeyen ve her daim yanımda olan başta değerli abim Seyfi BEKTAŞ olmak üzere tüm Bursa Şevket Yılmaz Hastanesi acil laboratuvarı ekibine,

Son olarak varlıklarıyla iyi gelip güç veren başta annem olmak üzere yeğenim ve kardeşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu Tez Çalışması Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL2023-1340 proje numarası ile desteklenmiştir.

Gülay BULUT
22/01/2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……. i
ABSTRACT.....ii
TEŞEKKÜR.....iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ……1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1.Bitki Metabolitleri.....4
2.2.Terpenler 6
2.3.Terpenlerin Sınıflandırılması 6
2.4. Genetik Toksisite 12
2.5. Genetik Toksisite Testleri 14
2.5.1. Mikronükleus (MN) Testi 16
2.5.2. Komet Testi.....18
2.6. Etilmetansulfonat (EMS)….. 19
2.7. Paklitaksel 20
2.8. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....21
2.9. Antioksidanlar.....22
2.10. DPPH Testi.....23
2.11. CUPRAC Testi.....24
2.12. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite.....24
2.13. Trypan Blue ile Hücre Canlılık Testi 25
3. MATERYAL VE YÖNTEM 28
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler.....28
3.2. Alpha-Amyrin Temini.....31
3.3. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi.....31
3.3.1. DPPH Testi.....31
3.3.2. CUPRAC Testi.....32
3.4. Kültür Ortamlarının Hazırlanması 32
3.5. Kandan Lenfosit İzolasyonu.....33
3.6. Doz Seçimi ve Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi 33
3.7. Deney Gruplarının Oluşturulması.....34
3.8. Genotoksisite Testleri.....34
3.8.1. Mikronükleus Testi 34
3.8.2. Alkali Komet Testi.....36
3.9. İstatiksel Analiz.....38
4. BULGULAR.....39
4.1. DPPH Testi Sonuçları 39
4.2. CUPRAC Testi Sonuçları 39
4.3. Trypan Blue ile Hücre Canlılık Testi Sonuçları.....40
4.4. İn vitro Mikronükleus (MN) Test Sonuçları 41
4.5. Alkali Komet Testi Sonuçları.....48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 68
KAYNAKLAR 84
EKLER…… 95

ÖZGEÇMİŞ…… 97

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
CCl_4	Karbontetraklorür
CO_2	Karbondioksit
dk	Dakika
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
g	Gram
KCl	Potasyum Klorür
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
Na_2PO_4	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
O_2	Oksijen
ºC	Santigrat derece
rpm	Dakikada devir sayısı

Kısaltma	Açıklama
ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
CUPRAC	Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite
Cyt-B	Sitokalazin-B
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DXR	Doksorubisin
EMS	Etil Metansülfonat
FBS	Fetal Bovine Serum
GHİ	Genetik Hasar İndeksi
GSH	Glutatyon
HaCaT	İnsan keratinosit hücreleri
HDL-C	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
Hep2	Larenks kanser hücre hattı
HFD	Yüksek Fruktoz Diyeti
HFD	Yüksek yağlı diyet

IC_{50}	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
LMA	Low Melting Agarose
MN	Mikronükleus
NCE	Normokromatik Eritrosit
NDI	Nükleer Dıvısıon Index
NMA	Normal Erime Noktalı Agaroz
OA	Oleanolik asit
PAX	Paklitaksel
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCE	Polikromatik Eritrosit
PPAR-α	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
RNA	Ribonükleikasit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksitdismutaz
STZ	Streptozotocin
TBARS	Tiyobarbitürik asit
UA	Ursolik asit
UVB	Ultraviyole B
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
α-Amyrin	Alpha-Amyrin

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1	Alpha-Amyrin kimyasal yapısı……..	8
Şekil 2.2	Genotoksinlerin hücreler üzerindeki etkileri……..	13
Şekil 2.3	Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler…….	17
Şekil 2.4	Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu……	17
Şekil 2.5	Sağlam ve hasarlı DNA comet testi……	19
Şekil 2.6	Komet testi sonucu elde edilen görüntülerin DNA hasarına göre derecelendirilmesi…….....	19
Şekil 2.7	EMS'nin kimyasal yapısı……	20
Şekil 2.8	Paklitakselin kimyasal yapısı……	21
Şekil 4.1	Trolox (A) ve α-Amyrin (B) moleküllerinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi…….	39
Şekil 4.2	Trolox (A) ve α-Amyrin (B) moleküllerinin CUPRAC testi sonucu ölçülen antioksidan kapasiteleri…….	40
Şekil 4.3	Lenfositlerin α-Amyrin molekülüne 48 saatlik maruziyeti sonucu trypan blue boyaması ile belirlenen % hücre canlılığı…..	41
Şekil 4.4	α-Amyrin uygulaması sonucu gerçekleştirilen MN testinden elde edilen NDI oranları…….	43
Şekil 4.5	α-Amyrin uygulaması sonucu gerçekleştirilen MN testinde mononükleer hücrelerin sayımı ile elde edilen MN değerleri……	45
Şekil 4.6	α-Amyrin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen mikronükleus testinde binükleer hücrelerde gözlemlenen MN oranları……...	46
Şekil 4.7	İnsan periferal kan lenfosit hücrelerinde mikroskobik incelemelerde gözlenen mikronükleus ve hücrelerin görüntüleri...	47
Şekil 4.8	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin komet alanı oranları……..	51
Şekil 4.9	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin komet uzunluğu oranları……	52
Şekil 4.10	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin komet yoğunluğu oranları……..	54
Şekil 4.11	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin kuyruk uzunluğu oranları……	55
Şekil 4.12	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin kuyruk % DNA oranları…….	57
Şekil 4.13	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin olive kuyruk momenti oranları……	58
Şekil 4.14	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin kafa % DNA oranları……..	59
Şekil 4.15	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin kafa çapı oranları……	61
Şekil 4.16	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin L/H oranları……	62
Şekil 4.17	α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin genetik hasar indeksi oranları……..	64

Şekil 4.18 α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin hasarlı hücre yüzdesi oranları…… 66
Şekil 4.19 İnsan periferal kan lenfosit hücrelerinde hasarlı DNA varlığı ile gözlemlenen komet oluşumlarının sınıflandırılması……. 67
Şekil A.1 Etik kurul karar yazısı 1.sayfası…… 95
Şekil A.2 Etik kurul karar yazısı 2. sayfası…… 96

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.1.	Terpenlerin sınıflandırılması…….	6
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar…….....	29
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan cihazlar……...	30
Çizelge 4.1.	α-Amyrin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen MN testinde elde edilen nükleer bölünme indeksi, mikronükleus sayısal değerleri…….	42
Çizelge 4.2.	α-Amyrin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen komet testinin çeşitli paramatrelerine ait ortalama değerleri……	49
Çizelge 4.3.	α-Amyrin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen komet testinde elde edilen genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi ortalama değerleri…….	63

1. GİRİŞ

İnsanlar günlük hayatlarında çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların DNA üzerindeki zararlı etkisi ile karşılaşmaktadır. Genotoksik ajanların genetik materyal DNA üzerindeki hasar verici etkileri ile oluşturdukları mutajenik etki sonucunda doku hasarı, yaşlanma, multifaktöriyel hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle çeşitli genotoksik ajanların insan genomik DNA'sı üzerindeki hasar verici etkilerini inhibe edebilecek antigenotoksik ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalar uzun yıllardır ilgi odağı olmuştur. Bu bağlamda bitkisel kökenli doğal bileşenlerin antigenotoksik özelliklerinin belirlenmesi amacına yönelik çalışmalar yaygın olarak kullanılmaktadır.

Günlük hayatta insanların karşılaşmış olduğu çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların genomik DNA üzerindeki genotoksik etkilerinin en aza indirgenmesinde kullanılan antigenotoksik özellikteki maddelerin geliştirilip insanlarda kullanımının yaygınlaştırılmasında farklı biyosentetik özelliklere sahip bitki kökenli doğal bileşiklerin koruyucu ve önleyici potansiyellerinin belirlenmesi önemli bir çalışma alanı olmuştur.

Bitkiler tarafından sentezlenen sekonder metabolit ürünleri, bitki organlarının yapısında bulunan organik kökenli bileşiklerdir. Sekonder bitki metabolitleri, organizmanın savunma, çevresel koşullara uyum sağlamasında rol oynarlar.

Bitkilerin yaprak, gövde ve kök gibi organlarının yapısında bulunan sekonder metabolitler, çeşitli biyolojik aktivitelerinden dolayı canlıların sağlığının korunması ve sürdürülmesinde, hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan birçok çalışma bitki sekonder metabolit ürünlerinin başta serbest radikaller olmak üzere çeşitli zarar verici etkenlerin neden olduğu genetik hasarın önlenmesindeki koruyucu etkilere sahip olduklarını ortaya koymuştur.

Biyosentetik kökenlerine göre alkaloidler, terpenler ve fenolik bileşiklerden oluşan sekonder bitki metabolitleri, çeşitli biyolojik aktivitelerinden dolayı canlıların sağlığının korunması ve sürdürülmesinde, hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Terpen bileşikleri ise yapılarındaki C atomu sayısına göre de sınıflandırılmaktadır. C atomu sayısı 30 olan terpenlere "triterpenoid" olarak isimlendirilmektedir. Çeşitli bitkisel kaynaklarda bulunan bir pentasiklik triterpenoid

olan Alpha-Amyrin molekülünün antiinflamatuar, antihiperglisemik, antikanser, antioksidatif etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar olmasına rağmen, literatür bilgileri incelendiğinde insan periferal lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik, antigenotoksik etkilerinin hücresel düzeyde değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilen pentasiklik triterpenoid Alpha-Amyrin molekülünün tek başına herhangi bir genotoksik etkisinin bulunup bulunmadığının belirlenmesiyle birlikte genotoksik etkileri bilenen Etil Metansulfonat (EMS) ve Paklitaksel (PAX) ile indüklenen DNA hasarı üzerinde indirgeyici etkisinin olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Alpha-Amyrin (α-Amyrin) molekülünün genotoksik/antigenotoksik etkileri *in vitro* Mikronükleus (MN) ve Komet test yöntemleri ile araştırılmıştır. Ayrıca DPPH ve CUPRAC testleri ile Alpha-Amyrin molekülünün antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

Antik çağlardan günümüze kadar bitkiler çeşitli hastalıkların tedavi edilmesinde kullanılmakta olup tıbbi bitkilerin hastalıkların tedavisinde kullanımı 60.000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Sumner J, 2000).

18. yüzyılın sonlarındaki organik ve analitik kimya alanındaki teknik gelişmeler, bitkilerden elde edilen ilaçların hastalıkların tedavisinde kullanımını kolaylaştırarak ilaç geliştirme çalışmalarını hızlandırdı. Bu bağlamda, *Papaver somniferum* bitkisinden morfinin izolasyonu, ilaç geliştirme çalışmalarının ilk basamaklarından biri olmuştur. Sonraki yıllarda ise buna paralel olarak birçok bitkisel ilaç farmasötik kullanım amacıyla üretilmiştir (Newman ve diğerleri, 2000; Butler, 2004; Ogbonna ve diğerleri, 2012).

İnsanlar önceleri çeşitli hastalıkların etkilerini hafifletmek ve tedavi etmek için bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar ve deniz organizmaları gibi doğal ürünleri kullanmışlardır. Bu doğal ürünlerin içermiş oldukları bileşenler biyolojik aktiviteleri ile ilaç benzeri özellik göstermektedir (Yuan ve diğerleri, 2016). Hastalıkların tedavisi için bitkilerin kullanımı insan yaşamının tarihine kadar uzanmakta olup bitkilerin hastalıkların tedavisinde kullanımı oldukça önemli olmuştur (Jamshidi ve diğerleri, 2017).

Gelişmekte olan ülkelerde bitkisel ilaçlar, alternatif tıbbi tedaviler olarak kullanılır ve bu bitkilerden elde edilen fitokimyasalların çeşitli biyolojik aktiviteye sahip oldukları in vitro ve in vivo çalışmalarla belirlenmiştir (Höfling ve diğerleri, 2010).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) geleneksel tıbbi bitkileri, hastalıkların tedavisinde kullanılan en az endüstriyel işlemden geçmiş veya endüstriyel işleme tabi tutulmamış doğal bitki materyalleri olarak tanımlamaktadır. Geleneksel bitkisel tıp doğal olması, nispeten daha az komplikasyon oluşturması nedeniyle binlerce yıldır kullanılmaktadır (Jamshidi ve diğerleri, 2017).

Bitkilerin içermiş oldukları doğal maddeler olan fitokimyasallar ilaç geliştirme alanında bitki temelli ilaçların üretiminde kaynak olarak kullanılan moleküllerdir. Fitokimyasallar tıbbi ve aromatik bitkilerde, sebze ve meyvelerde, bitkilerin kök, yaprak ve çiçeklerinde bulunurlar. İnsanların tükettiği temel besin kaynağı olmayan fitokimyasallar, bitkilere tat, renk ve aroma veren doğal bileşiklerdir (Vasanthi ve diğerleri, 2012).

Bitkiler tarafından sentezlenen fitokimyasallar bitkiye tat, koku, renk ve aroma veren savunma mekanizmalarında rol oynayan primer ve sekonder metabolitlerdir. Fitokimyasallar hastalıklara karşı koruyucu özellikleri olan bitki bileşenleridir (Budisan ve diğerleri, 2017).

Bitkilerin fitokimyasalları korunma ve savunma için ürettiği bilinmekte olup yapılan çalışmalar aynı zamanda bu bileşenlerin insanlarda hastalıkların önlenmesinde koruyucu etkiye sahip olduklarını göstermiştir. Fitokimyasalların ve türevlerinin antioksidan, antiinflamatuar ve antiproliferatif aktivite gibi biyolojik özellikleri ile insan sağlığının korunması ve hastalıkların tedavi edilmesinde kullanılan faydalı bileşenler oldukları çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir (Iqbal ve diğerleri, 2019).

Son zamanlarda antikanser ve kemoprotektif etki özellikleri ile kanser tedavisinde fitokimyasallar yaygın olarak kullanılmaktadır. Şifalı bitkiler ve içermiş oldukları fitokimyasalların kanser tedavilerinin yan etkilerini azalttığı tümör oluşumu ve büyümesinin önlenmesinde rol oynadıkları çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Premalatha ve Rajgopal, 2005). Bunun yanısıra bitki dünyasında fitokimyasalların DNA hasarına karşı koruma sağladığını gösteren güçlü fitoantimutajenlerin varlığının ortaya konduğu çok sayıda çalışma yapılmıştır (De Flora ve Ferguson, 2005; Ferguson ve diğerleri 2004).

2.1. Bitki Metabolitleri

Bitkisel bileşenler, primer ve sekonder metabolit ürünlerini içeren iki ana gruba ayrılır. Protein, karbonhidrat, yağ, vitamin gibi primer metabolitler, canlıların büyüme ve üreme gibi temel yaşamsal faaliyetlerinde rol oynarlar. Öte yandan, çeşitli biyosentetik yollarla primer metabolitlerden üretilen fenolik bileşikler, terpenler, steroidler, alkaloidler, kükürtlü bileşikler gibi sınıflandırılan sekonder metabolitler, canlıların temel yaşam fonksiyonları ile doğrudan ilişkilendirilmeyen biyolojik faaliyetlerde görev alırlar. Sekonder metabolitlerin canlıların temel yaşamsal fonksiyonları üzerinde doğrudan bir etkisi olmasa da, sağlığın korunmasında önemli işlevlere sahiptirler. Ayrıca, günümüzde sekonder metabolitler birçok sektörde hammadde olarak kullanılmaktadır. (Babaoğlu ve diğerleri, 2001).

Sekonder metabolitler, bitkilerin temel yaşamsal faaliyetleri üzerinde, özellikle zararlı organizmalar, yabancı otlar ve hastalıklara karşı korunma, olumsuz çevresel koşullara uyum sağlama gibi önemli işlevlerle, primer metabolitler kadar kritik bir rol oynamaktadırlar. Bu koruyucu özellikleri ile sekonder metabolitler, bitkilerin hayatta kalmasını ve üremesini sağlayarak ekosistemde dengeyi sürdürmelerine katkıda bulunur. Bu nedenle, sekonder metabolitler, bitkilerin genel sağlığını ve direncini artırarak ekolojik açıdan önemli bir rol oynarlar (Tiring ve diğerleri, 2021).

Biyoaktif özellikte bileşikler olan sekonder metabolitler tıp ve eczacılık alanında kullanılmalarının yanı sıra besin takviyesi ve gıda bileşeni olarak kullanılıyor olmaları dolayısıyla da önemlidirler (Güven ve Gürsu, 2014).

Sekonder bitki metabolitleri, endüstriyel alanlarda boya, elyaf, tutkal, yağ, aroma, parfüm ve ilaçların içeriğinde kullanılmaktadır. Ayrıca, bu metabolitler, sahip oldukları çeşitli biyolojik özelliklerle ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sağlamaktadırlar (Zinkel ve Russell, 1989).

Son yıllarda dünya genelinde etkili olan koronavirüs pandemisi üzerine yapılan çalışmalarda, sekonder metabolitlerin koronavirüs proteaz enzim sistemindeki amino asitlerle etkileşime girebilme yeteneği sayesinde proteaz enzimini inhibe edebileceği belirlenmiştir. Bu bulgular, bu bileşiklerin kullanımının önemini arttırmış ve potansiyel olarak virüsle mücadelede tedavi veya koruma stratejilerinde kullanılabilecekleri konusunda araştırmalara ilgi çekmiştir (Mohammadi ve Shaghaghi, 2020).

Günümüzde sekonder metabolitlerin ilaç yapımında kullanılan bazı türlerinin antiinflamatuar, hipoglisemik, hipolipidemik, antioksidan aktivite, trombozis ve kansere karşı koruyucu etki gösterdikleri belirtilmektedir. Sekonder bileşiklerin sahip oldukları bu biyolojik özelliklerinden dolayı kanser, diyabet, obezite, metabolik sendrom, dislipidemi ve kalp damar hastalıklarına karşı koruyucu olabileceği düşünülmektedir (Ülger ve diğerleri, 2020).

Bitkilerin savunma, dayanıklılık ve çevresel koşullara adaptasyonunda, endüstri alanında, tıp ve sağlık alanında hastalıkların tedavi edilmesinde önemli bir rol oynayan bitki sekonder metabolitleri, genellikle kökenlerine göre terpenler, fenolik bileşikler ve alkaloidler olarak sınıflandırılmaktadır (Tiring ve diğerleri, 2021).

2.2. Terpenler

Terpenlerin genel yapı formülleri $C_{10}H_{16}$ şeklindedir. Reçinenin ana bileşeni olan terpenler aromatik özelliklerinden dolayı yaygın kullanım alanına sahip olmakla birlikte geleneksel ilaç tedavilerinde de kullanılmaktadırlar. Halkalı ya da açık zincir yapısında olan çeşitli fonksiyonel grup içeren 20.000'den fazla terpen yapısı olduğu bilinmektedir. Bitki dokularında genellikle serbest olarak bulunan terpenler organik asit esterleri ya da glikozitleri şeklinde veya proteinlerle birleşik halinde bulunmaktadırlar (Anonim, 2006).

2.3. Terpenlerin Sınıflandırılması

Terpenlerin biyosentezleri izopren birimlerinin sentezi yoluyla gerçekleşmektedir. Terpen bileşikleri yapılarındaki C atomu sayısına göre de sınıflandırılmaktadır. İçermiş oldukları karbon sayılarına göre hemiterpen, monoterpen, seskiterpen, diterpen, sesterpen, triterpen, tetraterpen ve politerpen olarak adlandırılmaktadırlar. Yapısında oksijen içeren terpenler ise terpenoid olarak tanımlanmaktadır. Karbon atomu sayısı 30 olan terpenler "triterpenoid" olarak isimlendirilmektedir. Triterpenler $C_{30}H_{48}$ molekül formülüne sahiptir ve altı izopren biriminin birleşmesiyle oluşurlar (Finar ve diğerleri, 1975).

Çizelge 2.1. Terpenlerin sınıflandırılması

İzopren Sayısı	C (Karbon) Sayısı	Sınıfı
1	5	Hemiterpen
2	10	Monoterpen
3	15	Seskiterpen
4	20	Diterpen
5	25	Sesterpen
6	30	Triterpen
8	40	Tetraterpen
N	$(5)_n$	Politerpen

Triterpenler, özellikle bitkilerde bulunan bir doğal ürün sınıfıdır. Triterpen asitler, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antiviral, sitotoksik ve kardiyovasküler etkiler dahil olmak üzere önemli biyolojik ve farmakolojik aktiviteler sergiler (Silva ve diğerleri, 2012).

Triterpenler, 20.000'den fazla üyesi olan ve pentasiklik triterpenlerin tıbbi açıdan önemli bir kategori olduğu büyük bir kimyasallar grubudur (Sheng ve Sun, 2011). Triterpenler halka sayıları ve taşımış oldukları fonksiyonel gruba göre sınıflandırılır. Halka sayılarına göre triterpenler trisiklik, tetrasiklik ve pentasiklik triterpenler olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar (Finar ve diğerleri, 1975).

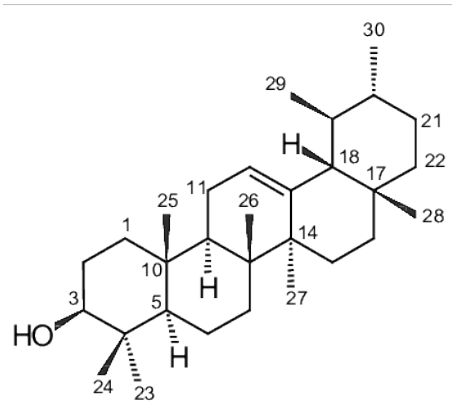
Pentasiklik triterpenler, çoğunlukla huş ağacı kabuğu, çınar kabuğu, zeytin yaprağı, zeytin posası, ökse otu filizi, karanfil çiçeği, elma posası ve biberiye yaprağı gibi çeşitli bitkilerin meyve kabuklarının, yapraklarının, gövdesinin ve dış kabuğunun kütikül katmanlarında bulunan ikincil metabolitleridir (Jäger ve diğerleri, 2009, Szakiel ve diğerleri, 2012).

Bitkiler aleminde bol miktarda bulunan Pentasiklik triterpenler, anti-inflamatuar, antitümör ve antimikrobiyal özellikleri ile bilinmektedirler. Yüksek karbonhidrat-yüksek yağ ile beslenen metabolik sendrom modellerinde, pentasiklik triterpenlerin, anti-inflamatuar, antioksidan, antiadipozite ve kardiyoprotektif etki de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonlar gösterdikleri belirlenmiştir (Rao ve diğerleri, 2011; Sil ve diğerleri, 2013, 2015; Pakdeechote ve diğerleri, 2014; Maneesai ve diğerleri, 2016; Prabhakar ve diğerleri, 2017;). Bunun yanısıra, son zamanlarda pentasiklik triterpenlerin antikanser potansiyellerinin değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır (Bishayee ve diğerleri, 2011; Liby ve Sporn, 2012; Parikh ve diğerleri, 2014; Shanmugam ve diğerleri, 2014; Žiberna ve diğerleri, 2017).

Özellikle bitki reçineleri gibi doğal kökenli çeşitli kaynaklardan izole edilen pentasiklik triterpen α-Amyrin yaygın olarak Burseraceae familyasının *Bursera* ve *Protium* türlerinin (*P. heptaphyllum, P. kleinii*) reçinelerinde önemli miktarlarda (g/kg'a kadar) bulunmaktadır.

α-Amyrin ayrıca, Meksika kopal (5 g/kg) (Hernández-Vázquez, ve diğerleri, 2010), *Cassia obtusifolia* (140 mg/kg) (Sob ve diğerleri, 2010), *Commiphora holtziana*'nın reçinesi (200 mg/kg) (Manguro ve diğerleri, 2009), *Ficus racemosa, Alstonia boonei*, (Narender ve diğerleri, 2009; Okoye ve diğerleri, 2014; Singh ve diğerleri, 2015), *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), *Carmona retusa* (Boraginaceae) gibi çeşitli bitkilerde bulunan fitobileşendir.

Pentasiklik triterpen bileşiklerinin ursane sınıfına ait olan Alpha - Amyrin'in kimyasal formülü $C_{30}H_{50}O$, erime noktası ise 184-186 °C'dir (Hernández-Vázquez ve diğerleri, 2010). Alpha-Amyrin'in kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Alpha-Amyrin kimyasal yapısı (Santos ve diğerleri, 2012)

Alpha-Amyrin izole triterpenler arasında son yıllarda antinosiseptif özelliği başta olmak üzere hepatoprotektif, antihiperglisemik, antiinflamatuar ve topikal antiinflamatuar aktivite gibi çoklu farmakolojik etkileri nedeniyle oldukça ilgi çekmiştir. Alpha-Amyrin'in antidiyabetik (Singh ve diğerleri, 2009; Santos ve diğerleri, 2012), antidislipidemik (Santos ve diğerleri, 2012), antioksidan (Holanda ve diğerleri, 2008), hepatoprotektif (Oliveria ve diğerleri, 2005) ve antiinflamatuar (Holanda ve diğerleri, 2008) etkiler gibi biyolojik özelliklerinin belirlendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Yüksek fruktoz diyetiyle (HFD) beslenen sıçanlarda meydana gelen metabolik sendrom üzerinde Alpha-Amyrin'in etkilerinin incelenmiş olduğu bir çalışmada, erkek wistar sıçanları rastgele olarak farklı gruplara dağıtılarak kontrol grubu normal sıçan diyeti ile beslenmiştir. HFD grubuna ise 42 gün boyunca % 60 fruktoz içeren yüksek fruktoz (HFD) diyeti uygulanmıştır. Antidiyabetik olarak Pioglitazon (10 mg/kg, oral, günde bir kez)

kullanılmıştır. Alpha-Amyrin ise üç doz halinde (50, 100 ve 200 mg/kg, oral) HFD ile beraber günde bir kez olacak şekilde uygulanmıştır. Uygulama süresinin sonunda plazma glukoz, trigliserid, HDL-C seviyeleri, kan basıncındaki değişiklikler, oral glukoz ve insülin toleransı ölçülerek karaciğerde hepatik oksidatif stresin yanı sıra PPAR-α'nın mRNA ve protein seviyeleri de analiz edilmiştir. Kontrol sıçanlarıyla karşılaştırıldığında HFD sıçanlarında sistolik kan basıncı, plazma glukozu, toplam kolesterol ve plazma trigliseritlerinde belirgin bir artış HDL-C'de ise belirgin bir azalma gözlenirken, glukoz toleransı ve insülin toleransının HFD ile belirgin bir şekilde bozulduğu görülmüştür. Alpha-Amyrin'in ise doza bağlı olarak HFD' nin neden olduğu metabolik değişiklikleri, bozulmuş glukoz ve insülin toleransını, karaciğerdeki oksidatif stresi, mikro ve makroveziküler yağ değişikliklerini azalttığı ve bunun yanında HFD grubunda azalan karaciğer PPAR-α ve mRNA protein seviyelerini koruduğu görülmüştür. Çalışmadan elde edilen tüm bulgular doğrultusunda ise Alpha-Amyrin'in HFD tarafından indüklenen metabolik sendromda önleyici bir role sahip olabileceği önerilmiştir (Prabhakar ve diğerleri, 2017).

Wistar albino sıçanlarında hepatik oksidatif strese karşı Alpha-Amyrin'in hepatomodülatör potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada (Singh ve diğerleri, 2015), bu molekülün P-450 aracılı CCl_4 biyoaktivasyonunu bloke etme kabiliyeti olduğu ve bunu hidrojen peroksit, süper oksit, hidroksil radikali gibi serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu oluşumunun önemli ölçüde engellenmesi yoluyla sağlandığı belirlenmiş; sıçanların hepatik biyokimyasal parametreler açısından neredeyse normal seviyelere ulaşması nedeniyle Alpha-Amyrin'in karaciğer iyileştirici güçlü bir ilaç adayı olarak değerlendirilmesi önerilmiştir.

Amyrin'ler ilgi çekici farmakolojik potansiyele sahip triterpenler olmalarına rağmen suda düşük çözünürlükleri ve düzensiz mide absorpsiyonları bir dezavantaj olarak ortaya çıkmaktadır. Alpha-Amyrin'in bağırsak absorpsiyonunu arttırmak amacıyla Alpha-Amyrin yüklü nanokapsül geliştirilerek lösemi hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bununla birlikte Alpha-Amyrin yüklü nanokapsüllerin insan özel lösemi hücre hattı Kasumi-1 üzerinde seçici bir sitotoksik etki gösterdiği ve apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular Alpha-Amyrin yüklü nanokapsüllerin lösemi tedavisinde kullanılabilecek umut verici terapötik ilaç olabileceğini düşündürmüştür (Neto ve diğerleri, 2021).

Alpha-Amyrin bileşiğinin insan larenks kanser hücre hattı Hep2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif, sitotoksik ve antioksidan aktivitesinin değerlendirilmiş olduğu bir çalışmada Alpha-Amyrin'in 10, 20, 40, 80,160 ve 320 µ mol/ml dozlarında IC_{50} değerinin 69.32 µ mol/ml olduğu belirlenmiştir. Sitotoksite testi bulgularına göre Alpha-Amyrin'in Hep2 hücre hatlarının proliferasyonunu IC_{50}: 69.32 µmol/ml değeri ile inhibe ettiği görülmüştür. Çalışmadan elde edilen bulgular Hep2 hücre hatları üzerinde yüksek bir inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca Alpha-Amyrin ile tedavi edilen Hep2 hücrelerinde, tedavi edilmemiş Hep2 kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında lipid peroksidasyon belirleyicilerinden biri olan TBARS' ın seviyeleri kanser hücrelerinde önemli ölçüde azalmışken, Alpha-Amyrin ile tedavi edilen Hep2 hücrelerinde belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. Çalışmadan elde edilen bulgulara dayanarak, Alpha-Amyrin'in Hep2 hücrelerinde hem sitotoksisiteyi hem de oksidan-antioksidan değişiklikleri indükleyerek antiproliferatif etki göstermesi nedeniyle Alpha-Amyrin'in çeşitli kanser türleri üzerinde terapötik potansiyele sahip olabileceği önerilmiştir (Mirunalini ve diğerleri, 2016).

Benzer şekilde, Alpha ve Beta-Amyrin triterpenlerinin promyelositik lösemi, glioblastoma, kolon kanseri, meme kanseri, kolorektal ve pankreas adenokarsinomu, karaciğer, akciğer, prostat ve renal karsinom dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarına karşın sitotoksik etkilerinin belirlenmiş olduğu çalışmalar bulunmaktadır (Barros ve diğerleri, 2011; Mishra ve diğerleri, 2016). Alpha ve Beta-Amyrin karışımının HL60 promyelositik hücre hattı için IC_{50} değeri 0,94 µg/ml (Barros ve diğerleri, 2011), Beta-Amyrin'in sitotoksik aktivitesinin MCF-7 meme kanseri hücre hattı için IC_{50} değeri 3,56± 0,68 µg/ml'dir (Mishra ve diğerleri, 2016). Her iki çalışmadan elde edilen bulgular, Alpha ve Beta-Amyrin'in karışımı ve tek başına Beta-Amyrin'in apoptozun aracılık ettiği zayıf ve seçici antitümör aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir.

Tıbbi bitkilerde yaygın olarak bulunan amyrin bileşikleri (α-Amyrin ve β-Amyrin) çeşitli biyoaktif özelliklere sahiptirler. α/β Amyrin triterpen karışımının analjezik, antimikrobiyal, antiinflamatuar özellikler dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyona sahip olduğu çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir (Hernández-Vázquez ve diğerleri, 2010).

Protium heptaphyllum (Aubl.) March' ın ağaç gövde reçinesinden izole edilen triterpen karışımı olan α ve β-Amyrin'in farelerde Asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerinin değerlendirilmiş olduğu bir çalışmada, karaciğer hasarı serum enzim aktivitelerinin ölçülmesi ve histopatolojik gözlemlerle analiz edilmiştir. Farelerde, Asetaminofen (500 mg/kg, p.o.), inflamatuar hücre infiltrasyonu ile birlikte sentrilobüler nekroz ile karakterize fulminan karaciğer hasarına, serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktivitelerinde artışa, hepatik glutatyonda (GSH) azalmaya ve %50 ölüm oranına neden olmuştur. α ve β-Amyrin (50 ve 100 mg/kg, i.p., Asetaminofenden 48, 24 ve 2 saat önce) ile ön tedavinin, ALT ve AST aktivitelerinde Asetaminofenle indüklenen akut artışı hafiflettiği, tükenmiş hepatik glutatyonun yenilenmesini sağladığı ve histopatolojik değişiklikleri önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Çalışma bulguları oksidatif stres ve toksik metabolit oluşumunun azaltılması yoluyla α ve β-Amyrin'in toksik karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Oliveira ve diğerleri, 2005).

Pentasiklik triterpenlerin genellikle metabolik bozukluklarda yararlı etkiler gösterdikleri bilinmektedir. *Protium heptaphyllum* reçinesinden elde edilen bir pentasiklik triterpen karışımı olan α, β-Amyrin karışımının normal ve Streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik farelerde ve yüksek yağlı diyetle (HFD) beslenen farelerde kan şekeri düzeyi ve lipid profili üzerindeki etkileri araştırılmıştır. α, β-Amyrin karışımı (10, 30 ve 100 mg/kg, oral) veya Glibenklamid (10 mg/kg, oral) ile tedavi edilen farelerde, STZ tarafından tetiklenen kan glukozu, toplam kolesterol ve serum trigliserit seviyelerinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir. Glibenklamid, normoglisemik farelerde kan glukozu, toplam kolesterol ve serum trigliseritlerde önemli ölçüde azalmalar gösterirken, α, β-Amyrin karışımının normal kan şeker seviyelerini düşürmediği ancak 100 mg/kg dozunda hipolipidemik bir etki sergilediği görülmüştür. Ayrıca, α, β-Amyrin karışımının oral glukoz tolerans testi sırasında yükselmiş plazma glukoz seviyelerini belirgin bir şekilde azalttığı görülmüştür. Plazma insülin seviyesi ve pankreasın histopatolojik analiz sonuçları, α, β-Amyrin karışımının beta hücre bütünlüğünün korunmasındaki olumlu etkisini göstermiştir.

α, β-Amyrin karışımı (10, 30 ve 100 mg/kg) veya Fenofibrat (200 mg/kg) ile oral olarak tedavi edilen farelerde, yüksek yağ içeren diyetle ilişkili olarak serum toplam kolesterol ve trigliserit seviyelerinde görülen artışın önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulguların α,β-Amyrin karışımının potansiyel antihiperglisemik ve hipolipidemik etkilerini yansıttığı ve bu bileşiğin diyabet ve aterosklerozda etkili bir ilaç geliştirme adayı olabileceğini düşündürmüştür (Santos ve diğerleri, 2012).

2.4. Genetik Toksisite

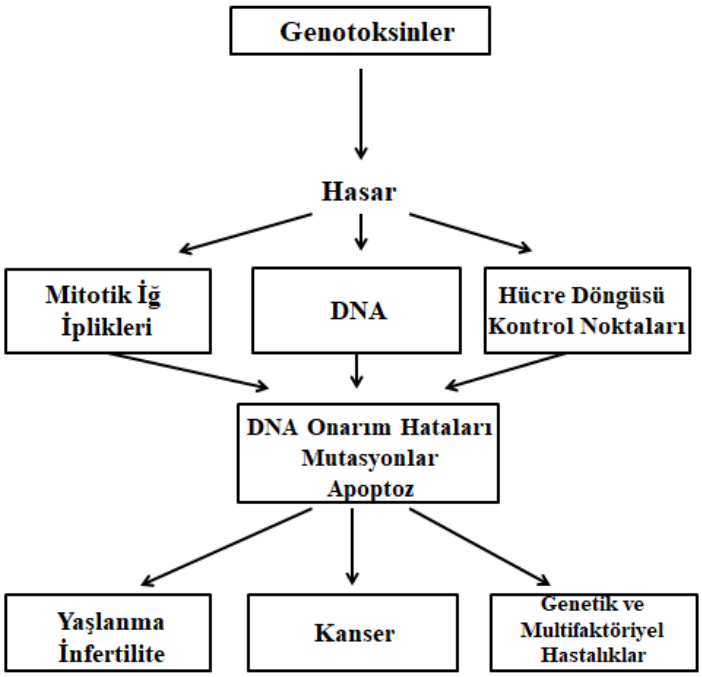
Genetik toksikoloji, organizmanın biyolojik işleyişi sırasında çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlerin DNA molekülünde meydana getirdiği değişiklikleri inceleyen bir bilim dalıdır. Bu disiplin, çeşitli zararlı etkenlerin sebep olduğu genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir rol oynar (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Genetik toksikoloji çalışmalarında, DNA molekülündeki değişiklikler incelenerek çeşitli mutajenik ajanların neden olduğu genetik hasar değerlendirilmektedir. Genotoksisite, çekirdek, kromozom ve DNA'da genotoksik ajanların hasar verici etkileriyle meydana gelen DNA kırık ve eklentilerini, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir.

Genotoksik maddeler, DNA'nın kopyasının çıkarılmasında rol oynayan enzimlerle etkileşime girip mutasyona neden olabilirler ve bu değişikliklere genotoksik etki denir. Genotoksisite çalışmaları, potansiyel sağlık risklerini değerlendirmek ve çeşitli maddelerin genetik materyale olan etkilerini anlamak amacıyla yapılır (Zeiger ve Errol 2004).

Kalıtsal materyal olan DNA molekülünde mutasyona neden olan çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar, DNA'ya doğrudan veya genetik şifreye uygun olarak sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yoldan hasar verici etkilere yol açabilirler (Mateuca ve diğerleri, 2006).

Genotoksinler, DNA veya kromozom yapısında mutasyon oluşturan fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlardır. Genotoksinlerin neden olduğu somatik hücrelerdeki DNA hasarı sonucu oluşan mutasyonlar, başta kanser olmak üzere doku hasarı, yaşlanma, infertilite ve çeşitli genetik ve multifaktöriyel hastalıklara neden olabilmektedir (Mohamed ve diğerleri, 2017). Şekil 2.2'de genotoksinlerin hücreler üzerindeki etkileri verilmiştir.



Şekil 2.2. Genotoksinlerin hücreler üzerindeki etkileri (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011)

Genetik materyal DNA endojen ve eksojen kaynaklı birçok ajanın tehdidi altındadır. Eksojen kaynaklı ajanlar olarak bilerek ya da bilmeden maruz kaldığımız fiziksel ve kimyasal etkenleri sayabiliriz. Endojen kaynaklı ajanlar olarak ise vücudumuzdaki birçok metabolik faaliyet sonrasında ya da sırasında oluşan hücrede DNA gibi birçok makromoleküle zarar verebilen Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species; ROS) sayılabilir (Evans ve Cooke 2004).

Genetik materyal DNA molekülü üzerinde hasar verici etkileriyle mutasyonlara neden olan çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenler mutajen olarak tanımlanmaktadır. Genotoksik etkili maddelerin DNA molekülü ve genom üzerindeki hasar verici etkilerini önleyen ya da hasar oluştuktan sonra ortadan kaldıran doğal ya da sentetik bileşenleri içeren maddeler antigenotoksik ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Antigenotoksik ajanlar aynı zamanda kendiliğinden meydana gelen veya indüklenmiş mutasyonların sıklığını ve oranını azaltma yeteneğine sahip olmalarının yanında sağlıklı bir insan vücudundaki hücre içi ve hücre dışı çeşitli koruma mekanizmalarını harekete geçirerek kanser oluşumu ve tümör büyümesini önleyebilmektedirler (Słoczyńska ve diğerleri, 2014).

Antimutajenler biyoantimutajenler (gerçek antimutajenler) ve desmutajenler olarak sınıflandırılmaktadır. Hücre dışında görev alan desmutajenler mutajenik ajanların DNA'ya ulaşmadan inaktive edilmesinde, biyoantimutajenler ise DNA hasarı sonrası hücre içerisinde mutasyonun baskılanmasında rol oynamaktadır (Kada ve Shiomi, 1987).

Antigenotoksik ajanlar, hücre dışında mutajen alımını engelleme, bağırsak florasının modifikasyonu ve koruyucu özellikteki maddelerin emilimini arttırma mekanizmalarıyla etkilerini gösterebilirler. Aynı zamanda, hücre içindeki etkilerini detoksifikasyonun uyarılması, zardan madde geçişinin önlenmesi, detoksifikasyon metabolizmasının regülasyonu, DNA metabolizmasının onarımı ve modülasyonu, sinyal yolaklarının düzenlenmesi, apoptozun uyarılması ve genomik stabilitenin sağlanması mekanizmalarıyla gerçekleştirerek çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların DNA molekülü üzerindeki hasar verici etkilerini inhibe edebilirler. Bu etkiler, genotoksinlere maruz kalan hücrelerde genetik hasarı azaltmaya yönelik koruyucu bir etki gösterir (De Flora ve Ferguson, 2005; Słoczyńska ve diğerleri, 2014).

2.5. Genetik Toksisite Testleri

Sanayileşmedeki hızlı ilerleme, çevre kirliliğine neden olarak zaman içinde canlıların, özellikle insanların, fiziksel ve kimyasal etkenlere sıklıkla maruziyetine yol açmıştır. Bu durum, çeşitli zararlı maddelerin canlı organizmalar üzerindeki etkilerinin araştırılması alanında büyük bir öneme sahiptir. Karsinojenik, toksik, mutajenik ve teratojenik etkili ajanların zararlı etkilerinin belirlenmesi ve önleyici önlemler alınması oldukça önemlidir. Başta pestisitler olmak üzere birçok kimyasalın insan vücuduna doğrudan ya da dolaylı yoldan girerek insan sağlığını etkilemesi genetik materyal DNA molekülü üzerinde potansiyel tehlike oluşturmaktadır (Ribas ve diğerleri, 1996).

Kimyasal maddelerin yaygın kullanımı, doğrudan veya metabolik ürünleri aracılığıyla oluşturdukları toksik etkilerle insan ve hayvanlarda zehirlenmelere neden olabilir. Bu toksik etkiler, yabani yaşam ve faydalı canlı gruplarını etkileyerek ekosistemde denge bozulmasına yol açabilir. Ayrıca, hava, su, toprak ve gıdalardaki ilaç artıkları, zararlı duruma gelen bazı canlılar ve bu zararlı canlıların bağışıklık edinmesi sonucu ortaya çıkan olumsuz etkilerle birlikte çevre kirliliğine sebep olabilir (Bora ve Delen, 1981; Sezginer ve Dane, 2015).

Karsinojenite ve genotoksisite arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik yapılan pek çok çalışma, insanlar için karsinojenik olan birçok bileşiğin aynı zamanda genotoksik özellikte olduğunu göstermiştir. Kimyasalların mutajenik özellikleri ile kanser oluşturma potansiyelleri arasında güçlü bir bağlantının olduğunun belirlenmesi, genotoksisite testlerinin çeşitli kimyasal maddelerin karsinojenik özelliklerinin tespitinde tarama amaçlı kullanımlarının yolunu açmıştır (Mavournin ve diğerleri, 1990).

Genotoksisite testleri, 1970'li yıllardan bu yana çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bu testler, esas olarak genomu etkileyebilen fiziksel etkenlerin (UV, radyasyon gibi), parazitik enfeksiyonların, sigara, pestisit ve nanoparçacıklar gibi çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik ve karsinojenik özelliklerini belirlemede önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, bu testler ilaçların piyasaya sürülmeden önce ve ilaç kullanan bireylerdeki güvenilirliğinin araştırılmasında kullanılır. Genotoksisite testleri aynı zamanda bazı hastalıklarda DNA hasarının saptanmasında kullanılır. Bu testler, kanserden korunma, kansere duyarlılığın tespiti ve takibinin yapılmasında biyoizlem testleri olarak da değerlendirilmektedir (Rama ve diğerleri, 2002).

Genotoksisite testleri, direkt ya da indirekt olarak çeşitli mekanizmalarla genetik materyalde oluşan hasarların tespitinde kullanılmak üzere geliştirilen in vitro (hücre dışında) ve in vivo (canlı organizmada) test yöntemlerini içermektedir. Genetik toksikolojinin başlıca amaçları genotoksisite testleri ile mutajenik özellikteki maddelerin tanımlanması, insanlarda risk analizinin yapılarak bu maddelere gereksiz maruziyetinin önlenmesidir. Kısa süreli genotoksisite testleri tarama amacıyla kullanılırken, memeli testleri insanlarda risk analizinin tespitinde kullanılmaktadır (Atlı Şekeroğlu, ve Şekeroğlu 2011).

İn vitro genotoksisite test yöntemleri çeşitli kimyasal maddelerin DNA molekülü ve genom üzerideki hasar verici etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Genotoksisite testleri kimyasalların DNA ve genom üzerindeki etkileri ile kimyasal karsinojenezis arasındaki ilişkinin gözlenmesini sağlamaktadır (Sezginer ve diğerleri, 2015).

Genotoksik ve karsinojenik özellikleri test edilmek istenen maddelerin genom ve DNA üzerinde hasar verici potansiyellerinin belirlenerek genetik sistemler ile aralarında ilişki kurulmasının sağlanmasında in vitro ve in vivo genotoksisite testleri kullanılmaktadır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Bu çalışma kapsamında insan periferal lenfosit hücreleri üzerinde *in vitro* Mikronükleus (MN) ve *in vitro* Komet testleri ile genotoksik etki değerlendirilmiştir.

2.5.1. Mikronükleus (MN) Testi

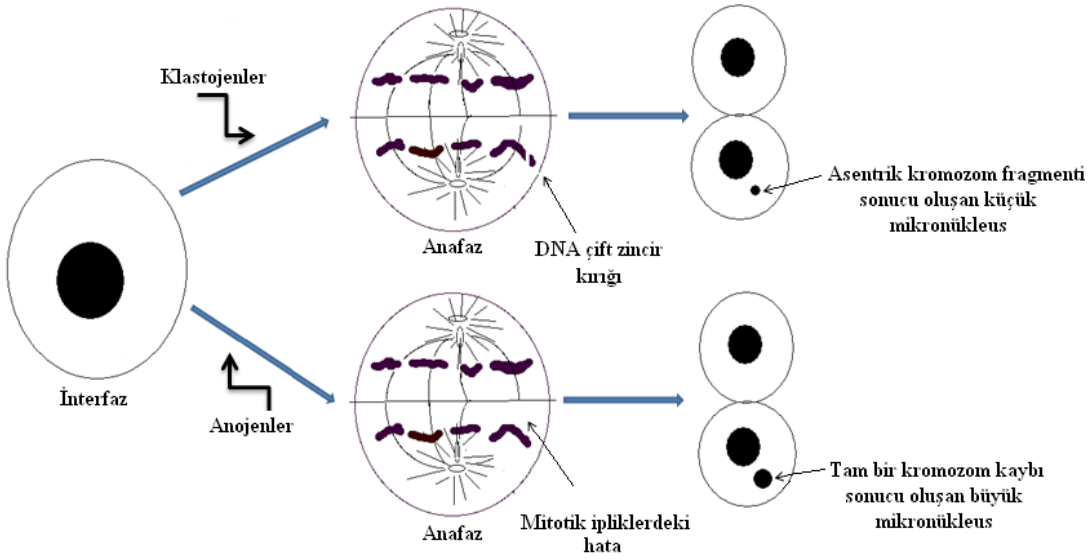
Mikronükleuslar (MN'ler), hücre döngüsünü kontrolünü sağlayan genlerdeki eksiklikler, mitotik iğ ve kinetokor hatalarıyla kromozom hasarlarından köken alan oluşumlardır. Bu yapılar, mitoz sırasında oluşan, ana nükleusa dahil olmayan, tam ya da sentrik kromozom parçalarından türemektedir. MN'ler genellikle hücre çekirdeği içinde bulunur ve genetik materyalin bir kısmını içerirler.

Mikronükleus sayısında meydana gelen artış, genotoksik maddelerin hücrelerde oluşturduğu kromozom anomalileri sonucu somatik hücrelerde meydana gelen genomik kararsızlığın bir göstergesidir. Genotoksik ajanlar genetik materyalde değişikliklere yol açarak hücrelerde mikronükleus oluşumuna sebep olurlar. Şekil 2.3'te klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN oluşumu gösterilmiştir.

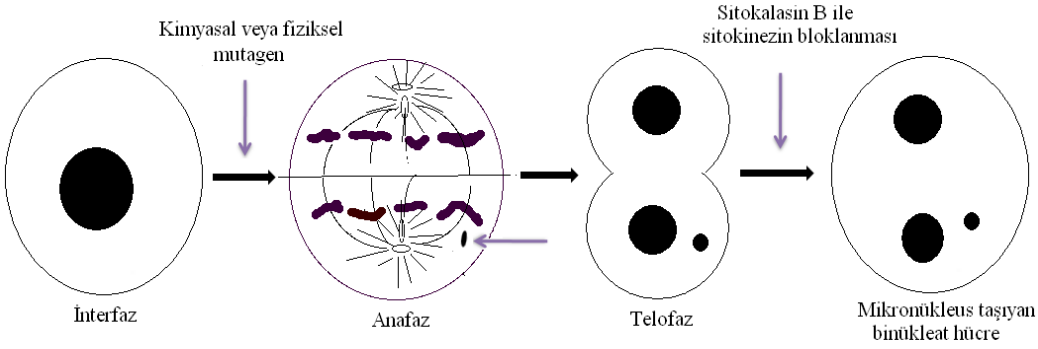
Çeşitli mutajenik ajanlara maruz kalan bireylerde, genomik düzensizlikle oluşan hastalıklarda ve kanserde mikronükleus frekansında önemli derecede bir artış gözlenmektedir. Mitoz hücre bölünmesiyle meydana gelen tüm hücrelerde hem hücre dışında hem de canlı organizmada uygulanabilir olmasıyla genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Mikronükleus testi, aynı zamanda genetik materyaldeki hasarın değerlendirilmesi ve genotoksik ajanların potansiyel etkilerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

MN testi, kültür ortamında bir kez bölünmesini tamamlamış olan çift nükleuslu hücrelerde Sitokalazin-B (Cyt-B) kullanılarak sitokinezin bloklanması prensibine dayanır. Bu yöntem, hücre bölünmesinin tamamlanmasını engelleyerek mikronükleusların oluşumunu teşvik eder. Şekil 2.4'te Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu gösterilmiştir. Mikronükleus testinde in vitro yöntemde Nükleer Bölünme İndeksinin (NDI) in vivo çalışmalarda ise kemik

iliğinde ya da periferal kan hücrelerindeki olgunlaşmamış eritrositler ile olgunlaşmış eritrositlerdeki MN oluşum oranı belirlenerek test edilen bileşiğin genetik hasara neden olup olmadığının saptanmasını sağlamaktadır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).



Şekil 2.3. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011)

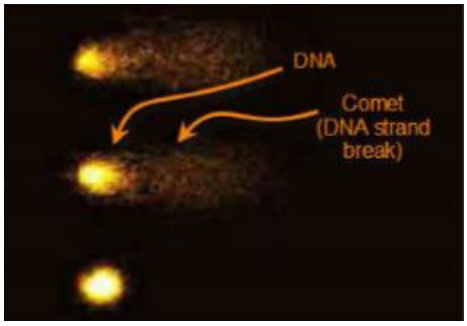


Şekil 2.4. Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011)

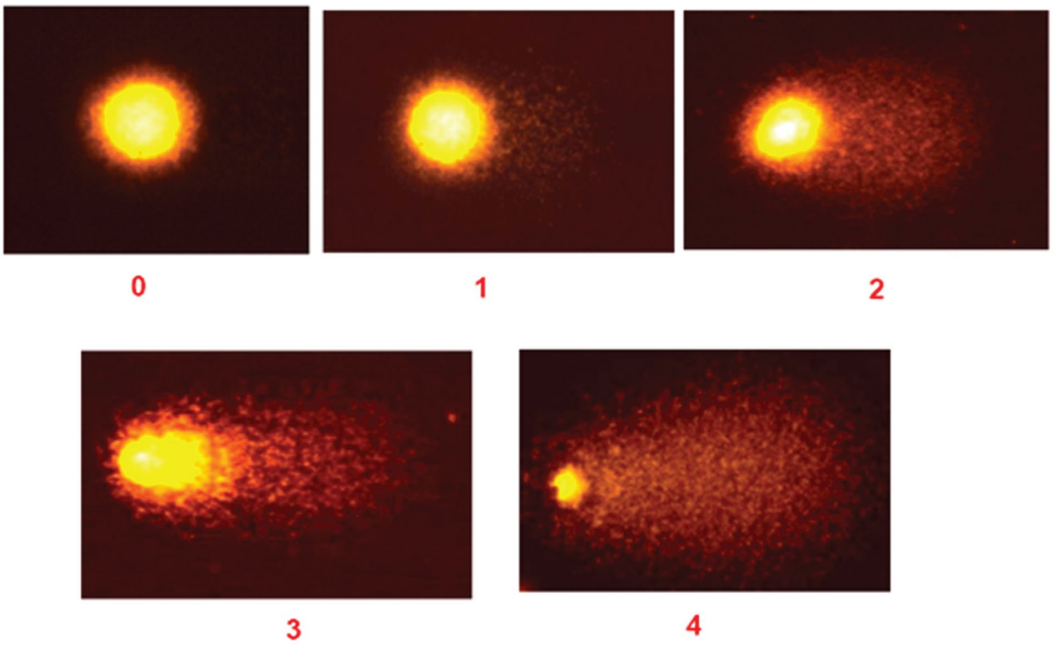
2.5.2. Komet Testi

Komet testi çeşitli ajanların neden olduğu DNA'daki tek ya da çift zincir kırıklarının tespitinde kullanılan hassas, hızlı ve güvenli bir yöntemdir. Komet yöntemi memeli hücrelerinde çeşitli ajanların neden olduğu DNA hasarı ve onarım mekanizmalarındaki bozuklukların saptanmasını amaçlayan araştırmalarda kullanılmaktadır. DNA fragment kırıklarının tayini prensibine dayanan Komet yöntemi insanda çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların yol açtığı DNA hasarının belirlenmesinde, kanserde DNA hasarının derecelendirilmesinde, kalıtsal bazı hastalıkların prenatal tanısında, çeşitli hastalıklarda artmış DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan test yöntemlerinden biridir. Komet testi genotoksik ajanların ilk etki bölgelerinde değerlendirilebilmesi, tüm ökaryotik hücreli canlılarda uygulanabilir olması, düşük hasar seviyelerinin ölçülebilmesine imkan vermesi, az sayıda hücre kullanımı gerektirmesi, hızlı, ucuz ve basit bir yöntem olması gibi özelliklerinden dolayı genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan biyoizlem testidir (Şekeroğlu ve diğerleri, 2011).

Alkali pH'da molekül ağırlıkları ve elektrik yükleri birbirinden farklı olan DNA fragmentlerinin elektriksel alanda göçündeki farklılık prensibine dayanan Komet yönteminde, hücre ve çekirdekler önce agaroza yerleştirilir, sonrasında lizis ve alkali ortamda elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon aşamalarından geçirildikten sonra floresans boya ile boyanmaktadır. Hazırlanan preparatların floresans mikroskobu incelemesinde preparatlarda zarar görmemiş DNA molekülü fragmentlerinde Komet yani kuyruk oluşumu görülmezken, hasarlanmış DNA moleküllerindeki fragmentler farklı molekül ağırlığı ve elektrik yükleri nedeniyle elektriksel alanda farklı hızlarda hareket edip çekirdek içerisinden dışarıya göç ederek kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadırlar. Şekil 2.5'te Komet testinde sağlam ve hasarlı DNA, Şekil 2.6'da ise Komet testi sonucu elde edilen görüntülerin hasarlarının derecelendirilmesi gösterilmiştir. DNA fragmentlerinin oluşturdukları kuyruklu yıldız görünümü nedeniyle bu tekniğe "Comet (Komet)" ismi verilmiştir. Komet Testi sonucunda Komet Alanı, Komet Yoğunluğu, Kuyruk %DNA, Kafa %DNA, Olive Kuyruk Momenti gibi parametreler ile DNA hasarı nicel olarak belirlenmektedir (Dinçer ve Kankaya 2010).



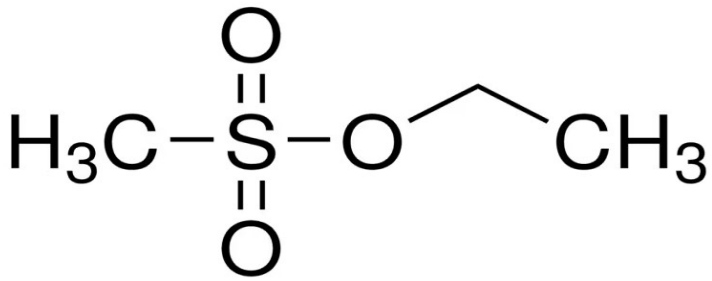
Şekil 2.5. Sağlam ve hasarlı DNA comet testi (Sezginer ve Dane 2015)



Şekil 2.6. Komet testi sonucu elde edilen görüntülerin DNA hasarına göre derecelendirilmesi. 0: hasarsız ya da minimum hasarlı hücre, 1: az hasarlı hücre, 2: orta derecede hasarlı hücre, 3 ve 4: çok hasarlı hücre (Dinçer ve Kankaya 2010)

2.6. Etil Metansülfonat (EMS)

Etil Metansülfonat (EMS) alkilleyici ajan olan kimyasal bir mutajendir. EMS genotoksik hasarı indükleme potansiyeline sahip olmasının yanında aynı zamanda mikronükleus oluşum sıklığını da arttırmaktadır. EMS genetik materyal DNA molekülünde genellikle nokta mutasyonlarına sebep olmaktadır (Koch ve diğerleri, 2012). EMS'nin kimyasal yapısı Şekil 2.7' de verilmiştir.



Şekil 2.7. EMS'nin kimyasal yapısı (Anonim, 2023)

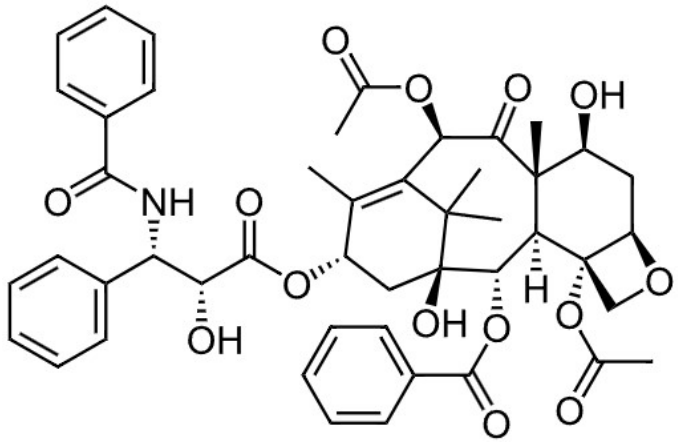
EMS'nin en fazla C/G – T/A baz değişimi mutasyonlarının oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. EMS tarafından DNA' daki guanin bazının alkillenmesiyle O_{-6} metilguanin yapısı oluşur ve bunun sonucunda timin ile yanlış baz eşleşmesi meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra EMS tek nükleotit değişimlerine, insersiyon ve delesyon mutasyonlarına da neden olmaktadır (Shirasawa ve diğerleri, 2016).

Alkalin sülfonat bileşiklerinden biri olan EMS'nin (Etil Metansülfonat) yüksek yapılı bitkilerde yüksek oranda mutasyon sıklığına neden olduğu bilinmektedir. EMS sıklıkla yüksek frekanslı gen mutasyonlarına ve düşük frekanslı kromozom sapmalarına neden olmakla birlikte aynı zamanda bitkilerde kromozom segmentlerinde insersiyon, delesyon gibi değişimleri de meydana getirmektedir (Tekin ve diğerleri, 2022).

Genellikle yüksek yapılı bitkilerde C/G – T/A baz dönüşüm mutasyonlarına neden olarak yavru döllerde yüksek oranda varyasyon oluşturan EMS aynı zamanda pamuk bitkisinin ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır (Güvercin, 2020).

2.7. Paklitaksel

Paklitaksel (Taxol, PAX) metastatik meme kanseri ve yumurtalık kanserinde önemli aktivite gösteren klinik olarak etkili bir antitümör ilaçtır (Burkhart ve diğerleri, 1994). Paklitakselin başlıca hücresel hedefi, mitozda hücre içi taşıma, hücre hareketi ve hücre şeklinin korunmasında önemli bir oynayan tubulin/mikrotübül sistemidir (Manfredi ve diğerleri, 1982). Paklitakselin kimyasal yapısı Şekil 2.8'te verilmiştir.



Şekil 2.8. Paklitakselin kimyasal yapısı (Anonim, 2022)

Paklitaksel, alfa ve beta tubulin heterodimerlerinden stabil mikrotübüllerin bir araya gelmesini sağlar ve depolimerizasyonlarını engeller (Schiff ve diğerleri, 1979). Bu nedenle, paklitakselin antitümör etki mekanizması mikrotübüllerin normal işleyişini engellenerek mitotik iğ oluşumunun önlenmesi yoluyla geç G2-M fazlarında hücre döngüsü ilerlemesinin bloke edilmesi esasına dayanmaktadır (Fuchs ve diğerleri, 1978).

2.8. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

‘’Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren atom ya da moleküllerdir.’’ Ortaklanmamış elektronları nedeniyle reaktif bir yapıda olan serbest radikaller, ortaklanmamış elektronlarını radikal olmayan bir moleküle verebilir veya başka bir molekülden elektron alarak radikal olmayan bir moleküle bağlanabilmektedir (Akkuş, 1995; Doğan ve diğerleri, 2014).

Organizmada meydana gelen birçok reaksiyon sonucu hücre ve dokularda oluşan serbest radikaller protein, lipit, karbohidrat, nükleik asit gibi bileşiklerin yıkımına neden olabilmektedir. Serbest radikaller tarafından uyarılan hücre yıkımının önemli bir mekanizması olan lipit peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu meydana gelmektedir. Aynı zamanda birçok hastalıkta oluşan doku yıkımı da serbest radikal ve lipit peroksidasyonunun bir sonucudur. Organizmada birçok antioksidan sistem ile serbest radikal tepkimeleri kontrol edilmektedir (Şimşek, 1999).

Serbest radikallerin yapılarında bulunan eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjiye sahiptir ve vücutta eşleşmiş olarak yer alan elektronları ayırarak fonksiyonlarına engel olmaktadırlar. Yüksek enerjileri ve reaktif olarak oldukça aktif olmaları, serbest radikallerin makromolekülleri etkileyerek oksidatif hasar oluşturmasına sebep olmaktadır. Antioksidanlar vücutta serbest radikaller için elektron hedefi oluşturarak uygun elektron ile bağlanmalarını sağlamaktadırlar. Böylece vücutta stabilite sağlanarak serbest radikaller ile antioksidan sistem arasındaki denge korunmaktadır (Aydemir ve diğerleri, 2009).

Antioksidan savunma sistemi ile serbest radikal oluşum dengesinin korunması sağlık açısından oldukça önemlidir. Organizmada antioksidan savunma sistemi ile serbest radikal dengesinin bozulması sonucu birçok hastalıkta hücresel ve moleküler düzeyde doku hasarının oluşumuna sebep olan oksidatif stres meydana gelmektedir (Tabakoğlu ve diğerleri, 2013).

Vücutta antioksidan savunma sistemi ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi arasındaki dengenin bozulmasıyla oluşan oksidatif stres, organizmada oksidatif hasara yol açmaktadır. Oksidatif stres sonucu meydana gelen hasarlar onarılamazsa zamanla artarak organizmada diyabet, alzheimer, ateroskleroz, koroner kalp hastalıkları ve kanser gibi çeşitli hastalıkların oluşmasına sebep olmaktadır (Aydemir ve diğerleri, 2009).

2.9. Antioksidanlar

Antioksidan maddeler, canlı organizmalarda serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon reaksiyonlarını durduran ya da azaltan bileşiklerdir (Langseth, 1995). Antioksidan maddeler serbest radikallerin nötralizasyonu yoluyla vücudu serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyarak vücudun kendini yenilemesini sağlamaktadırlar. Gıdalarda ya da vücutta yükseltgenebilen substratlarına göre daha düşük konsantrasyonlarda bulunan antioksidanlar, oksidatif hasara neden olan substratın oksidasyonunu büyük oranda geciktirir veya engellerler. Antioksidanların insan sağlığındaki rolleri son yıllarda daha iyi anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalar antioksidan aktiviteye sahip olan maddelerin oksidatif stres sonucu oluşan kanser, kalp-damar, katarakt ve birçok hastalığın önlenmesinde önemli işlevleri olduğunu ortaya koymuştur (Gök ve diğerleri, 2006).

Organizmada antioksidanlar vücutta doğal olarak üretilir ya da vücuda besinler yoluyla alınmaktadır. Endojen kaynaklı antioksidanlar organizmada doğal yollarla üretilen antioksidanlardır. Süperoksitdismutaz (SOD), katalaz, glutatyon, koenzim Q, askorbik asit, glutatyon peroksidaz, α-tokoferol gibi moleküller endojen kaynaklı antioksidanlardır. Eksojen kaynaklı antioksidanlar ise insanların genellikle besinlerle almış oldukları antioksidanlardır. Antioksidan içeriği açısından zengin olan sebze ve meyveler, insanlar için önemli eksojen antioksidan kaynaklarını oluşturmaktadır (Hanukoglu, 2006; Nordberg ve Arner 2001, Yeu ve diğerleri, 2010).

Polifenoller, flavonoidler ve fenolik asitler gibi çeşitli diyet bileşenleri kemoprotektif ajanlar olarak son yıllarda araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir. Diyet bileşenlerinin koruma yollarından biri DNA'ya zarar vererek hastalık oluşturan reaktif oksijen türlerini hidrojen verme ya da metal şelatlama kapasitelerine bağlı olarak göstermiş oldukları antioksidan özellikleri ile etkisiz hale getirmeleridir. Polifenol, flavonoid ve fenolik asitler gibi antioksidan bakımından zengin olan bitki ve gıdaların tüketilmesinin mutajenik veya karsinojenik maddelerin etkilerini azaltarak kansere karşı koruyucu etki göstermiş oldukları epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmiştir (Kaur ve diğerleri, 2006; Üstün ve diğerleri, 2012). Bunun yanı sıra bitkisel ürünlerin içermiş oldukları antioksidan aktiviteye sahip sekonder metabolitlerin, koruyucu etkileri ile DNA molekülündeki oksidatif hasarları engelleyebilecekleri gösterilmiştir (Sabudak, 2017).

2.10. DPPH Testi

Brand-Williams ve diğerleri (1995) tarafından geliştirilen, antioksidan aktivitenin ölçümünde yaygın olarak kullanılan bir spektrofotometrik yöntem olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) serbest radikalinin antioksidan moleküller tarafından süpürülme prensibine dayanan bir yöntemdir. DPPH, azot atomunda eşleşmemiş bir değerlik elektronu bulunan görece kararlı bir serbest radikal molekülüdür (Sharma ve Bhat 2009).

DPPH antioksidan testi, radikal bileşiğin sabit olması ve üretim gerektirmemesi nedeniyle antioksidanların aktivitelerinin değerlendirilmesinde ucuz, hızlı, kolay, doğru, geçerli ve ekonomik bir test yöntemi olarak kabul edilmektedir.

Bu yöntemin avantajı, DPPH• reaktifinin en zayıf antioksidanlar dahil karışımdaki bütün maddelerle etkileşime girerek hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlarla reaksiyona girebilmesidir (Seyhan, 2019). DPPH test yönteminin bitki ekstratlarında yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik oranına sahip olduğu belirtilmiştir. Yüksek DPPH radikal süpürme aktivitesi, bitki ekstratlarının fenolik bileşenler bakımından zengin olduğunu yansıtmaktadır (Katalinic ve diğerleri, 2006).

2.11. CUPRAC Testi

Apak ve diğerleri (2004) tarafından geliştirilen bu yöntemde, polifenolik maddelerin bakır(II)-neokuproin [Cu(II)-Nc] çözeltisini okside edici bir ajan olarak kullanıldığı ve bu maddelerin reaksiyona girerek bakır(II) iyonunu indirdiği bir reaksiyon süreci mevcuttur. İndirgeme reaksiyonu sonucunda oluşan renkli Cu(I)-Nc şelatının spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda ölçümü yapılmaktadır. Bu yönteme CUPRAC adı verilmiş olup, "bakır indirgeyici antioksidan kapasite" ifadesinin kısaltmasıdır. Bu yöntem, hem hidrofilik hem de lipofilik sistemlere uygulanabilen, kolay ve pratik bir ölçüm yöntemidir.

2.12. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite

Hücre kültürü, hücreler için gerekli olan amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller gibi temel besinleri, büyüme faktörlerini, hormonları, gazları (O_2, CO_2,) fiziko kimyasal şartları (pH, osmotik basınç) içeren in vitro koşullar altında hücrelerin büyümesini sağlayan uygun ortamdır (Antoni ve diğerleri, 2015).

Hücre kültürü, kültüre alınan hücrelerin birbirleriyle, biyolojik materyaller ve ekstratlarla etkileşimini sağlayarak biyokimyasal süreçlerin incelenmesini kolaylaştırır. Bunun yanında hücre kültürü hücrelerin büyümesi için hassas, güvenilir ve uygun koşullara sahip bir ortam sunmaktadır (Riss ve diğerleri, 2011). Hücre kültürü, kanser araştırmaları, aşı çalışmaları, ilaç üretimi ve sitotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Gilbert ve Boutros, 2016).

Sitotoksik terimi, hücrenin ölümüne sebep olan anlamındadır. Sitotoksisite çalışmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi için yapılmaktadır. Hücre temeline dayanan sitotoksisite çalışmaları kolay uygulanabilir olması ve in vivo çalışmalarda elde edilen veriler ile uyum sağlama özellikleri ile hayvan deneylerine alternatif olarak geliştirilmiş ve toksikoloji alanında sıklıkla tercih edilir bir hale gelmiştir (Riss ve Moravec, 2004).

Sitotoksisite, incelenecek olan maddenin dozuna ve maruziyet süresine göre hücrelerde farklı derecelerde zarar oluşturan bir olaydır. Hücreler, sitotoksik bir maddeye maruz kaldıklarında apoptoz, otofaji ve nekroz gibi patolojik durumlar nedeniyle ölebilirler ya da sitostazis sebebiyle proliferasyon yeteneklerini kaybedebilirler (Galluzzi ve diğerleri, 2009). Deneysel olarak çeşitli zararlı ajanlar ile muamele edilen hücrelerin, maruziyetten sonra canlılıklarının tespit edilmesi sitotoksisite deneylerinin önemli bir basamağıdır (Niles ve diğerleri, 2007).

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan çok sayıda test yöntemi mevcuttur. Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan test yöntemi ne olursa olsun, tüm sitotoksisite çalışmalarında deney sonunda canlı ve ölü hücre oranının belirlenmesi oldukça önemli bir husustur (Riss ve Moravec 2006).

Sitotoksisitenin veya hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan yöntemler genel olarak kolorimetrik yöntemler, florometrik yöntemler, lüminometrik yöntemler ve enzimatik yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır (Stoddart, 2011).

2.13. Trypan Blue ile Hücre Canlılık Testi

Boyama yöntemleri ile canlı hücrelerin yüzdesini belirlemek mümkündür. Boyama yöntemleri hücre kültür ortamına eklenen boyayı canlı hücrelerin dışarıda bırakması, ölü hücrelerin ise boyayı hücre içine alması prensibine dayanmaktadır. Bu boyama yöntemleri arasında en yaygın kullanılan boya Trypan Mavisidir. Trypan Mavisi bir azo boyasıdır; pamuklu tekstilleri boyamak için de kullanılır. Biyolojik bilimlerde ise hücre canlılığının veya sitotoksisitenin belirlenmesinde en sık kullanılan boyalardandır.

Trypan Mavisi ile boyama yöntemi basit ve ucuz olması, hücre zarı bütünlüğü bozulmuş olan hücrelerin mikroskopta hızlıca sayılabilmesine imkan vermesi özellikleriyle hücre canlılığının veya sitotoksisitenin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Strober, 2015).

Trypan Mavisi canlı hücrelerin zarlarının ve hücre yapılarının bütün olmasından dolayı canlı hücrelerin zarlarından geçemezken, ölü hücrelerin zarlarından geçerek hücreyi boyayabilir. Trypan Mavisi ile ölü hücrelerin boyanması için önce tripsinize edilerek süspanse haline getirilir. Süspanse edilen hücrelere doğrudan uygulanabilir. Boyama işlemi öncesi hücre süspansiyonu homojen hale getirilerek hücrelerin eşit şekilde dağılmaları sağlanır. Hücre süspansiyonundan bir miktar (5-10 µl) alınarak eşit miktarda Trypan Mavisi ile karıştırılarak hemositometreye uygun miktarlarda konularak sayım gerçekleştirilir. Boyayı içine alan hücreler ölü, boyayı içine almayan hücreler ise canlı olarak kabul edilir. Canlı ve ölü hücreler sayılarak hücre süspansiyonundaki toplam yüzdeleri hesaplanarak belirlenir (Louis ve diğerleri, 2011; Strober, 2015).

Bitki sekonder metabolitlerinin çeşitli sınıflarına ait bileşiklerin genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar olmasına rağmen, yapılan literatür taramasında çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilebilen bir pentasiklik triterpenoid olan Alpha-Amyrin molekülünün tek başına ve saf halde potansiyel genotoksik/antigenotoksik etkilerinin in vitro koşullarda insan periferik kan lenfosit kültürleri ile hücresel düzeyde araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında Alpha-Amyrin (α-Amyrin) molekülünün tek başına herhangi bir genotoksik etkisinin bulunup bulunmadığının belirlenmesinin yanında genotoksik olduğu bilinen Paklitaksel (PAX) veya Etil Metansülfonat (EMS) ile indüklenmiş DNA hasarlarına karşın antigenotoksik etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi de amaçlanmıştır. Ayrıca Alpha-Amyrin molekülünün biyolojik özelliklerini daha güçlü bir şekilde aydınlatabilmek adına sitotoksik özellikleri ile antioksidan aktivitesinin belirlenmesi de amaçlanmıştır.

Alpha-Amyrin molekülünün genotoksik/antigenotoksik etkileri in vitro genotoksisite test yöntemlerinden Mikronükleus (MN) ve Alkali Komet testleri ile değerlendirilmiştir. Bunun yanında Alpha-Amyrin molekülünün antioksidan aktivitesi DPPH ve CUPRAC testleri değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı, sitotoksik aktivitenin değerlendirilmesi ve doz belirleme deneyleri Trypan Blue hücre canlılık testi ile gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada pentasiklik triterpen olan Alpha-Amyrin molekülünün tek başına ve genotoksik etkileri bilinen EMS (Etil Metansülfonat) ve Paklitaksel (PAX) ile kombinasyonlarının insan periferal kan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik/antigenotoksik etkileri *in vitro* Mikronükleus (MN) ve Komet (Tek Hücre Jel Elektroforezi) test yöntemleriyle araştırılmıştır. Ayrıca Alpha-Amyrin molekülünün antioksidan aktivitesi DPPH ve CUPRAC testleri ile değerlendirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzeme ve kimyasalların listesi Çizelge 3.1'de kullanılan cihazlar ise Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar

Sarf Malzeme/Kimyasal	Marka
15 ml'lik falcon tüpü	NEST
1,5 ml'lik ependorf tüpü	NEST
Alpha-Amyrin 10 mg	Santa Cruz
Paklitaksel 100 mg	Cayman Chemical Company
Etil Metan Sulfonat (EMS) 10 g	Sigma
Sitokalazin-B	Santa Cruz
Etidyum Bromür	Merck
RPMI 1640 Medium 500 ml	Sigma
Phytohemaglütinin	Biochrom
L-Glutamine	Sigma
Fetal Bovine Serum 100 ml	Sigma
Penicillin/Streptomycine	Gibco
Histopaque	Sigma
Normal erime noktalı agaroz 100 g	Sigma A9539
Low melting agaroz 5 g	Sigma A9414
Methanol	Merck
Absolute Ethanol	Isolab
Asetik asit	Merck
Etil asetat	Sigma Aldrich
Na_2EDTA	Merck
NaCl	Isolab
NaOH	Merck
Tris Base	Sigma Aldrich
Giemsa	Merck
Na_2PO_4	Merck
KH_2PO_4	Merck
KCl	Merck
Heparinli Tüp	Hemolab
PBS Tablet	Bıomedicals

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka/Model
Laminer akım kabini	Class II Steril Kabin
İnkübatör	LEEC MK II Proportional Temperature Controller
Hassas terazi	Shimadzu, AUW220D
Terazi	Sartorius
Çok kanallı pipet	Cleaver Scientific
Elektrikli pipet pompası	Cleaver Scientific
Floresans ataçmanlı faz kontrast mikroskop	Novel N-800M, Çin
Işık Mikroskobu	Olympus CH-2
Santrifüj	NÜVE CN180
Su banyosu	NÜVE BM302
Ph metre	NEL mod 821
Elektroforez tankı	Cleaver Scientific
Elektroforez güç kaynağı	Cleaver Scientific
+4 °C buzdolabı	Vestel
-20 °C buzdolabı	Arçelik
Manyetik karıştırıcı	Chıltern Hotplate Magnetıc Stırrer
Vortex	Wıp Scıentifica Vortex Mıxer
Komet yazılımı	Kameram 21
Mikroplaka okuyucu	BioTek, ELx800 U.S.A Elisa reader
ELISA plak okuyucu FLASH Scan S12, Analytik Jena	FLASH Scan S12, Analytik Jena

3.2. Alpha-Amyrin Temini

Alpha-Amyrin (sc-257029 Santa Cruz) ticari olarak satın alınmıştır. Alpha-Amyrin toz halindedir ve deneylerde kullanılmadan önce +4 °C' de buzdolabında saklanmıştır.

Alpha-Amyrin'in tamamı 234,4 µl DMSO ve 67,3 µl Etil Asetat ile çözdürülmüştür. Çözelti konsatrasyonu 80 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözdürülüp hazırlanan Alpha-Amyrin 10'ar µl hacimlerde alikotlanarak deney süresi boyunca -20°C'de karanlık ortamda saklanmıştır.

3.3. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Alpha-Amyrin molekülünün antioksidan aktivitesi DPPH ve CUPRAC yöntemleriyle belirlendi.

3.3.1. DPPH Testi

Alpha-Amyrin stok çözeltisi 1000 µM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. 1000 µM konsantrasyon ile başlanarak 96'lık mikroplakada seri dilüsyon gerçekleştirildi. Referans çözelti olarak Trolox maddesi seçildi ve 1 mg/ml stok konsantrasyonu ethanol çözücüsünde deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı. İlk satır hariç tüm kuyucuklara 100 µl hacimde ethanol eklendi. Mikroplakanın ilk satırına 200 µl hacimde 1000 µM'lık Alpha-Amyrin stok çözeltisi eklendi. Hemen ardından her kuyucukta eşit hacim kalacak şekilde seri dilüsyon gerçekleştirildi. Böylece konsantrasyon aralığı 0,49 µM - 500 µM olarak gerçekleştirildi. Daha sonra her kuyucuğa methanol içerisinde çözülen 0,2 mM DPPH çözeltisinden 100 µl hacminde pipetleme yapıldı. Mikroplakalar 37 °C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, ELISA mikroplaka okuyucusunda absorbans değeri 517 nm dalga boyunda ölçüldü. Absorbans konsantrasyon grafiği çizilerek oluşan eğri denklemi üzerinden Alpha-Amyrin'in DPPH serbest radikalinin yarısını temizlediği konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplandı.

3.3.2. CUPRAC Testi

Alpha-Amyrin stok çözeltisi 1000 µM konsantrasyonda olacak şekilde ethanol:H_2O (1:1) çözeltisinde hazırlandı. Referans çözelti olarak Trolox maddesi seçildi. Deneyden hemen önce konsantrasyonu 1 mg/ml olarak hazırlandı. İlk kuyucuk hariç bütün kuyucuklara 100 µl ethanol eklendi. Mikroplakanın ilk satırına 200 µl hacminde 1000 µM konsantrasyonda Alpha-Amyrin pipetlendi. İlk 11 satır kullanılarak seri dilüsyon gerçekleştirildi. Böylece konsantrasyon 0,49 µM -500 µM olmuş oldu. Kuyucukların son hacmi 50 µl olacak şekilde aspire edildi. Ardından, CUPRAC çözeltisinin reaktanları olan $CuCl_2$, NH_4Ac ve neokuproin çözeltileri taze hazırlanarak eşit hacimlerde olacak şekilde karıştırıldı. Her kuyucuğa çözeltiden 150 µl pipetlendi. Mikroplakalar, 30 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda ELISA mikroplaka okuyucuda ölçüldü. Absorbans/konsantrasyon grafiğinden eğri denklemi elde edildi. Trolox içeren 1 mg/ml çözeltiye karşılık gelen absorbans değeri hesaplanarak, bu değeri elde etmek için karşılık gelen Alpha-Amyrin konsantrasyonları, eğri denklemleri kullanılarak hesaplandı. Bu şekilde CUPRAC antioksidan kapasitesi, 1 µM Troloks aktivitesine karşılık gelen Alpha-Amyrin aktivitesi olarak µM cinsinden belirlendi.

3.4. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Lenfosit kültürü için 24 ml %20 Fetal Calf Serum (FBS), 2,4 ml %2'lik L-Glutamine, bakteriyel kontaminasyonu en aza indirgemek için 0,6 ml Penicillin – Streptomycine, lenfositleri mitoza teşvik edebilmesi için 5 ml medium içerisinde çözülen 1,2 mg/ml Phytohemaglütinin karıştırıldı. Karışım hacmi 88 ml %10'luk RPMI 1640 Medium ile 120 ml'ye tamamlandı. Steril koşullar altında hazırlanan karışım 15 ml'lik steril falcon tüplerine bölünerek 5 ml hacminde kültür ortamları hazırlandı. pH'ları 6,8-7,2 aralığında olacak şekilde hazırlanan kültürler -20°C'de muhafaza edildi.

3.5. Kandan Lenfosit İzolasyonu

Çalışmada kullanılacak olan lenfosit hücreleri için 20-30 yaş arası, sigara, alkol ve herhangi bir ilaç kullanmayan 3 sağlıklı gönüllüden (2 kadın, 1 erkek olmak üzere her bir donörden) 5 ml periferik kan örneği heparinli tüplere alındı. Kan kiti (kültür) ve Histopaque çalışma öncesi oda sıcaklığına getirildi. Heparinli tüpe alınan 4 ml tam kan ile filtrelenip steril edilen 4 ml PBS karıştırılarak süspanse edildi. Temiz ve kuru bir tüpe alınan 4 ml Histopaque üzerine süspanse edilen tam kan karışmayacak şekilde yavaş yavaş eklendi. Kan – Histopaque karışımı 1500 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Histopaque'ın yoğunluk gradiyenti farkından dolayı santrifüj sonunda kan 4 katmana ayrılmıştır. En üstte yer alan plazma tabakası aspire edip uzaklaştırılarak plazma tabakasının alt kısmında bulunan bulutumsu lenfosit tabakası toplandı. Temiz ve kuru bir tüpe aktarılan lenfosit tabakası üzerine hacim 5 ml olacak şekilde PBS eklenip süspanse edildi. PBS ile süspanse edilen lenfosit tabakası 2500 rpm' de 10 dakika santrifüj işlemi yapılarak hücreler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek hacim 5 ml olacak şekilde PBS eklenip süspanse edildikten sonra 2500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Son yıkama işleminin ardından süpernatant aspire edilip dipteki lenfosit peleti süspanse edildi. Süspanse edilen lenfosit peleti oda sıcaklığına getirilen kültür ortamlarına ekilerek 37 °C' de inkübasyona bırakıldı.

3.6. Doz Seçimi ve Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

Alpha-Amyrin için doz seçimi Trypan Blue hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. Sağlıklı, sigara, alkol ve herhangi bir ilaç kullanmayan donörlerden alınan heparinize periferik tam kan örneklerinden lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen lenfositler kültür ortamlarına ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda lenfosit kültürü laminer akım kabini içerisinde steril koşullar altında süspanse edildi. Lenfosit hücre karışımından 10 µl alınarak 10 µl Trypan Blue ile süspanse edildi. Lenfosit Trypan Blue karışımı bekletmeden Neubauer lamına alınarak mikroskopta sayım yapıldı. Mililitredeki hücre sayısı hesaplanarak her bir ependorf tüpüne hücre sayısı $5x10^3$ olacak şekilde hücre süspansiyonu eşit miktarlarda eklendi. Seri dilüsyon ile hazırlanan Alpha-Amyrin dozları (800 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM) ile lenfosit hücreleri muamele edildi. 48 saatlik inkübasyonun ardından lenfosit hücrelerine 800 rpm'de 8 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Her bir doz grubu için 10 µl Trypan Blue

ve 10 µl hücre süspansiyonu karıştırılarak canlı ve ölü hücre sayıları Neubauer lamında mikroskopta sayılarak belirlendi. Trypan Blue canlılık testi sonucu Alpha-Amyrin'in dozları 400 µM ve 100 µM olarak seçilerek her bir deney grubu için uygulandı.

Genotoksik etkili ajanlar olarak kullanılan EMS (Etil Metansülfonat) ve Paklitakselin (PAX) dozları literatürdeki bilgiler referans alınarak belirlendi. EMS için 500 µg/ml (Machado ve diğerleri, 2005), Paklitaksel için 10 µM (Türkez ve diğerleri, 2010) dozları kullanıldı.

3.7. Deney Gruplarının Oluşturulması

Mikronükleus (MN) ve Komet testleri için aşağıda belirtilen deney grupları oluşturuldu.

1. Negatif kontrol (sadece besiyeri ortamı)

2. Çözgen (solvent) kontrol (20 µl DMSO+5 µl Etil Asetat)

3. 100 µM α-Amyrin

4. 400 µM α-Amyrin

5. EMS (Etil Metansülfonat) 500 µg/mL

6. Paklitaksel (PAX) 10 µM

7. 400 µM α-Amyrin + EMS 500 µg/ml

8. 400 µM α-Amyrin + PAX 10 µM

3.8. Genotoksisite Testleri

Alpha-Amyrin'in genotoksik etkileri *in vitro* olarak Mikronükleus (MN) ve Komet (Tek Hücre Jel Elektroforezi) testleri ile değerlendirilmiştir.

3.8.1. Mikronükleus Testi

Sigara, alkol ve herhangi bir ilaç kullanmayan 20-30 yaş arası sağlıklı gönüllü bireylerden heparinli tüplere kan alındı. Heparinli tüplere alınan periferik kan örneklerinden lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen lenfosit hücreleri kültür ortamlarına ekilerek 37°C' de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 44. saatinde binükleer hücre elde etmek için final konsatrasyonu 6µg/ml olan Sitokalazin-B (Cyt-B) her bir kültür ortamına 6 µl

olacak şekilde ilave edildi. Negatif kontrol (sadece besiyeri ortamı), solvent kontrol (DMSO + Etil asetat), tek başına α-Amyrin dozları (100 ve 400 µM), tek başına Etil Metansülfonat (EMS, 500 µg/ml) ve Paklitaksel (PAX, 10 µM) belirlenen dozları ve 400 µM α-Amyrin + EMS (500 µg/ml), 400 µM α-Amyrin + PAX (10 µM) kombinasyon dozları kültür ortamlarına inkübasyonun 48. saatinde eklendi. 72. saatin sonunda harvest gerçekleştirildi. İnkübasyonun sonunda kültür ortamları 800 rpm' de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücre peleti üzerine 0,075 M KCl eklenerek oda ısısında 4 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür ortamları 800 rpm'de 8 dakika santrifüj edilerek lenfositlerin çökmesi sağlandı. Elde edilen lenfosit hücreleri 3:1 oranında (methanol: glasiyel asetik asit) taze hazırlanan fiksatif ile fikse edildi. Fiksasyon işlemi 3 kez tekrarlandı. Her fiksasyon sonrasında 800 rpm' de 8 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Son fiksasyon aşamasından sonra süpernatant aspire edildi. Elde edilen lenfosit hücreleri bir miktar fiksatif ile seyreltilerek önceden alkolle temizlenerek -20°C'de bekletilen soğuk lamlara yayıldı. Hazırlanan preparatlar havada kurumaya bırakıldı. Kurutulan preparatlar Fosfat Buffer ile hazırlanmış %5'lik Giemsa solüsyonu (pH:6,8) ile şale içerisinde 15 dakika boyandı. Boyama için pH:6,8 olan Sorenson tamponu hazırlandı. Sorenson tamponu 56 ml Na_2PO_4 ile 44 ml KH_2PO_4 karıştırılarak 100 ml olarak hazırlandı. Oda sıcaklığındaki 5 ml Giemsa solüsyonu ile 95 ml tampon çözelti ilave edilerek Giemsa boyası taze olarak hazırlandı. Boya şale içerisinde kurutma kâğıdı ile süzülerek partiküllerinden uzaklaştırıldı. Preparatlar 15 dakikalık boyama işleminin ardından distile su ile yıkanarak havada kurutuldu. Kurutulup hazırlanan preparatlar incelemeye kadar serin bir yerde muhafaza edildi.

Preparatların Değerlendirilmesi:

Mikronükleus (MN) preparatlarının değerlendirilmesi ışık mikroskobunda 40X objektif ile yapıldı. Her deney grubu için hazırlanan prepatlarda 2000 adet binükleer hücre sayıldı. Binükleer hücreler içerisinden mikronükleuslu olan hücreler saptanarak kaydedildi. Her doz grubunda ayrıca 1000 hücre sayılarak, hücrelerin arasından bir, iki, üç, dört nükleuslu olan hücrelerin sayıları belirlenerek NDI hesaplandı (Fenech, 2000).

NDI değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$NDI = (1xN_1+2xN_2+3xN_3+4xN_4) / (N_1+N_2+N_3+N_4)$$

NDI, hücrenin çoğalma yeteneğine bağlı olarak azalan ya da artan hücre mitotik bölünmesinin bir indeksidir. Formül, farklı nükleus sayılarına sahip hücreler arasındaki dağılımı değerlendirmek için kullanılır. N_1,N_2,N_3,N_4: sırasıyla mononükleer, binükleer, trinükleer ve tetranükleer hücre sayılarını temsil etmektedir.

3.8.2. Alkali Komet Testi

Alkali Komet testi, Singh ve diğerleri (1988) tarafından geliştirilen yöntemin bazı modifikasyonları ile birlikte gerçekleştirilmiştir (Çelikler Kasımoğulları ve diğerleri, 2014).

Alkali Komet testi deneyden önceki hazırlık aşamaları:

NMA (Normal Melting Agarose) ile Lamların Kaplanması

Deney sırasında hücre-agar karışım tabakasının lam üzerinden kayıp kaybolmasını engellemek amacıyla, 0,65 g tartılan NMA 100 ml'lik bir beher içinde 100 ml distile su ile karıştırıldı. Lamlar hazırlanan NMA ile kaplanarak kurumaya bırakıldı. Bu işlem, agar tabakasının lam yüzeyinde daha pürüzlü bir yapı oluşturarak, hücrelerin daha iyi tutunmasını sağlamak içindir. Pürüzlü yüzey, hücre-agar karışımını sabitleyerek kaybolmasını önlemektedir.

PBS (Phosphat Buffer Solution) Hazırlanması

1 tablet PBS 100 ml distile su içerisinde çözüldü ve +4 °C'de saklandı.

Lizis Buffer Hazırlanması

Lizis çözeltisi, agar üzerine yerleştirilmiş hücrelerin hücre zarının ve proteinlerinin parçalanarak çıplak DNA'nın elde edilmesi amacıyla kullanılır. Çözeltinin içinde bulunan tuz, proteinlerin hücreyle olan bağlarını ve RNA yapısını bozar. Aynı zamanda, çözeltiye eklenen deterjanlar hücre membran yapısını bozar, böylece hücre içeriği dışarıya çıkarılır ve DNA'nın izolasyonu için uygun bir ortam oluşturulur. Bu işlem, hücre içeriğinin açığa çıkarılmasını ve çıplak DNA'nın elde edilmesini sağlar. 29,22 g NaCl, 7,4448 g Na_2EDTA (kolay çözünmesi için 8-10 pellet NaOH eklendi) ve 0,2422 g Tris 178 ml distile suda çözülerek hazırlandı. Çözeltinin pH'sı 10 olacak şekilde ayarlandı ve +4° C'de saklandı. Deneyden hemen önce hazırlanmış olan lizis çözeltisine 2 ml (%1) Triton X100 ve 20 ml (%10) DMSO eklendi.

Running (Yürütücü) Buffer Hazırlanması

Running (yürütücü) Buffer DNA sarmalının açılarak (Unwinding) zincirlerinin birbirinden ayrılıp tek iplik haline gelmesi ve DNA tek ipliği üzerindeki fragmentlerin yürütülmesi aşamalarında kullanılmaktadır.

1,5 L distile içerisinde 0,56025 g EDTA ve 18 g NaOH çözülerek hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin pH ayarlaması yapılarak (pH:13 olacak şekilde ayarlanmıştır) +4°C'de saklandı.

Deneyde kullanılmak üzere stok amacıyla +4°C'ye ethanol ve distile su konuldu.

Nötralizasyon Buffer Hazırlanması

9,9612 g Tris 200 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı. Çözeltinin pH ayarlaması yapılarak (pH: 7,5 olacak şekilde ayarlandı) +4°C' ye kaldırıldı.

LMA (Low Melting Agarose) Hazırlanması

0,065 g LMA tartılarak üzerine 10 ml PBS eklenerek 50 ml'lik erlen içerisinde manyetik ısıtıcıda kaynamamasına ve berrak olmasına dikkat edilerek hazırlandı. Hazırlanan LMA ependorf tüplerine 250 µl hacimlerde bölünerek 37°C su banyosuna yerleştirildi.

Alkali Komet testi deney süreci:

Sigara, alkol ve herhangi bir ilaç kullanmayan 20-30 yaş arası sağlıklı gönüllü bireylerden heparinli tüplere kan alındı. Heparinli tüplere alınan periferik kan örneklerinden lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen lenfosit hücreleri kültür ortamlarına ekilerek 37°C' de inkübe edildi. Negatif kontrol (sadece besiyeri ortamı), solvent kontrol (DMSO + Etil asetat), tek başına α-Amyrin dozları (100 ve 400 µM), tek başına Etil Metansülfonat (EMS, 500 µg/ml) ve Paklitaksel (PAX, 10 µM) belirlenen dozları ve 400 µM α-Amyrin + EMS (500 µg/ml), 400 µM α-Amyrin + PAX (10 µM) kombinasyon dozları kültür ortamlarına inkübasyonun 48. saatinde eklendi. 72 saatlik inkübasyondan sonra kültür ortamları 800 rpm'de 8 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant atılarak elde edilen lenfosit hücreleri ile Komet testi gerçekleştirildi. Elde edilen lenfosit hücreleri 500 µl PBS ile seyreltilerek süspanse edildi. Hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak sıcak su banyosundaki 250 µl LMA ile karıştırıldı. Önceden NMA ile kaplanmış olan lamlar her deney grubu için A ve B olacak şekilde etiketlenerek üzerlerine 100 µl hücre

agar karışımından yayılarak lamel kapatılıp preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar jelin katılaşmasını sağlamak amacıyla +4°C'de 25 dakika bekletildi. Agarın katılaşmasından sonra preparatların üzerindeki lameller jelin yırtılmamasına dikkat edilerek kaldırıldı ve şale içerisindeki soğuk lizis solüsyonu içerisine yerleştirildi. Lizis solüsyonuna alınan preparatlar, +4°C'de saklanmak üzere yerleştirildi ve yaklaşık 24 saat boyunca bu koşullarda bekletildi. Lizis işleminden geçirilen preparatlar daha sonra elektroforez tankına yerleştirildi. Tank, soğuk elektroforez solüsyonu (pH: 13) ile doldurulduu ve preparatlar bu solüsyon içinde 15 dakika bekletildi. DNA sarmalının açılması tamamlandıktan sonra, aynı tank ve solüsyon içinde elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Preparatlar elektroforezin ardından elektroforez tankından çıkarılıp pH'ın ayarlaması için soğuk nötralizasyon solüsyonu içerisine konularak buzdolabında 5 dakika süreyle bekletildi. Kuruyan preparatlar, konsantrasyonu 2 µg/ml olan Etidyum Bromür ile boyanarak floresan mikroskopta incelendi.

Preparatların Değerlendirilmesi:

Preparatlar Komet yazılımı olan Kameram 21, Mikrosistem programı kullanılarak değerlendirildi. Bu değerlendirme Komet Alanı, Kuyruk Uzunluğu, Kafa %DNA, Komet Yoğunluğu, Olive Kuyruk Momenti gibi parametreleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Aşağıdaki formül kullanılarak Genetik Hasar İndeksi (GHİ) hesaplanmıştır (Singh ve diğerleri, 1988):

GHİ=(1*∑Tip1)+(2*∑Tip2)+(3*∑Tip3)+(4*∑Tip4)/(∑Tip0+∑Tip1+∑Tip2+∑Tip3+∑Tip4)

Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) Formülü (Singh ve diğerleri, 1988):

% Hasarlı Hücre= ΣTip2+ΣTip3+ΣTip4

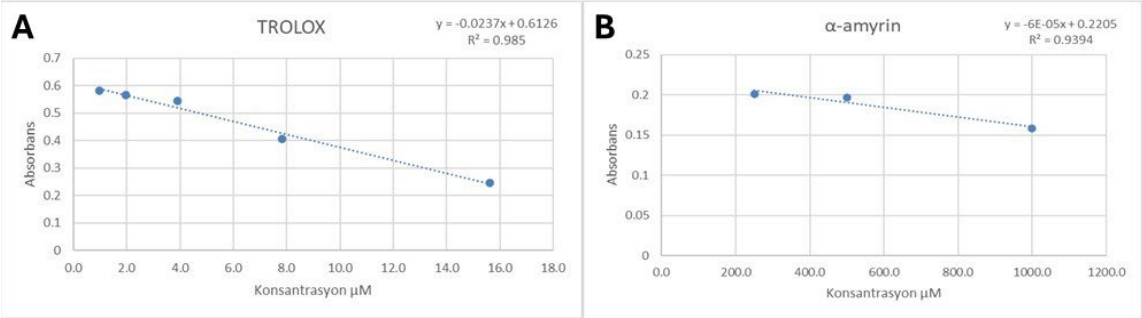
3.9. İstatiksel Analiz

Deneyler sonucu elde edilen veriler Ortalama Değer ± Standart Sapma şeklinde verildi. Verilerin istatistiki analizinde SPSS 28.0 paket programı kullanıldı. Her bir parametrenin normal dağılım analizi yapılarak, Non-Parametrik Kruskal-Wallis testi kullanılarak elde edilen verilerin analizi gerçekleştirildi. Fark grupları, Post Hoc testlerinden Bonferroni testi ile belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. DPPH Testi Sonuçları

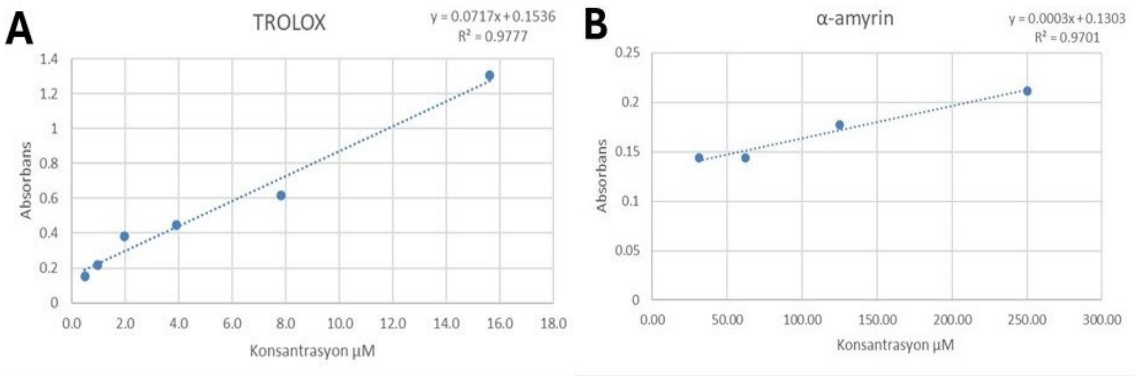
Şekil 4.1'de Alpha-Amyrin molekülünün ve Trolox maddesinin DPPH testi ile yapılan antioksidan analiz sonuçları verilmiştir. Her iki maddede de antioksidan profiller değerlendirildiğinde Trolox maddesinin antioksidan kapasitesi, IC_{50} değeri 12,84 µM olarak hesaplanmıştır. Çalışılan Alpha-Amyrin konsantrasyonlarında (1000 µM, 500 µM ve 250 µM) 2125 µM IC_{50} değeri hesaplanmış, kuvvetli bir antioksidan aktivite saptanmamıştır.



Şekil 4.1. Trolox (A) ve α-Amyrin (B) moleküllerinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi

4.2. CUPRAC Testi Sonuçları

Şekil 4.2'de Alpha-Amyrin molekülünün ve Trolox maddesinin CUPRAC testi ile yapılan antioksidan analiz sonuçlarının karşılaştırılması verilmiştir. Her iki maddede de antioksidan profiller değerlendirildiğinde Alpha-Amyrin molekülünün Trolox eşdeğerliği 0,01627 (µM Trolox eşdeğerliği/µM Alpha-Amyrin) olarak hesaplanmıştır Çalışılan Alpha-Amyrin konsantrasyonlarında (250 µM,125 µM ve 62,5 µM, 31,25 µM,) Trolox eşdeğerliği göz önüne alındığında kuvvetli bir antioksidan aktivite saptanmamıştır.

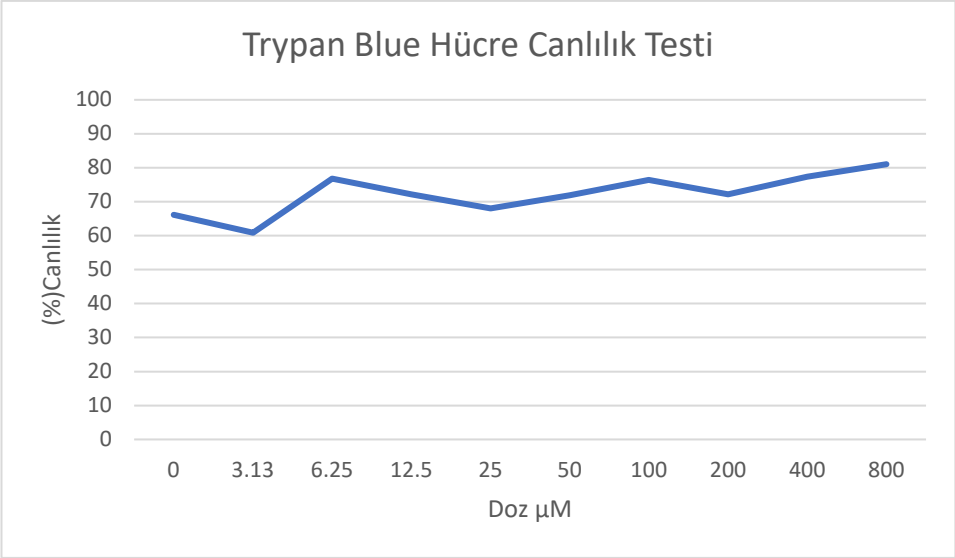


Şekil 4.2. Trolox (A) ve α-Amyrin (B) moleküllerinin CUPRAC testi sonucu ölçülen antioksidan kapasiteleri

Alpha-Amyrin molekülünün her iki antioksidan testleri (DPPH ve CUPRAC) sonucu elde edilen veriler karşılaştırıldığında çalışılan konsantrasyonlarda Alpha-Amyrin molekülünde kuvvetli bir antioksidan aktivite saptanmamıştır.

4.3. Trypan Blue ile Hücre Canlılık Testi Sonuçları

Alpha-Amyrin'in doz seçimi, hücre canlılığı üzerine etkileri ve sitotoksik özelliklerinin belirlenmesi Trypan Blue hücre canlılık testi ile gerçekleştirilmiştir. Lenfosit hücrelerinin seri dilüsyon ile hazırlanan Alpha-Amyrin'in dozları (800 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM) ile 48 saat muamele edilmesinden sonra her bir doz grubu için 10 µl Trypan Blue ve 10 µl hücre süspansiyonu karıştırılarak canlı ve ölü hücre sayıları Neubauer lamında mikroskopta sayılarak belirlenmiştir. Trypan Blue canlılık testi sonucu Alpha-Amyrin'in dozları 400 µM ve 100 µM olarak seçilerek her bir deney grubu için uygulanmıştır. Şekil 4.3'te Trypan Blue hücre canlılığı grafiği verilmiştir.



Şekil 4.3. Lenfositlerin α-Amyrin molekülüne 48 saatlik maruziyeti sonucu trypan blue boyaması ile belirlenen % hücre canlılığı

Trypan Blue hücre canlılık testi bulguları hücre sayısı ve kullanılan doz aralığına bağlı olarak Alpha-Amyrin'in lenfosit hücrelerinde anlamlı derecede yüksek sitotoksik aktivitesinin olmadığını göstermiştir. Sitotoksik aktivite göstermeyen 100 µM ve 400 µM Alpha-Amyrin dozları genotoksisite çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.4. In vitro Mikronükleus (MN) Test Sonuçları

Bu çalışmada negatif kontrol, solvent kontrol, tek başına α-Amyrin, EMS, PAX (Paklitaksel) ve α-Amyrin+ EMS, α-Amyrin+ PAX kombinasyon dozlarının kullanıldığı sekiz doz grubu ile *in vitro* MN (Mikronükleus) testi gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda bütün deney gruplarının ortalama Nükleer Bölünme Indeksi (NDI) değerleri, mononükleer ve binükleer hücrelerde görülen MN frekansları değerlendirilmiştir.

α-Amyrin'in tek başına, EMS , PAX ve kombinasyon dozları ile muamele edilen insan periferal kan lenfosit hücrelerinde uygulanan MN testi sonucunda yapılan mikroskobik gözlemlerle belirlenen NDI ve MN sayısal değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : α-Amyrin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen MN testinde elde edilen nükleer bölünme indeksi ve binükleer hücrelerde mikronükleus değerleri Veriler ortalama ± Standart Sapma şeklinde verilmiştir.

Doz	N	NDI	MN (mononükleer hücre)	MN (binükleer hücre)
Negatif Kontrol	3	1,62±0,05	2,97±0,20	1,59±0,16
Solvent Kontrol	3	1,49±0,14	2,55±1,27	1,28±0,40
100 µM α-Amyrin	3	1,74±0,16	0,00±0,00	0,85±0,34
400 µM α-Amyrin	3	1,55±0,36	1,21±1,21	3,37±0,49
EMS 500 µg/ml	3	1,47±0,03	23,94±2,48	27,90±2,58
PAX 10 µM	3	1,23±0,03[a]	87,40±9,81[b]	277,51±79,34 [ab]
EMS + 400 µM α-Amyrin	3	1,44±0,11	7,38±0,23	23,08±1,19
PAX + 400 µM α-Amyrin	3	1,23±0,00[a]	109,90±29,49[ab]	243,12±99,96 [ab]

[a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$ N: donör sayısı, NDI: Nükleer Bölünme Indeksi, MN: mikronükleus, EMS: etil metansülfonat, PAX: paklitaksel

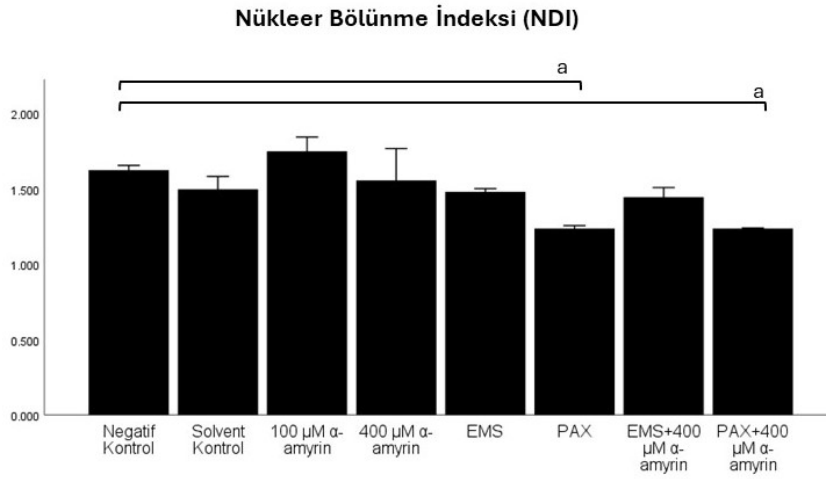
Şekil 4.4'te MN testi sonucu elde edilen tüm doz gruplarına ait ortalama NDI değerleri verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında solvent kontrol grubunda NDI değerlerinde düşüş olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Tek başına 100 µM α-Amyrin doz grubunda NDI değerinin negatif kontrol grubuna göre belirgin bir artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Tek başına 400 µM α-Amyrin doz grubunda NDI değerlerinde negatif kontrole göre bir azalma olduğu ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$).

EMS ve EMS + α-Amyrin kombinasyon doz gruplarında negatif kontrole göre NDI değerlerinde bir düşüş olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında PAX ve PAX + α-Amyrin doz gruplarında NDI değerlerinde belirgin bir azalma olduğu belirlendi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, Şekil 4.4).

Solvent kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tek başına 100 µM α-Amyrin doz grubunda NDI değerinde belirgin bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.4). Tek başına 400 µM α-Amyrin doz grubunda solvent kontrole göre NDI değerinde küçük bir artış olduğu belirlendi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05, Şekil 4.4).

EMS ve α-Amyrin + EMS kombinasyon doz gruplarında solvent kontrol grubuna göre NDI değerlerinde azalma olduğu belirlenmiş olup bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.4). Benzer şekilde PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında NDI değerlerinde belirgin bir azalma olduğu görülmüş ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.4).

α-Amyrin + EMS kombinasyon doz grubunda tek başına EMS doz grubuna göre NDI değerinde bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.4). PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında NDI değerlerinde ise belirgin bir istatistiksel anlamlı bir farklılık kaydedilmedi (p>0,05, Şekil 4.4).



Şekil 4.4. α-Amyrin uygulaması sonucu gerçekleştirilen MN testinden elde edilen NDI oranları [a]: negatif kontrole kıyasla p < 0,05

Şekil 4.5'te tek başına α-Amyrin dozları, negatif kontrol, solvent kontrol, EMS, PAX, α-Amyrin + EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon doz grupları ile muamele eden insan periferal kan lenfosit hücrelerinde gerçekleştirilen MN testi sonucu elde edilen veriler doğrultusunda tüm deney gruplarına ait mononükleer hücrelerde gözlemlenen MN frekansları verilmiştir. Negatif kontrol grubuna göre solvent kontrol grubunda

mononükleer MN frekansında küçük bir azalış olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Tek başına 100 µM α-Amyrin doz grubunda negatif kontrole göre mononükleer MN frekansının bir azalma gösterdiği belirlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). α-Amyrin 400 µM doz grubunda negatif kontrole kıyasla mononükleer MN frekansında belirgin bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$).

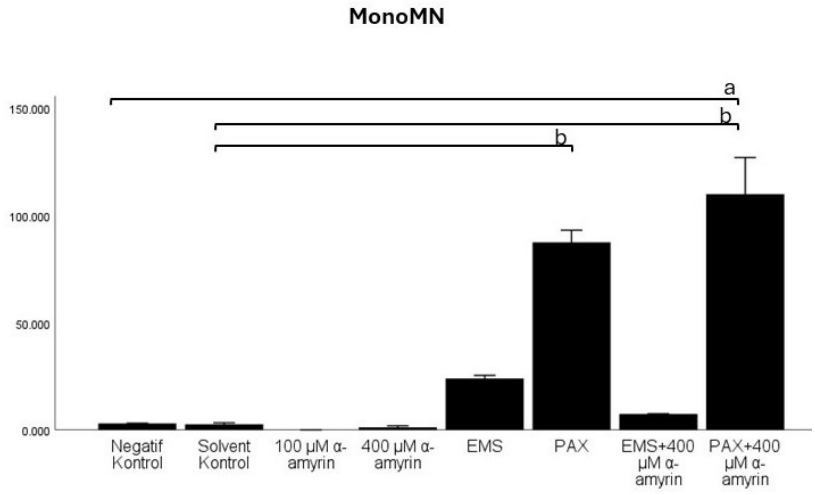
Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EMS ve α-Amyrin + EMS kombinasyon dozlarında mononükleer MN frekansında belirgin bir artış olduğu belirlendi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$, Şekil 4.5). PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında negatif kontrole göre mononükleer MN frekansının belirgin bir artış gösterdiği belirlenmiştir ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, Şekil 4.5).

Solvent kontrol grubuna göre tek başına her iki α-Amyrin doz gruplarında mononükleer MN frekansında bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.5).

EMS ve α-Amyrin + EMS kombinasyon doz grubunda solvent kontrol grubuna göre mononükleer MN frekansının belirgin bir artış gösterdiği ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.5).

Solvent kontrol grubuna göre tek başına PAX doz grubunda mononükleer MN frekansında belirgin bir artış olduğu gözlenmiş olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, Şekil 4.5). α-Amyrin + PAX doz grubunda solvent kontrole göre mononükleer MN frekansında belirgin bir artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.5).

α-Amyrin + EMS kombinasyon doz grubunda tek başına EMS doz grubuna göre mononükleer MN frekansında belirgin bir azalış olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.5). Benzer şekilde α-Amyrin + PAX kombinasyon doz grubunun PAX dozuna kıyasla mononükleer MN frekansında bir artış gösterdiği bulunmuş ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$, Şekil 4.5).



Şekil 4.5. α-Amyrin uygulaması sonucu gerçekleştirilen MN testinde mononükleer hücrelerin sayımı ile elde edilen MN değerleri [a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$

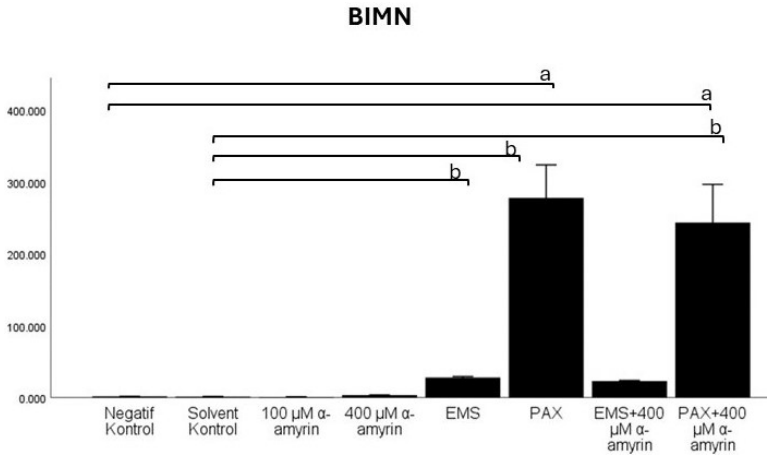
Şekil 4.6'da tek başına α-Amyrin dozları, negatif kontrol, solvent kontrol, EMS, PAX, α-Amyrin + EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon doz grupları ile muamele eden insan periferal kan lenfosit hücrelerinde gerçekleştirilen MN testi sonucuna göre binükleer hücrelerde gözlenen MN oranları şekilde gösterilmektedir. Negatif kontrol grubuna göre solvent kontrol binükleer MN frekansında kısmi bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Tek başına α-Amyrin 100 µM doz grubunda negatif kontrol grubuna göre binükleer MN frekansının belirgin bir azalış gösterdiği belirlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında α-Amyrin 400 µM doz grubunda binükleer MN frekansında belirgin bir artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$).

EMS ve α-Amyrin + EMS kombinasyon doz gruplarında negatif kontrole göre binükleer MN frekansında belirgin bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.6). Negatif kontrole kıyasla PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında binükleer MN frekansının belirgin bir artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, Şekil 4.6).

Solvent kontrol grubuna göre α-Amyrin 100 µM doz grubunda binükleer MN frekansının azalma gösterdiği ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.6). Benzer şekilde α-Amyrin 400 µM doz grubunun binükleer MN frekansında solvent kontrole göre bir artış olduğu belirlendi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05, Şekil 4.6).

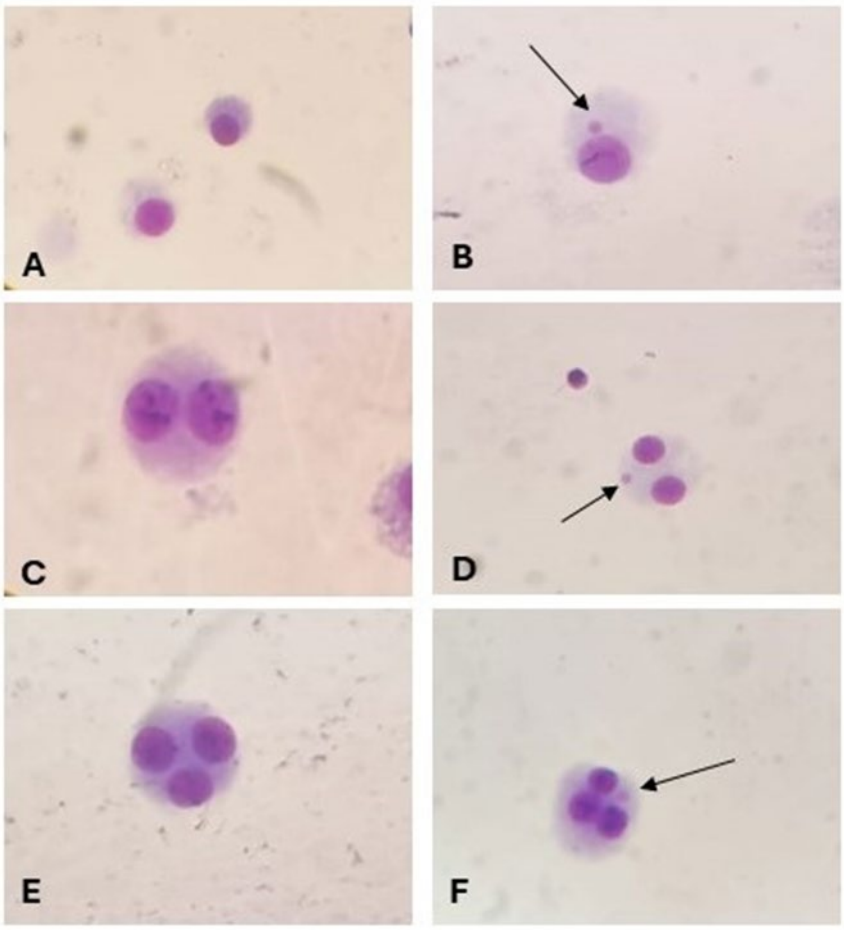
EMS doz grubunda solvent kontrole binükleer MN frekansında belirgin bir artış belirlenmiş ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p<0,05, Şekil 4.6). Bununla birlikte α-Amyrin + EMS kombinasyon grubunda solvent kontrole göre binükleer MN frekansında belirgin bir artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05, Şekil 4.6). PAX ve α-Amyrin + PAX kombinasyon doz gruplarında solvent kontrole kıyasla binükleer MN frekansının belirgin bir artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p<0,05, Şekil 4.6).

EMS doz grubuna göre α-Amyrin + EMS kombinasyon doz grubunda binükleer MN frekansında belirgin bir azalma olmasına rağmen bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.6). Benzer şekilde α-Amyrin + PAX doz grubunda tek başına PAX doz grubuna göre binükleer MN frekansında belirgin bir azalış olduğu gözlenmiş ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.6).



Şekil 4.6. α-Amyrin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen mikronükleus testinde binükleer hücrelerde gözlemlenen MN değerleri [a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$

Mikroskobik incelemelerde gözlenen MN içermeyen mononükleer, binükleer ve polinükleer hücreler, MN içeren mononükleer ve binükleer hücreler Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. İnsan periferal kan lenfosit hücrelerinde mikroskobik incelemelerde gözlenen mikronükleus ve hücrelerin görüntüleri

A) Negatif kontrol, hasarsız mononükleer hücre

B) EMS, mikronükleuslu mononükleer hücre

C) Negatif kontrol, hasarsız binükleer hücre

D) PAX, mikronükleuslu binükleer hücre

E) Negatif kontrol, hasarsız trinükleer hücre

F) EMS, mikronükleuslu trinükleer hücre

4.5. Alkali Komet Testi Sonuçları

Bu çalışmada insan periferal kan lenfosit hücrelerinde negatif kontrol, solvent kontrol, tek başına α-Amyrin, EMS, PAX (Paklitaksel) ve α-Amyrin + EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon dozlarının kullanıldığı sekiz doz grubu ile Alkali Komet testi gerçekleştirilmiştir. Komet testi sonucunda elde edilen Komet Alanı, Komet Uzunluğu, Komet Yoğunluğu, Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk % DNA, Olive Kuyruk Momenti, L/H Oranı, Kafa %DNA, Kafa Çapı parametreleri kullanılarak elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

Komet testi sonucu elde edilen verilen doğrultusunda Komet parametrelerine ait ortalama değerleri çizelge ile verilmiştir. Genetik Hasar İndeksi, Hasarlı Hücre Yüzdesi ve Komet testinde incelenen her bir parametre için aşağıda verilen grafikler ayrı ayrı oluşturulmuştur.

Çizelge 4.2, Kontrol grupları, α-Amyrin, EMS ve PAX'ın tek başına ve α-Amyrin+ EMS, α-Amyrin+PAX kombinasyon dozları ile muamele edilen insan periferal kan lenfosit hücreleriyle gerçekleştirilen Komet testi sonucunda hücrelerde gözlenen hasarlı DNA yoğunluğunun Komet yazılım programında ölçülen kantitatif değerlerini göstermektedir. Çizelge 4.3'te ise α-Amyrin uygulamasının Komet testinde elde edilen Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerleri verilmiştir.

Komet testi sonucu elde edilen Komet Alanı, Komet Uzunluğu, Komet Yoğunluğu, Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk % DNA, Olive Kuyruk Momenti, L/H Oranı, Kafa %DNA, Kafa Çapı verilerine normalite testi uygulanarak non parametrik testlerden Kruskal Wallis testi, Post Hoc testlerinden Bonferroni testi uygulanmıştır. Her bir Komet test parametresine ait bulgular aşağıdaki şekillerde grafiklerle sunulmuştur.

Çizelge 4.2. α-Amyrin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen komet testinin çeşitli parametlere ait ortalama değerler Veriler ortalama ± Standart Sapma şeklinde verilmiştir.

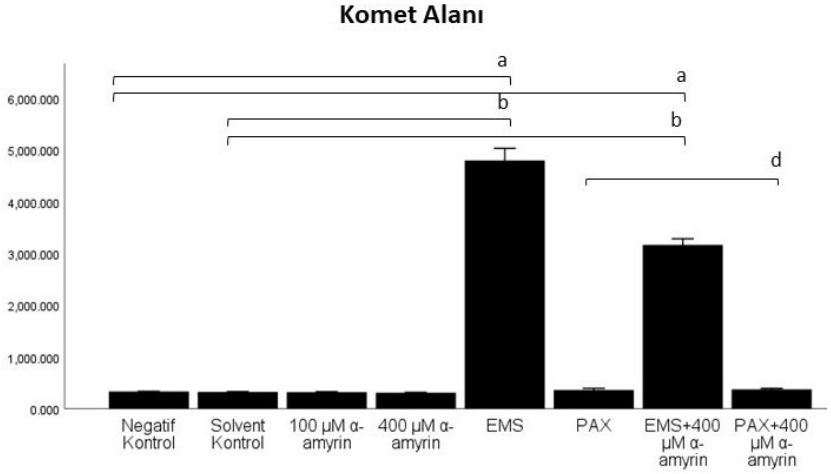
Doz	N	Komet Alanı	Komet Uzunluğu (µm)	Komet yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk %DNA	L/H Oranı	Olive Kuyruk Momenti (µm)	Kafa %DNA
Negatif Kontrol	150	331,08±79,49	25,53±2,93	6389,33±2339,21	3,27±1,25	4,08±3,12	0,17±0,08	0,46±0,35	95,91±3,12
Solvent Kontrol	150	324,55±83,06	26,35±3,50	6270,99±2293,16	4,25±2,08[a]	7,14±7,86[a]	0,24±0,20[a]	0,80±0,84[a]	92,85±7,86[a]
100 µM α-Amyrin	150	318,56±125,28	25,67±5,80	6873,37±2936,34	4,32±4,75	6,79±9,02[a]	0,25±0,33	0,91±2,18	93,20±9,02[a]
400 µM α-Amyrin	150	309,48±72,56	26,13±3,42	6195,42±2212,13	4,61±2,48[a]	8,64±9,54[a]	0,39±1,71[a]	0,97±1,01[a]	91,35±9,54[a]
EMS 500 µg/ml	116	4794,15±2517,64[ab]	122,48±25,38[ab]	33091,16±34982,73[ab]	96,57±21,24[ab]	93,31±10,79[ab]	11,96±8,23[ab]	51,06±11,64[ab]	6,68±10,79[ab]
PAX 10 µM	150	361,35±386,06	29,86±11,79[ab]	6518,7885±3029,84	8,47±11,65[ab]	18,67±13,47[ab]	0,55±0,93[ab]	2,87±5,98[ab]	81,32±13,47[ab]
EMS+ 400 µM α-Amyrin	99	3165,43±1157,78[ab]	111,42±17,76[ab]	13536,87±11098,81[ab]	94,55±17,83[ab]	94,82±5,22[ab]	12,61±7,11[ab]	49,48±9,04[ab]	5,17±5,22[ab]
PAX+400 µM α-Amyrin	148	374,46±234,83[d]	31,63±9,92[abd]	7217,83±2510,59[abd]	10,27±9,52[abd]	23,56±13,00[abd]	0,64±0,60[abd]	3,54±4,52[abd]	76,43±13,00[abd]

[a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$; [d]: tek başına paklitaksel uygulamasında kıyasla $p < 0,05$

Şekil 4.8'de kontrol gruplarıyla beraber α-Amyrin, EMS ve PAX'ın tek başına ve α-Amyrin + EMS, PAX + α-Amyrin kombinasyonlarının uygulaması sonucu Komet Alanı grafiği verilmiştir. Negatif kontrole göre solvent kontrol ve her iki α-Amyrin doz gruplarında Komet Alanında kısmi bir azalma görülmüş olsa da bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). EMS ve α-Amyrin + EMS dozlarında Komet Alanının negatif kontrole göre belirgin bir artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,05$). Bununla birlikte PAX ve α-Amyrin + PAX dozlarında negatif kontrole kıyasla Komet Alanında belirgin bir artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Solvent kontrol ile karşılaştırıldığında her iki α-Amyrin doz grubunda Komet Alanında küçük bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.8). EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında solvent kontrol grubuna göre Komet Alanının belirgin bir şekilde artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,01$, Şekil 4.8). PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında solvent kontrole kıyasla Komet Alanında bir artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.8).

EMS doz grubu ile karşılaştırıldığında α-Amyrin + EMS kombinasyon dozunda Komet Alanında belirgin bir azalma olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.8). Bunun yanında tek başına PAX doz grubuna kıyasla α-Amyrin + PAX kombinasyon grubunda Komet Alanı bir artış göstermiş ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,05$, Şekil 4.8).

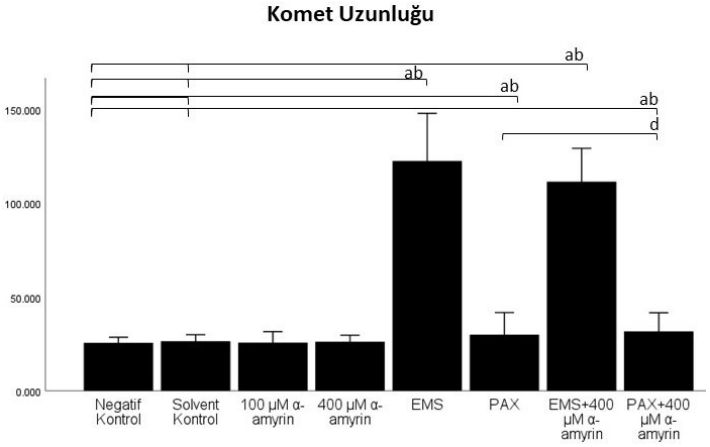


Şekil 4.8. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin komet alanı oranları [a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$; [d]: tek başına paklitaksel uygulamasına kıyasla $p < 0,05$

Şekil 4.9'da her iki kontrol grubu, α-Amyrin, EMS ve PAX'ın tek başına ve α-Amyrin + EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon uygulaması sonucunda Komet Uzunluğunun değişim oranı gösterilmektedir. Negatif kontrole göre solvent kontrol ve her iki α-Amyrin doz gruplarında Komet Uzunluğunda bir değişim olmadığı belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir ($p> 0,05$, Şekil 4.9). EMS ve α-Amyrin + EMS dozlarında negatif kontrole kıyasla Komet Uzunluğunda belirgin bir artış meydana geldiği görülmüş olup bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,01$, Şekil 4.9). Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında Komet Uzunluğunda bir artış olduğu belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p< 0,05$, Şekil 4.9).

Solvent kontrol grubuna göre her iki α-Amyrin doz grubunda Komet Uzunluğunda belirgin bir değişim olmadığı görülmüş olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir ($p >0,05$, Şekil 4.9). EMS ve α-Amyrin + EMS dozlarında solvent kontrole kıyasla Komet Uzunluğunda belirgin bir artış meydana geldiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,01$, Şekil 4.9). Benzer şekilde PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında Komet Uzunluğunun bir artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,001$, Şekil 4.8).

α-Amyrin + EMS kombinasyon doz grubunda EMS doz grubuna göre Komet Uzunluğunda bir azalış olmasına rağmen bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p >0,05, Şekil 4.9). Aynı zamanda tek başına PAX doz grubuna kıyasla α-Amyrin + PAX doz grubunda Komet Uzunluğunda bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p< 0,001, Şekil 4.9).



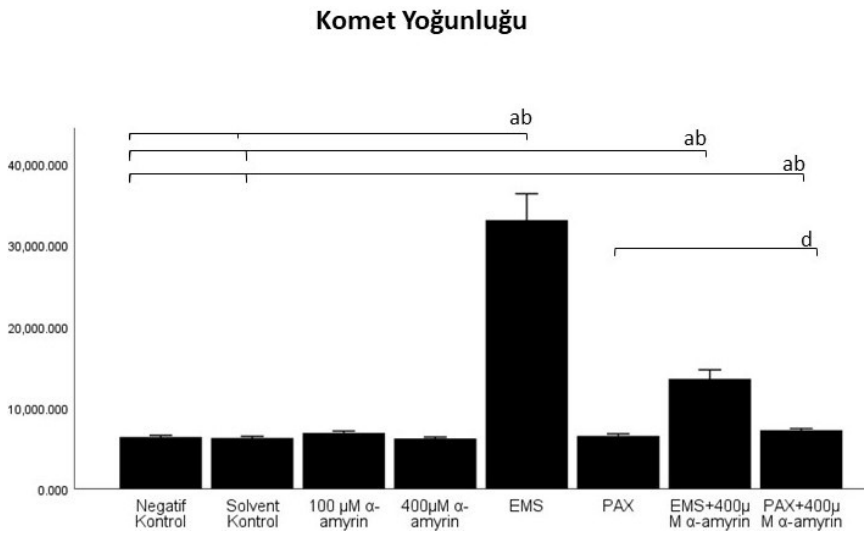
Şekil 4.9. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin komet uzunluğu oranları [a]: negatif kontrole kıyasla p < 0,05; [b]: solvent kontrole kıyasla p < 0,05; [d]: tek başına paklitaksel uygulamasına kıyasla p < 0,05

Şekil 4.10'da kontrol grupları, α-Amyrin, EMS ve PAX'ın tek başına ve α-Amyrin + EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon dozları uygulaması sonucu Komet Yoğunluğunun değişimi verilmiştir. Komet testi sonuçları değerlendirildiğinde negatif kontrol grubuna göre solvent kontrol ve tek başına α-Amyrin 400 µM doz grubunda Komet yoğunluğunda bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p >0,05). Benzer şekilde tek başına α-Amyrin 100 µM doz grubunda Komet Yoğunluğunda bir artış olduğu belirlendi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p >0,05). EMS ve α-Amyrin + EMS dozlarında negatif kontrole kıyasla Komet Yoğunluğunun belirgin bir şekilde artış göstermiş olduğu belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p< 0,001; p< 0,01). Tek başına PAX doz grubunda negatif kontrole göre Komet Yoğunluğunda bir değişim olmadığı görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir (p >0,05).

Bununla birlikte α-Amyrin + PAX kombinasyon dozunda negatif kontrole kıyasla Komet Yoğunluğunda bir artış meydana geldiği belirlenmiş olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p< 0,05$).

Solvent kontrol ile karşılaştırıldığında tek başına α-Amyrin 100 µM doz grubunda Komet Yoğunluğunda bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p >0,05$, Şekil 4.10). Benzer şekilde tek başına α-Amyrin 400 µM doz grubunda solvent kontrole göre Komet Yoğunluğunda bir azalış olduğu belirlenmiş ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p >0,05$, Şekil 4.10). EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında solvent kontrole kıyasla Komet Yoğunluğunun belirgin bir şekilde artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,001$, Şekil 4.10). Solvent kontrole göre PAX doz grubunda Komet Yoğunluğunda bir değişim olmadığı belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmedi ($p >0,05$, Şekil 4.10). α-Amyrin + PAX kombinasyon doz grubunda solvent kontrol grubuna göre Komet Yoğunluğunda belirgin bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,05$, Şekil 4.10).

Tek başına EMS doz grubuna göre α-Amyrin + EMS doz grubunda Komet Yoğunluğunda belirgin bir azalma olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p >0,05$, Şekil 4.10). Aynı zamanda α-Amyrin + PAX doz grubunda PAX doz grubuna kıyasla Komet Yoğunluğunda bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,05$, Şekil 4.10).



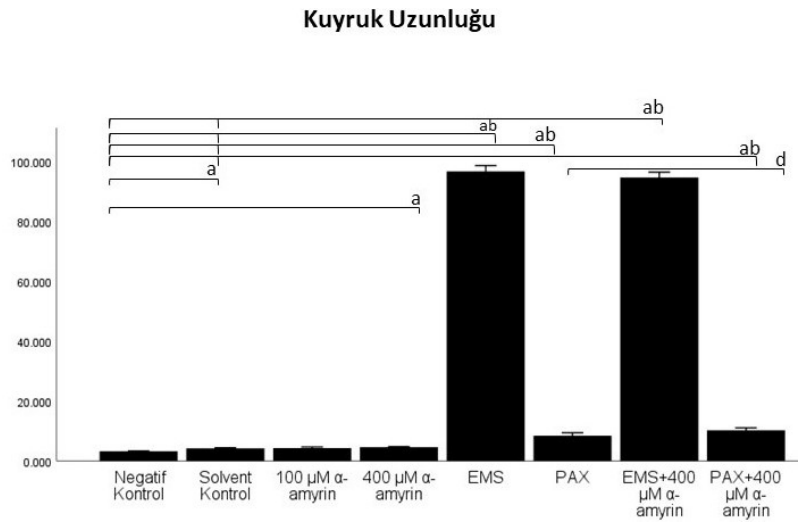
Şekil 4.10. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin komet yoğunluğu oranları [a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$; [d]: tek başına paklitaksel uygulamasına kıyasla $p < 0,05$

Şekil 4.11'de kontrol grupları, α-Amyrin, EMS ve PAX'ın tek başına ve α-Amyrin + EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon dozları uygulaması sonucu Kuyruk Uzunluğunun değişimi verilmiştir. Komet testi sonuçları değerlendirildiğinde negatif kontrol grubuna göre solvent kontrol ve α-Amyrin 400 µM doz gruplarında Kuyruk Uzunluğu oranının artış göstermiş olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p< 0,001$). Tek başına α-Amyrin 100 µM doz grubunda ise negatif kontrole göre Kuyruk Uzunluğu oranında bir artış görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p >0,05$). EMS, α-Amyrin + EMS, PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında negatif kontrole kıyasla Kuyruk Uzunluğu oranının belirgin bir artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p< 0,01$).

Tek başına α-Amyrin 100 µM doz grubunda solvent kontrol grubuna kıyasla Kuyruk Uzunluğunda kısmi bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p >0,05$, Şekil 4.11). Benzer şekilde tek başına α-Amyrin 400 µM dozunda solvent kontrol grubuna göre Kuyruk Uzunluğu oranında bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p >0,05$, Şekil 4.11).

Solvent kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında Kuyruk uzunluğu oranının belirgin bir şekilde artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p< 0,05$; $p< 0,01$, Şekil 4.11). Aynı zamanda PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında solvent kontrol grubuna göre Kuyruk Uzunluğu oranında belirgin bir artış meydana geldiği belirlenmiş olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p< 0,001$; $p< 0,01$, Şekil 4.11).

EMS doz grubuna göre α-Amyrin + EMS kombinasyon dozunda Kuyruk Uzunluğu oranında bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p >0,05$, Şekil 4.11). Aynı zamanda tek başına PAX doz grubuna kıyasla PAX + α-Amyrin doz grubunda Kuyruk Uzunluğu oranının artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p< 0,05$, Şekil 4.11).

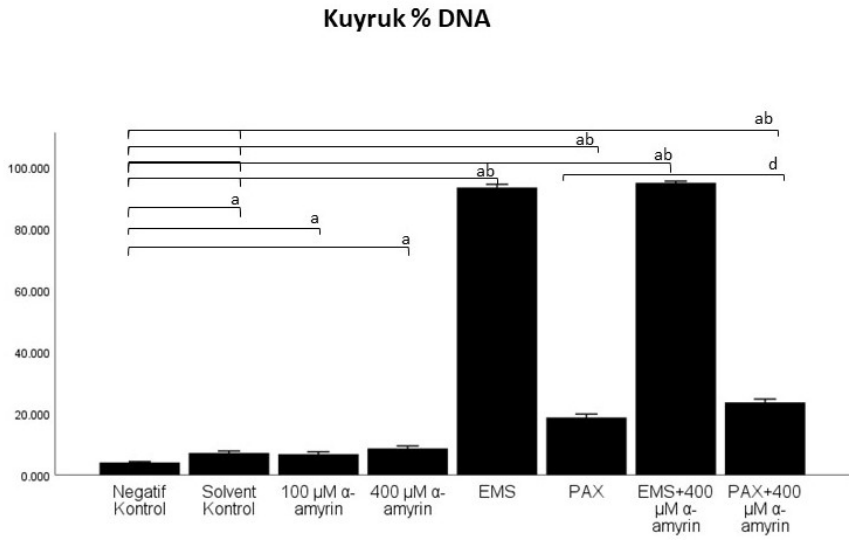


Şekil 4.11. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin kuyruk uzunluğu oranları [a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$; [d]: tek başına paklitaksel uygulamasına kıyasla $p < 0,05$

Şekil 4.12'de kontrol grupları, α-Amyrin, EMS ve PAX'ın tek başına ve α-Amyrin + EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon dozları uygulaması sonucu Kuyruk % DNA oranının değişimi verilmiştir. Solvent kontrol, α-Amyrin 100 µM ve 400 µM doz gruplarında negatif kontrole göre Kuyruk % DNA oranında belirgin bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,05$; $p<0,001$). EMS, α-Amyrin + EMS, PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında negatif kontrol grubuna göre Kuyruk % DNA oranının belirgin bir artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).

Solvent kontrol grubuna kıyasla α-Amyrin 100 µM doz grubunda Kuyruk % DNA oranında küçük bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.12). α-Amyrin 400 µM doz grubunda ise solvent kontrole göre Kuyruk % DNA oranında bir artış olduğu görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.12). EMS ve α-Amyrin + EMS dozlarında solvent kontrol grubuna kıyasla Kuyruk % DNA oranının belirgin bir şekilde artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,01$, Şekil 4.12). Benzer şekilde PAX ve α-Amyrin + PAX dozlarında solvent kontrole göre Kuyruk % DNA oranının belirgin bir artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,01$, Şekil 4.12).

EMS + α-Amyrin doz grubunda EMS doz grubuna kıyasla Kuyruk % DNA bir artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.12). Benzer şekilde α-Amyrin + PAX kombinasyon doz grubunda tek başına PAX doz grubuna göre Kuyruk % DNA oranında bir artış meydana geldiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$, Şekil 4.12).



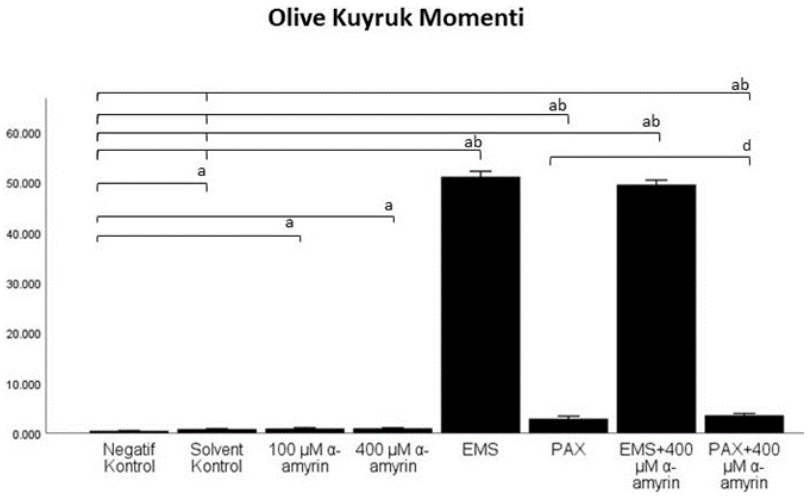
Şekil 4.12. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin kuyruk % DNA oranları [a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$; [d]: tek başına paklitaksel uygulamasına kıyasla $p < 0,05$

Şekil 4.13'te negatif ve solvent kontroller ile tek başına α-Amyrin, EMS, PAX ve kombinasyon dozlarının uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet testi parametrelerinden Olive Kuyruk Momenti değişimi verilmiştir. Komet testi sonuçları değerlendirildiğinde negatif kontrol grubuna göre solvent kontrol her iki α-Amyrin dozu (100 ve 400 µM) doz gruplarında Olive Kuyruk Momenti uzunluğunda bir artış meydana geldiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0,001$; $p <0,05$; $p<0,001$). EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında negatif kontrole kıyasla Olive Kuyruk Momenti uzunluğunun bir artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$). Benzer şekilde PAX, α-Amyrin + PAX doz gruplarında negatif kontrol grubuna göre Olive Kuyruk Momenti uzunluğunun belirgin bir artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,01$).

Solvent kontrol grubuna göre her iki α-Amyrin doz gruplarında Olive Kuyruk Momenti uzunluğunda bir değişim olmadığı belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmedi ($p >0,05$, Şekil 4.13). EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında solvent kontrole göre Olive Kuyruk Momentinde belirgin bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,01$, Şekil 4.13).

Bununla birlikte solvent kontrol ile karşılaştırıldığında PAX ve α-Amyrin + PAX dozlarında Olive Kuyruk Momenti uzunluğunun bir artış gösterdiği belirlenmiş olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p<0,001; p<0,01, Şekil 4.13).

α-Amyrin + EMS doz grubunda tek başına EMS doz grubuna göre Olive Kuyruk Momenti uzunluğunda belirgin bir azalma olduğu görülmesine rağmen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p >0,05, Şekil 4.13). α-Amyrin + PAX kombinasyon doz grubunda ise tek başına PAX dozuna göre Olive Kuyruk Momenti uzunluğunda bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p <0,05, Şekil 4.13).



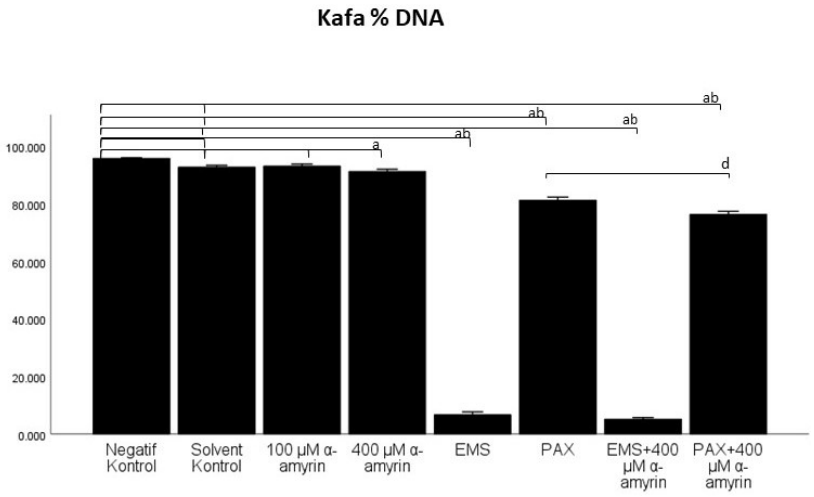
Şekil 4.13. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin olive kuyruk momenti oranları [a]: negatif kontrole kıyasla p < 0,05; [b]: solvent kontrole kıyasla p < 0,05; [d]: tek başına paklitaksel uygulamasına kıyasla p < 0,05

Şekil 4.14'te kontrol grupları, tek başına α-Amyrin dozları, EMS ve PAX' ın tek başına ve α-Amyrin + EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon dozları uygulaması sonucu Kafa % DNA oranının değişimi verilmiştir. Solvent kontrol ve α-Amyrin doz (100 ve 400 µM) gruplarında Kafa % DNA oranının negatif kontrole göre belirgin bir azalma gösterdiği belirlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p <0,01; p <0,05; p <0,001). EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında negatif kontrole göre Kafa % DNA oranında dramatik bir azalma meydana geldiği ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p <0,01). Bununla birlikte PAX ve α-Amyrin + PAX dozlarında Kafa % DNA oranının negatif kontrole kıyasla belirgin bir azalma gösterdiği ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p <0,01).

Tek başına α-Amyrin doz 100 µM doz grubunda solvent kontrole göre Kafa % DNA oranında belirgin bir değişim olmadığı belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir (p>0,05, Şekil 4.14). Solvent kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tek başına α-Amyrin 400 µM doz grubunda Kafa % DNA oranında küçük bir azalış olmasına rağmen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.14).

EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında solvent kontrole göre Kafa % DNA oranında dramatik bir azalma olduğu belirlenmiş ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p <0,01). Aynı zamanda PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında solvent kontrole kıyasla Kafa % DNA oranının belirgin bir azalma gösterdiği belirlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p <0,001; p <0,01, Şekil 4.14).

α-Amyrin + EMS kombinasyon dozunda tek başına EMS doz grubuna göre Kafa % DNA oranında belirgin bir azalma olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05, Şekil 4.14). Benzer şekilde α-Amyrin + PAX dozunda PAX doz grubuna göre Kafa % DNA oranında bir azalma meydana geldiği ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p <0,05, Şekil 4.14).

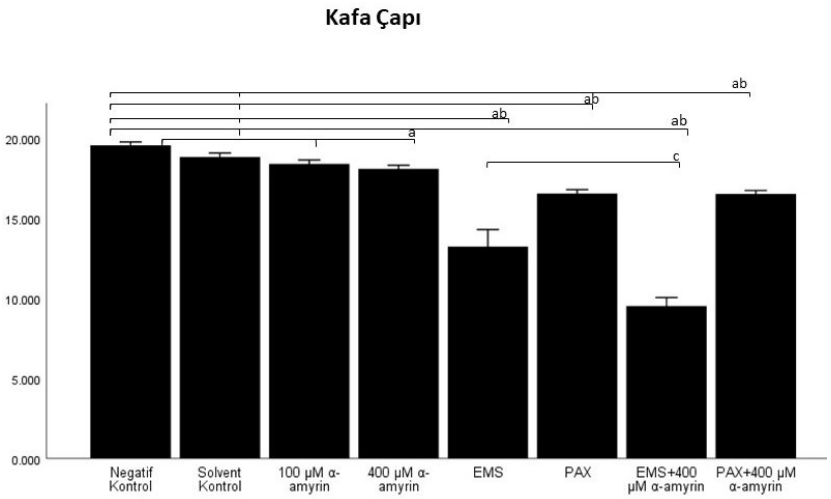


Şekil 4.14. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin kafa % DNA oranları [a]: negatif kontrole kıyasla p < 0,05; [b]: solvent kontrole kıyasla p < 0,05; [d]: tek başına paklitaksel uygulamasına kıyasla p < 0,05

Şekil 4.15'te α-Amyrin dozları, kontrol grupları, EMS, PAX ile α-Amyrin + EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon uygulaması sonucu Kafa Çapının değişimi verilmiştir. Negatif kontrole grubuna göre solvent kontrol grubunda Kafa Çapında bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Tek başına α-Amyrin doz (100 ve 400 μM) gruplarında negatif kontrole kıyasla Kafa Çapında bir azalma meydana geldiği görülmüş ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p <0,05$; $p <0,001$). Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında Kafa Çapında belirgin bir azalma olduğu belirlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p <0,01$). Benzer şekilde PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında negatif kontrole göre Kafa Çapının bir azalış gösterdiği belirlenmiş ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p <0,001$).

Solvent kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki α-Amyrin doz grubunda Kafa Çapında küçük bir azalma olduğu görülse de bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.15). EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında solvent kontrole göre Kafa Çapının belirgin bir azalma gösterdiği belirlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p <0,01$, Şekil 4.15). Benzer şekilde PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında solvent kontrole kıyasla Kafa Çapında belirgin azalma meydana geldiği ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p <0,001$, Şekil 4.15).

EMS doz grubuna göre α-Amyrin + EMS kombinasyon dozunda Kafa Çapında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüş ve azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p <0,001$, Şekil 4.15). PAX ve α-Amyrin + PAX doz grupları arasında Kafa Çapında belirgin bir değişim olmadığı belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmedi ($p>0,05$, Şekil 4.15).



Şekil 4.15. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin kafa çapı oranları
[a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$; [c]: tek başına EMS uygulamasına kıyasla $p < 0,05$

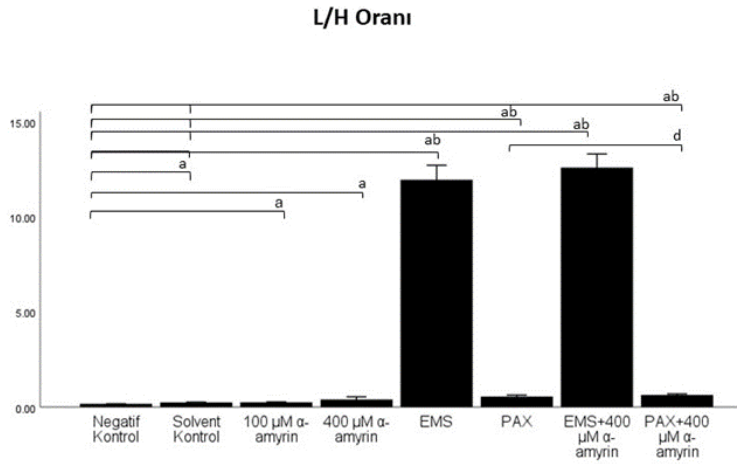
Şekil 4.16'da kontrol grupları ile birlikte tek başına α-Amyrin, EMS, PAX ve kombinasyon dozlarının uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet testi parametrelerinden L/H Oranı değişimleri verilmiştir. Komet testi sonuçları değerlendirildiğinde solvent kontrol grubunda L/H Oranında negatif kontrole göre belirgin bir yükseliş olduğu ve bu yükselişin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,001$). Tek başına α-Amyrin 100 ve 400 µM doz gruplarında L/H Oranının negatif kontrole göre bir artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p <0,05$; $p <0,001$).

EMS ve α-Amyrin + EMS, PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında L/H Oranının negatif kontrole bir artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p <0,01$, Şekil 4.16).

Solvent kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tek başına α-Amyrin 100 µM doz grubunda L/H Oranında belirgin bir değişim olmadığı görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir ($p>0,05$, Şekil 4.16). α-Amyrin 400 µM doz grubunda L/H Oranının solvent kontrol grubuna göre bir artış göstermiş olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.16).

Solvent kontrol grubuna kıyasla EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında L/H Oranı değişiminde belirgin bir artış olduğu görülmüş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p <0,05; p <0,01, Şekil 4.16). Bununla birlikte PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında L/H Oranında bir artış meydana geldiği belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p <0,001; p <0,01, Şekil 4.16).

EMS doz grubuna göre α-Amyrin + EMS kombinasyon doz grubunda L/H Oranında belirgin bir artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.16). Ayrıca PAX doz grubuna göre α-Amyrin + PAX doz grubunda L/H Oranında bir artış meydana geldiği belirlendi ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p <0,05, Şekil 4.16).



Şekil 4.16. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin L/H oranları
[a]: negatif kontrole kıyasla p < 0,05; [b]: solvent kontrole kıyasla p < 0,05; [d]: tek başına paklitaksel uygulamasına kıyasla p < 0,05

Çizelge 4.3'te ise α-Amyrin uygulaması sonunda gerçekleştirilen Komet testinde elde edilen Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. α-Amyrin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen komet testinde elde edilen genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi ortalama değerleri Veriler ortalama ± Standart Sapma şeklinde verilmiştir.

Doz	N	Genetik Hasar İndeksi	Hasarlı Hücre Yüzdesi
Negatif Kontrol	3	0,58±0,34	0,08±0,11
Solvent Kontrol	3	0,93±0,35	0,17±0,15
100 µM α-Amyrin	3	0,89±0,46	0,15±0,16
400 µM α-Amyrin	3	1,19±0,31	0,31±0,19
EMS 500 µg/ml	3	3,64±0,25[ab]	0,91±0,05[ab]
PAX 10 µM	3	2,15±0,46[a]	0,78±0,23[a]
EMS + 400 µM α-Amyrin	3	3,21±0,46[ab]	0,80±0,21[a]
PAX + 400 µM α-Amyrin	3	2,49±0,85[a]	0,94±0,07[ab]

[a]: negatif kontrole kıyasla $p < 0,05$; [b]: solvent kontrole kıyasla $p < 0,05$ N: donör sayısı, EMS: etil metansülfonat, PAX: paklitaksel

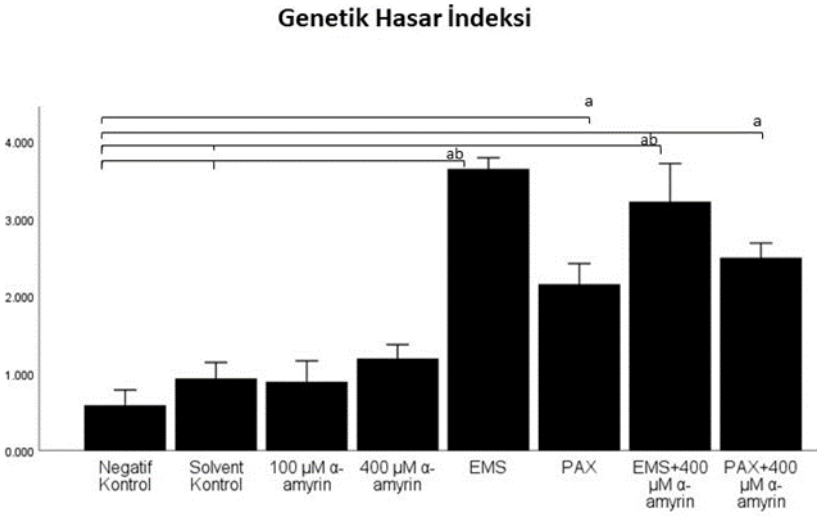
Şekil 4.17'de tek başına α-Amyrin, kontrol grupları, EMS, PAX ve α-Amyrin+ EMS, α-Amyrin + PAX kombinasyon dozları uygulama sonrası Komet testinden elde edilen Genetik Hasar İndeksi verilmiştir. Negatif kontrole göre solvent kontrol grubunda Genetik Hasar İndeksinde belirgin bir artış olduğu görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tek başına α-Amyrin 100 ve 400 µM doz gruplarında negatif kontrol grubuna kıyasla Genetik Hasar İndeksinin belirgin bir artış göstermiş olduğu belirlenmiş ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$).

EMS ve α-Amyrin + EMS kombinasyon doz gruplarında Genetik Hasar İndeksinde negatif kontrole göre bir artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p <0,05$, Şekil 4.17). Benzer şekilde PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında negatif kontrole kıyasla Genetik Hasar İndeksinin belirgin bir artış göstermiş olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p <0,05$, Şekil 4.17).

Solvent kontrol grubuna göre tek başına α-Amyrin 100 µM doz grubunda Genetik Hasar İndeksinde kısmi bir azalma olduğu ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.17). α-Amyrin 400 µM doz grubunda solvent kontrole göre Genetik Hasar İndeksinin belirgin bir artış gösterdiği fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.17).

Solvent kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EMS ve α-Amyrin + EMS doz gruplarında Genetik Hasar İndeksinin belirgin bir artış gösterdiği belirlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p <0,05, Şekil 4.17). Bununla birlikte PAX ve α-Amyrin + PAX doz gruplarında solvent kontrole göre Genetik Hasar İndeksinde belirgin bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.17).

α-Amyrin + EMS doz grubunda tek başına EMS doz grubuna göre Genetik Hasar İndeksinde belirgin bir azalma meydana geldiği ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.17). Ayrıca PAX doz grubuna göre α-Amyrin + PAX kombinasyon grubunda Genetik Hasar İndeksinde belirgin bir artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05, Şekil 4.17).



Şekil 4.17. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin genetik hasar indeksi oranları [a]: negatif kontrole kıyasla p < 0,05; [b]: solvent kontrole kıyasla p < 0,05

Şekil 4.18'de kontrol grupları, tek başına α-Amyrin, EMS, PAX ve α-Amyrin+ EMS, α-Amyrin+ PAX kombinasyon dozları uygulama sonrası Komet testinden elde edilen Hasarlı Hücre Yüzdesi oranları verilmiştir. Negatif kontrole göre solvent kontrol grubunda Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında bir artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). α-Amyrin 100 µM doz grubunda Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında negatif kontrole göre bir artış olduğu görülmüş olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında α-Amyrin 400 µM doz grubunda Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında belirgin bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığı belirlendi ($p>0,05$).

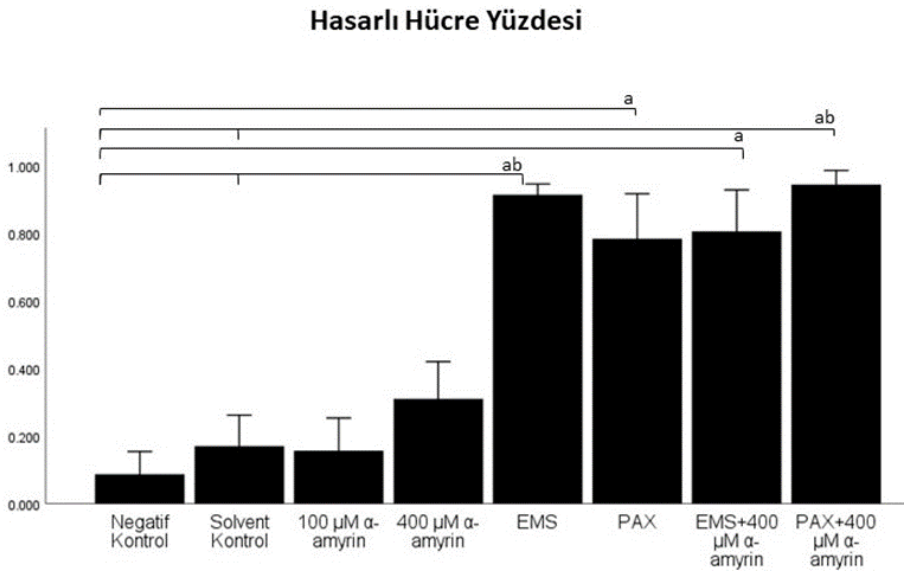
EMS ve α-Amyrin+ EMS kombinasyon doz gruplarında negatif kontrole kıyasla Hasarlı Hücre Yüzdesi oranının artış belirlendi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p <0,05$, Şekil 4.18). Bununla birlikte PAX ve α-Amyrin+ PAX kombinasyon doz gruplarında Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında negatif kontrole göre belirgin bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p <0,05$, Şekil 4.18).

Solvent kontrol grubuna göre α-Amyrin 100 µM dozunda Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında kısmi bir azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.18). Tek başında α-Amyrin 400 µM doz grubunda solvent kontrol grubuna kıyasla Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında belirgin bir artış olduğu görülürken bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$, Şekil 4.18).

EMS doz grubunda solvent kontrole göre Hasarlı Hücre Yüzdesi oranının belirgin bir şekilde artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p <0,05$, Şekil 4.18). Bununla birlikte solvent kontrol grubuyla karşılaştırıldığında α-Amyrin+ EMS kombinasyon doz grubunun Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında belirgin bir artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.18). Benzer şekilde PAX doz grubunda Hasarlı Hücre Yüzde oranı solvent kontrol grubuna göre artış göstermesine karşın bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.18).

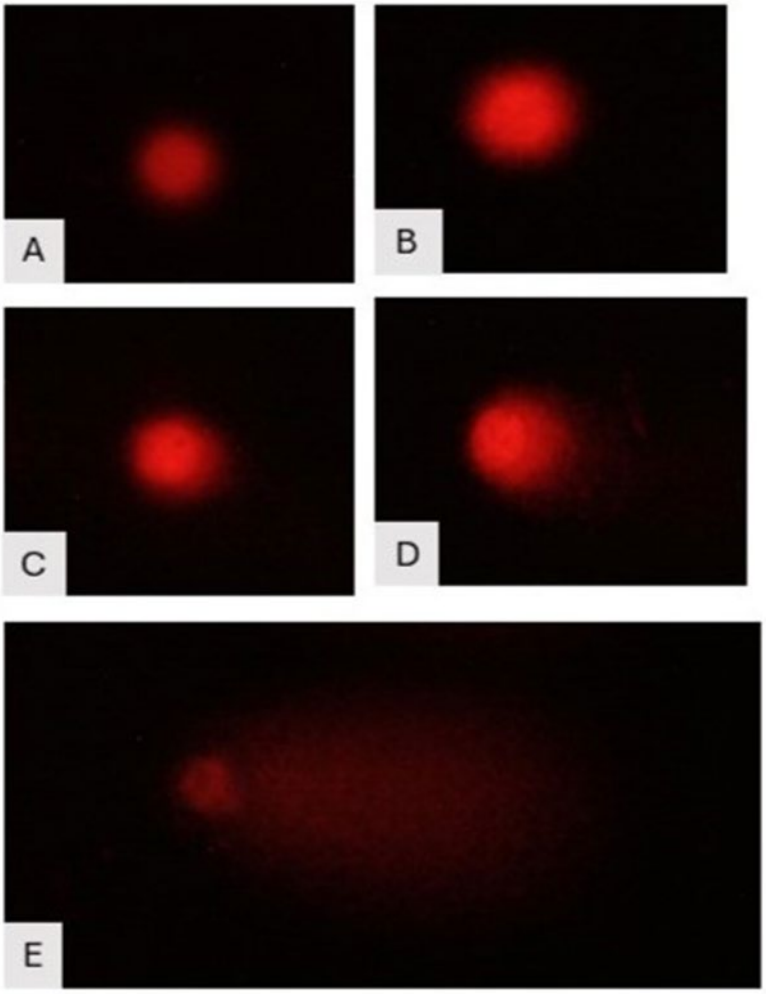
α-Amyrin+PAX kombinasyon doz grubunda Hasarlı Hücre Yüzdesi oranı solvent kontrol grubuna göre belirgin bir artış göstermiş olup bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p <0,05, Şekil 4.18).

Tek başına EMS doz grubuyla ile karşılaştırıldığında EMS + α-Amyrin kombinasyon doz grubunda Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında bir azalma olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05, Şekil 4.18). Benzer şekilde α-Amyrin+PAX kombinasyon doz grubunda tek başına PAX doz grubuna göre Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında belirgin bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0,05, Şekil 4.18).



Şekil 4.18. α-Amyrin uygulaması ile gerçekleştirilen komet testinin hasarlı hücre yüzdesi oranları [a]: negatif kontrole kıyasla p < 0,05; [b]: solvent kontrole kıyasla p < 0,05

İnsan periferal kan lenfosit hücrelerinde floresans mikroskobik incelemede gözlemlenen hücrelere ilişkin görseller Şekil 4.19'da verilmiştir. Genetik Hasar İndeksi (GHİ) değerlerinin belirlenmesinde Şekil 4.19'da gösterilen DNA hasarı şiddetinin değişimi esas alınmıştır.



Şekil 4.19. İnsan periferal kan lenfosit hücrelerinde hasarlı DNA varlığı ile gözlemlenen hücreler ilişkin görseller. DNA hasarı, insan periferal kan lenfosit hücrelerinde DNA kuyruk alanı (%) ve komet kuyruk uzunluğu olarak hesaplanır. DNA kuyruk alanı (%) veya DNA kuyruk uzunluğu ne kadar yüksekse, hasar o kadar anlamlı olur. Tip 0'da DNA hasarı yoktur; Tip 1-4 hücrede ise DNA hasarının derecesi giderek artmaktadır. A) Negatif kontrol hasarsız hücre; B) α-Amyrin 100 µM, Tip 1; C) Solvent kontrol, Tip 2; D) PAX 10 µM, Tip 3; E) EMS 500 µg /ml, Tip 4

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler doğal yapıda olmaları, kolay ve ucuz yollarla üretilebilir olmaları, sentetik ve kimyasal ilaçlardan daha az yan etki oluşturmaları gibi özellikleriyle çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Günlük hayatlarında insanların karşılaşmış olduğu çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar DNA üzerinde zarar verici etkileriyle hasara neden olmaktadır. Genotoksik ajanların DNA molekülü üzerinde oluşturdukları mutajenik etki sonucunda doku hasarı, yaşlanma ve başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle genotoksik ajanların genetik materyal DNA molekülü üzerindeki hasar verici etkilerini inhibe ederek en aza indirgeyen ya da ortadan kaldıran antigenotoksik ajanların tanımlanmasına yönelik çalışmalar uzun yıllardır ilgi odağı haline gelmiş olup bu anlamda bitkisel doğal bileşenlerin antigenotoksik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bitkiler aleminde bol miktarda bulunan pentasiklik triterpenlerin, yüksek karbonhidrat ve yağ ile beslenen metabolik sendrom modellerinde antiinflamatuar, antioksidan, antiadipozite ve kardiyoprotektif aktivite gibi çeşitli biyolojik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, son zamanlarda pentasiklik triterpenlerin antikanser potansiyellerinin değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır (Bishayee ve diğerleri, 2011; Liby ve Sporn, 2012; Parikh ve diğerleri, 2014; Shanmugam ve diğerleri, 2014; Padmavathi ve diğerleri, 2017; Žiberna ve diğerleri, 2017).

α-Amyrin'in antidiyabetik, antidislipidemik, antioksidan, hepatoprotektif ve antiinflamatuar etkiler gibi çeşitli biyolojik özelliklerinin belirlendiği çeşitli çalışmalar olmasına rağmen, yapılan literatür taramasında Alpha-Amyrin molekülünün potansiyel genotoksik/antigenotoksik etkilerinin *in vitro* koşullarda insan periferik kan lenfosit kültürleri ile hücresel düzeyde araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu doğrultuda bu çalışmada Alpha-Amyrin molekülünün tek başına herhangi bir genotoksik etkisinin olup olmadığının yanında genotoksik olduğu bilenen EMS ve PAX ile indüklenmiş DNA hasarlarına karşı antigenotoksik aktivitesinin değerlendirilmiştir. Aynı zamanda biyolojik özelliklerinin daha güçlü aydınlatabilmesi adına Alpha-Amyrin molekülünün sitotoksik özellikleri ve antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında Alpha-Amyrin molekülünün antioksidan aktivitesi DPPH ve CUPRAC testleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ile oluşturulan grafiklerde Alpha-Amyrin molekülün tek başına kuvvetli bir antioksidan özellik göstermediği DPPH testinde 2125 µM IC_{50} değeri ve CUPRAC testinde ise 0,01627 µM Trolox eşdeğerliği değerlerine bakılarak saptanmıştır. Aynı zamanda literatür bilgileri yapılan tez çalışmasını destekler niteliktedir. Bu doğrultuda *Rhaponticum carthamoides* bitkisinin yapraklarından izole edilen Alpha-Amyrin'in insan keratinosit hücrelerinde (HaCaT) UVB radyasyonun hasar verici etkilerine karşı koruyucu potansiyeli ve antioksidan aktivitesinin değerlendirilmiş olduğu bir çalışmada (Biskup ve diğerleri, 2012), kullanılan α-Amyrin'in 5,10,20 ve 40 µg/ml dozlarının insan keratinosit hücrelerinde (HaCaT) DPPH testi sonucunda elde edilen radikal süpürücü aktivite değeri IC_{50}: >150 µg/mL olarak belirlenmiş olup Alpha-Amyrin'in doğrudan antioksidan aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir. Bu doğrultuda yapılan tez çalışmasından elde edilen sonuçların literatürü destekler nitelikte olduğu görülmüştür (Biskup ve diğerleri, 2012).

Aynı zamanda Güneydoğu Asya ve Güney Amerika ülkelerinde tıbbi tedavide yaygın olarak kullanılan *Celastrus hindsii* bitkisinin yapraklarından izole edilen α-β Amyrin karışımının antioksidan aktiviteleri ile antiksantinoksidaz ve antitirozinaz etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Viet ve diğerleri, 2021), α-β Amyrin karışımının antioksidan aktiviteleri DPPH ve ABTS testleriyle belirlenmiştir. α-β Amyrin karışımının DPPH testi sonucunda 125.55 µg/mL IC_{50} değeri ve ABTS testi sonucunda ise 155.28 µg/mL IC_{50} değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada α-β Amyrin karışımının antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen antioksidan aktiviteye ilişkin bulgular, Alpha-Amyrin molekülünün tek başına zayıf antioksidan aktivite gösterdiğini, ancak izomeri olan β-Amyrin ile karışımının daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada Alpha-Amyrin molekülünün antioksidan aktivitesi iki farklı antioksidan aktivite testi DPPH ve CUPRAC testleriyle değerlendirilmiştir. Her iki antioksidan aktivite testinden elde edilen veriler karşılaştırıldığında çalışılan konsantrasyonlarda Alpha-Amyrin molekülünün kuvvetli bir antioksidan aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Böylece çalışmada kullanılan DPPH ve CUPRAC antioksidan aktivite testlerinin birbirini destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

Alpha-Amyrin molekülünün kanser hücre hatları üzerinde büyüme baskılayıcı etkileriyle sitotoksik aktivitesinin araştırıldığı çok sayıda literatür mevcuttur. Buna karşın, malign karakterde olmayan bir hücrede ne derece sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bilinmemektedir. Alpha-Amyrin'in sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi ve aynı zamanda genotoksisite testlerinde genotoksik ajanlar ile kombinasyonlarında kullanılacak olan dozun belirlenmesi amacıyla Trypan Blue hücre canlılık testi gerçekleştirilmiştir. Alpha-Amyrin'in seri dilüsyon ile hazırlanan konsantrasyon aralığında lenfosit hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesinin düşük olduğu görülmüş ve hücre canlılığına olumsuz etki yaratmayan 100 ve 400 µM dozları genotoksisite çalışmalarında kombinasyon dozu olarak seçilmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında Alpha-Amyrin molekülünün insan larenks kanser hücre hattı Hep2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik aktivitelerinin MTT test yöntemi ile değerlendirilmiş olduğu bir çalışmada, Alpha-Amyrin'in IC_{50} değerinin 69,32 µM olduğu belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara dayanarak, Alpha-Amyrin'in Hep2 hücrelerinde hücre ölümünü indükleyerek antiproliferatif etki göstermesi nedeniyle Alpha-Amyrin'in çeşitli kanser türleri üzerinde terapötik potansiyele sahip olabileceği önerilmiştir (Mirunalini ve diğerleri, 2016). Hep2 hücrelerindeki daha düşük IC_{50} değeri ile gözlenen hücreler arası karakterlerin farklılığı, Alpha-Amyrin maruziyetine karşılık farklı yanıtların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

Literatür bilgileri incelendiğinde pentasiklik triterpen Alpha-Amyrin'in genotoksisitesi hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında Alpha-Amyrin molekülünün tek başına genotoksik etkileri ve genotoksik ajanlar (EMS ve PAX) ile kombine edildiğindeki antigenotoksik etkilerinin *in vitro* yöntemlerle insan lenfositlerinde hücresel düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda tez çalışmasında Alpha-Amyrin'in genotoksik antigenotoksik özellikleri in vitro genotoksisite test yöntemlerinde MN ve Komet testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Mikronükleuslar klastojenik ya da anojenik maddelerin etkisi sonucu bölünme aşamasında geride kalan tam kromozom veya kromozom fragmentlerinin çevresinde oluşan çekirdek zarı sebebiyle meydana gelen oluşumlardır (Fenech, 2000). Binükleer hücrelerdeki mikronükleus varlığı genellikle genomik istikrarsızlığı veya hasarı ortaya koymaktadır. Binükleer hücrelerde mikronükleus bulunması, genotoksik ajanlara maruz

kalma, DNA hasarı, kromozomal istikrarsızlık, hücre döngüsü kontrol noktalarındaki kusurlar gibi çeşitli durumları karakterize etmektedir (Fenech, 2007). 1985 yılından bu yana, insan periferik kan lenfositlerindeki sitokinez engelleme Mikronükleus testi (CBMN), birçok laboratuvar tarafından genotoksik etkinin değerlendirilmesi için optimal bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Bilindiği gibi, bölünen hücrelerde kromozomal hasarların bir sonucu olarak mikronükleus sayısının arttığı ve bu iki biyolojik sonuç arasında pozitif bir korelasyon olduğu bilinmektedir (Fenech ve Morley 1985). İnsanların periferik kan lenfositlerindeki mikronukleus frekanslarının takibi, biyolojik, fiziksel ve kimyasal maddelerin etkilerini tahmin etmek için kullanılan etkili bir test sistemidir. Mikronukleus testi, farklı organizmaların kirleticilere maruz kalmasının sitogenetik etkisini değerlendirmek için de laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Syaza ve diğerleri 2017).

Nükleer Bölünme Indeksi (NDI), hücre proliferasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilir ve genel sitotoksisitenin bir ölçüsüdür; lenfositlerin mitojenik uyarım sonrası hücre döngüsü ilerlemesini tanımlamak için hücrelerin göreceli frekansları kullanılabilir ve bu maruz kalınan etki tarafından nasıl etkilendiği belirlenebilir (Fenech, 2000; Eastmond ve Tucker, 1989).

NDI'nin anormal bir şekilde artması veya azalması, hücrenin çoğalma yeteneğine bağlı olabilir (Ionescu ve diğerleri, 2011). Bu konudaki hipotez, daha fazla kromozomal hasara sahip hücrelerin ya hücre bölünmesinden önce öleceği ya da bu aşamaya girmeye daha az olası olacağı yönündedir (Mello ve diğerleri 1974; Nath ve Ong 1990). En düşük NDI değeri 1.0'dır; bu değer, tüm canlı hücrelerin sitokinezi engelleme süresince bölünmeyi başaramadığı ve bu yüzden tüm hücrelerin mononükleer özellikte olacağı durumlarda oluşur. Eğer tüm canlı hücreler bir bölünme tamamlarsa, hücrelerin hepsi binükleer olur ve NDI değeri 2.0 olur. Bir NDI değeri 2.0'den büyük olabilir; bu durumda belirli canlı hücrelerin sitokinezi engelleme evresinde birden fazla nükleer bölünme tamamladığı ve dolayısıyla iki çekirdekten daha fazlasını içerdiği anlamına gelmektedir (Fenech, 2007).

Literatür bilgileri incelendiğinde Alpha-Amyrin molekülü ile ilgili Mikronükleus testi çalışmasına rastlanmamasına rağmen Alpha-Amyrin içeren *Protium heptaphyllum* türleri ve diğer terpen bileşikleri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. *Protium heptaphyllum (Aubl.) March* reçinesi, α-Amyrin (ursane) ve β-Amyrin (oleane) triterpenlerini, mono ve

seskiterpenleri içeren uçucu bir yağ karışımından oluşur. De Lima ve diğerleri (2016) tarafından yürütülen bu çalışmada, *P. heptaphyllum* reçinesinden elde edilen yağın fare kemik iliği hücrelerinde Cyclophosphamide tarafından indüklenen DNA hasarına karşı antimutajenik etkisi in vivo Mikronükleus testi yöntemi ile araştırılmıştır. *P. heptaphyllum* yağı 25, 50 ve 100 mg/kg konsantrasyonlarında kullanılmış, Cyclophosphamide ise 45 mg/kg konsantrasyonda uygulanmıştır. Mikronükleus testi sonuçları MN içeren polikromatik eritrositler (PCE-MN) ve sitotoksisite indeksi PCE/Normakromatik eritrosit (NCE) oranının frekansı olarak verilmiştir. *P. heptaphyllum* yağı ile tedavi edilen tüm hayvanlarda, bütün dozlar için (25, 50 ve 100 mg/kg), PCE/NCE oranının negatif kontrolle belirgin bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir. Ancak, tüm doz gruplarında PCE/NCE oranı, Cyclophosphamide grubundan belirgin şekilde farklılık göstermiş ve sitotoksisite indeksinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, *P. heptaphyllum'un* tüm doz gruplarında MN-PCE oranının, Cyclophosphamide grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığı (2,5±0,4; 3,0 ±1,9; 3,8±1,2) belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, *P. heptaphyllum* uçucu yağının Cyclophosphamide tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı koruma sağladığını ve *P. heptaphyllum'un* antimutajenik aktiviteye sahip olabileceğini düşündürmüştür.

Alpha-Amyrin dışında bazı farklı triterpen yapıda moleküllerin de antigenotoksik potansiyelleri geçmişte araştırılmıştır. Ursolik asit (UA) ve Oleanolik asit (OA) triterpenlerinin Balb/c farelerinde Doksorubisin (DXR) tarafından indüklenen klastojenik etkilere karşı antigenotoksik potansiyelleri periferik kan ve kemik iliğinde Mikronükleus testi kullanılarak değerlendirilmiştir (Aparecida ve diğerleri 2006). Fareler UA (80 mg/kg), OA (80 mg/kg), UA + OA (80 mg/kg), DXR (90 mg/kg), UA+DXR, OA+DXR, UA+OA+DXR doz grupları ile kontrol grubundan oluşturulmuştur. UA ve OA tek başına veya birlikte tedavi edilen hayvan gruplarında negatif kontrol grubuna göre MNPCE'lerin frekansında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$ Negatif kontrol MNPCE %0,15; UA : %0,22; OA: %0,31 UA+OA: %0,18). Bu durum, kullanılan UA ve OA dozlarının genotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir. Öte yandan her iki triterpenoid bileşiğinin DXR ile kombinasyonu ile tedavi edilen hayvanlarda yalnızca DXR (Periferik kan MNPCE %1,38, Kemik iliği MNPCE %1,30) ile tedavi edilenlere göre MNPCE'lerin frekansında belirgin bir azalma olduğu belirlenmiştir (UA: periferik kan ve kemik iliği sırasıyla %0,44 ve %0,59 OA: periferik kan ve kemik iliği sırasıyla %0,57 ve %0,57).

UA ve OA triterpenlerinin DXR ile kombinasyonlarının DXR tarafından indüklenen MNPCE'lerin frekansını da önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (UA+OA+DXR: periferik kan ve kemik iliği MNPCE frekansı sırasıyla %0,42 ve %0,74). Ayrıca ortalama NDI değerlerinde negatif kontrolle karşılaştırıldığında, herhangi bir tedavi grubunda PCE'lerin toplam eritrosit sayısına oranında anlamlı bir azalma olmadığı belirlenmiş ($p>0,05$) olup mevcut deneysel koşullar altında farklı tedavilerin sitotoksisitesinin olmadığı gösterilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda UA ve OA triterpenlerinin fare periferik kan ve kemik iliği hücrelerinde doksorubusine karşı antigenotoksik aktivite göstermiş oldukları saptanmıştır. Öte yandan, çalışma sonuçları doğrultusunda UA ve OA triterpenlerinin insanlarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kemopreventif ajan olarak kullanılabileceği ancak daha fazla araştırma yapılması gerektiği önerilmiştir (Aparecida ve diğerleri 2006).

Anburaj ve diğerlerinin (2020) çalışmasında, insan servikal adenokarsinom (HeLa) hücrelerinde pentasiklik triterpen β-Amyrin (100 µM) ve Sisplatinin (10 µM) genotoksik etkileri in vitro flow sitometriye dayalı Mikronükleus (MN) testi ile araştırılmıştır. Hücreler Sisplatin (10 µM) ve β-Amyrin (100 µM) ile muamele edilmiştir. Muamele edilmemiş kontrol hücrelerinde temel MN frekansı 0,86±0,09 olarak belirlenmiştir. Sisplatin ile muamele edilen hücrelerde MN frekansının, hem kontrol (DMSO+HeLa) hem de muamele edilmemiş HeLa hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0,001$). β-Amyrin ile tedavi edilen hücrelerde (3,25±0,53), hem HeLa hücreleri hem de kontrol hücre grupları ile karşılaştırıldığında MN frekansında belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Sisplatin ve β-Amyrin ile muamele edilen HeLa hücreleri arasında MN frekansında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). Sisplatin ve β-Amyrin ile muamele edilen gruplarda mikronükleusların artan sıklığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, β-Amyrin'in DNA hasarını indükleyerek HeLa hücrelerinde genotoksik etki oluşturduğunu göstermektedir.

Pentasiklik triterpen Alpha-Amyrin molekülünün çeşitli biyolojik özelliklerinin araştırılmış olduğu çalışmalar bulunmasına rağmen mevcut literatür bilgileri incelendiğinde Alpha-Amyrin molekülünün genotoksik/antigenotoksik profili hakkında sınırlı bilgi olduğu ve insan periferal kan lenfosit hücrelerinde hücresel düzeyde genotoksik/antigenotoksik özelliklerinin araştırılmış olduğu bir çalışma olmadığı görülmüştür. Bu doğrultuda bu tez çalışmasında Alpha-Amyrin molekülünün tek başına

ve saf halde genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Alpha-Amyrin molekülünün genotoksik aktivitesinin belirlenmesi in vitro Mikronükleus ve Komet testleri ile gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte genotoksik etkileri bilinen Etil Metansülfonat (EMS) ve Paklitaksel (PAX) ile indüklenen DNA hasarına karşı Alpha-Amyrin molekülünün antigenotoksik etkisi de belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu tez çalışmasında Alpha-Amyrin molekülünün 100 µM ve 400 µM dozlarının tek başına insan periferal kan lenfosit hücrelerinde genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde MN testi uygulanmış olup Nükleer Bölünme İndeksi (NDI) ile mononükleer ve binükleer hücrelerde oluşan MN frekansları belirlenmeye çalışılmıştır. Mikronükleus verileri incelendiğinde α-Amyrin 100 µM doz grubunda (1,74±0,16) NDI oranında negatif kontrole göre (1,62±0,05) belirgin bir artış olduğu gözlenmiş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.4, Çizelge 4.1). Negatif kontrole göre α-Amyrin 100 µM doz grubunda NDI oranında görülen artış Alpha-Amyrin molekülünün lenfosit hücrelerinin proliferasyonunu ve bölünme yeteneğini arttırıcı özelliğinin olabileceğini düşündürmüş olsa da bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$, Şekil 4.4, Çizelge 4.1). α-Amyrin 400 µM dozunda (1,55±0,36) ise NDI oranı negatif kontrole göre kısmi bir azalma gösterirken, solvent kontrol grubuna (1,49±0,14) göre ise küçük bir artış göstermiş olduğu belirlenmiş ancak NDI oranında meydana gelen bu kısmi artış ve azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.4, Çizelge 4.1). NDI oranında Alpha-Amyrin'in her iki doz grubunda meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan azalma ya da artış Alpha-Amyrin'in lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki doza bağlı oluşabilecek etkileri ile ilgili olarak yorum yapılabilmesini zorlaştırmıştır.

Negatif kontrol (2,97±0,20) ve solvent kontrol grubuna göre (1,28±0,20) tek başına α-Amyrin 100 µM doz grubunda (0,00±0,00) mononükleer hücrelerdeki MN frekansında belirgin azalma olduğu görülmesine rağmen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı değerlendirilmiştir ($p>0,05$, Şekil 4.5, Çizelge 4.1). Benzer şekilde binükleer hücrelerdeki MN frekansında 100 µM doz grubunda (0,85±0,34) negatif ve solvent kontrole göre belirgin bir azalma olduğu (sırasıyla 1,59±0,16; 1,28±0,40) görülmesine rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$, Şekil 4.5, Çizelge 4.1). Yalnızca 400 µM α-Amyrin doz grubunda negatif ve solvent kontrol gruplarına göre mononükleer hücrelerdeki MN frekansında istatistiksel olarak anlamlı olmayan görece

bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, tek başına 400 µM α-Amyrin doz grubunda negatif ve solvent kontrol grubuna kıyasla binükleer MN frekansında (3,37±0,49) belirgin bir artış olduğu belirlenmiş olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$, Şekil 4.5, Çizelge 4.1).

Alpha-Amyrin her iki dozuna ait MN frekansı verileri ele alındığında MN frekansına ait verilerin istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın Alpha-Amyrin molekülünün tek başına doza bağlı olarak anlamlı bir genotoksik etkisi olmadığı düşünülmüştür. Bununla birlikte Alpha-Amyrin'in daha geniş konsantrasyonlarda çalışılması durumunda doza bağlı genotoksik etkilerinin olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Bu çalışmada EMS ve PAX tek başına genotoksik etkileri iki farklı genotoksisite test yöntemiyle gösterilmiştir. 500 µg/ml olarak belirlenen EMS konsantrasyonu ve PAX'ın 10 µM dozları ile muamele edilen insan periferal kan lenfosit hücrelerinde MN ve Komet testleri uygulanmıştır. Ayrıca EMS+ 400 µM α-Amyrin ve PAX+400 µM α-Amyrin kombinasyon dozları kullanılarak Alpha-Amyrin molekülünün antigenotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen NDI verileri incelendiğinde yalnızca EMS doz grubunda negatif kontrole kıyasla NDI oranında (1,47±0,03) belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiş ancak NDI oranında görülen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı değerlendirilmiştir ($p>0,05$, Şekil 4.4, Çizelge 4.1). EMS+ α-Amyrin kombinasyon dozunda ise NDI oranının (1,44±0,11) negatif kontrole göre belirgin bir azalma gösterdiği belirlenmiş olmasına karşın bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.4, Çizelge 4.1). Solvent kontrol grubuna göre ise (1,49±0,14) NDI oranında hem EMS hem de EMS+ α-Amyrin kombinasyon doz gruplarında belirgin herhangi bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.

Negatif kontrol grubuna göre EMS doz grubunda NDI oranında meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da EMS'nin beklendiği gibi antiproliferatif bir etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir (Vatan ve diğerleri 2010).

Vatan ve diğerlerinin (2010) yaptığı bir çalışmada, *Hypnea musciformis (Wulfen) Lamouroux* (HME 400 ppm) ekstraktının Etil Metansülfonat (EMS) (1250 ppm) gibi genotoksik ajanlarla indüklenen insan lenfositleri üzerindeki genotoksik ve

antigenotoksik etkisi kardeş kromatit değişimi (SCE) ve Mikronükleus (MN) testleri ile araştırılmıştır. Yalnızca EMS ile muamele edilen lenfosit hücrelerinde SCE frekansında negatif kontrole göre önemli ölçüde artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Bununla birlikte, EMS ile muamele edilen lenfosit hücrelerinde negatif kontrole kıyasla MN frekansının önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir ($p<0,01$, Negatif kontrol MN frekansı: 1,00±1,41; EMS MN frekansı: 4,50±0,71). Ayrıca, yalnızca EMS ile muamele edilen lenfosit hücrelerinde negatif kontrole göre NDI (nükleer bölünme indeksi) oranında bir azalma (Negatif kontrol: 1,22±0,20, EMS: 1,15±0,8) olduğu belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, EMS doz grubunda (23,94±2,48) negatif ve solvent kontrole göre (2,97±0,20; 1,28±0,40) mononükleer hücrelerdeki MN frekansında istatistiksel olarak anlamlı olmayan belirgin artış olduğu saptanmıştır ($p>0,05$, Şekil 4.5, Çizelge 4.1). Bununla birlikte binükleer hücrelerde görülen MN frekansında da negatif ve solvent kontrol doz gruplarına göre (1,59±0,16; 1,28±0,40) EMS doz grubunda belirgin bir artış (27,90±2,58) meydana gelmesine rağmen bu artış istatiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$, Şekil 4.6, Çizelge 4.1). Öte yandan EMS+ α-Amyrin kombinasyon dozlarında negatif ve solvent kontrollere kıyasla mononükleer ve binükleer hücrelerdeki MN frekansında belirgin bir artış (sırasıyla mononükleer MN:7,38±0,23; binükleer MN: 23,08±1,19) tespit edilmiş olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$, Şekil 4.4, Şekil 4.6, Çizelge 4.1). EMS+ α-Amyrin kombinasyon dozunda EMS doz grubuna göre mononükleer ve binükleer hücrelerdeki MN frekansında belirgin bir azalma olduğu (7,38±0,23; 23,08±1,19) ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Çizelge 4.1).

Bu doğrultuda, bu tez çalışmasında gerçekleştirilen MN testi sonucunda yalnızca EMS uygulamasının tek başına periferal kan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik etkilerinin literatür bilgilerini desteklediği görülmüştür. Bununla birlikte, Alpha-Amyrin molekülünün kombinasyon uygulamasında tek başına EMS uygulamasına göre mononükleer ve binükleer hücrelerdeki MN frekansları üzerinde azaltıcı eğiliminde olduğu görülmüş olsa da MN frekanslarında gerçekleşen bu azalmalar istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamızdan elde edilen MN bulguları ele alındığında Alpha-Amyrin molekülünün EMS tarafından indüklenen DNA hasarına karşı istatistiksel olarak anlamlı olmayan görece bir azalma göstermiş olduğu sonucuna varılmıştır.

Negatif kontrole kıyasla (1,62±0,05) PAX ve PAX+ Alpha-Amyrin doz gruplarında NDI oranında belirgin bir azalma olduğu (sırasıyla PAX: 1,23±0,03; PAX+ α-Amyrin: 1,23±0,00) saptanmış ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, Şekil 4.4, Çizelge 4.1). Solvent kontrol (1,49±0,14) grubuna göre PAX ve PAX+ α-Amyrin kombinasyon dozlarında NDI oranında bir miktar azalma olduğu görülse de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.4, Çizelge 4.1). PAX ve PAX + α-Amyrin kombinasyon dozlarında NDI oranında belirgin herhangi bir değişim olmadığı belirlendi. Çalışmamızdan elde edilen NDI bulgularımız Paklitakselin hücre proliferasyonu üzerine antiproliferatif aktivitesinin olduğunu göstermiş olup bulgularımız aynı zamanda mevcut literatürü destekler niteliktedir (Axel ve diğerleri, 1997).

İnsan lenfositlerinde paklitakselin genotoksisitesine karşı borik asidin antigenotoksik aktivitesi araştırılmıştır (Turkez ve diğerleri, 2010). Paklitaksel (10 µg veya 20 µg) dozları ve borik asidin (2,5 veya 5 mg/l) dozları uygulanan insan periferal kan kültürlerinde SCE (kardeş kromatit değişimi) ve MN (mikronükleus) testleri ile değerlendirilmiştir. Bununla birlikte periferal kan lenfosit hücrelerinde Nükleer Bölünme Indeksi (NDI) analiz edilmiştir. Çalışma sonuçları Paklitakselin insan lenfosit hücrelerinde SCE oranlarını ve MN oluşumunu kontrole kıyasla anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca yüksek Paklitaksel dozu ile muamele sonrası lenfosit hücrelerinde NDI oranında önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir. NDI oranındaki azalmanın Paklitakselin in vitro daki antiproliferatif etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Turkez ve diğerleri, 2010).

Çalışmamızdan elde edilen MN testi verileri incelendiğinde PAX doz grubunda mononükleer hücrelerdeki MN frekansı (87,40±9,81) negatif kontrol grubuna göre (2,97±0,20) belirgin bir artış göstermiş olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$, Şekil 4.5, Çizelge 4.1). Bunun yanında, PAX doz grubunda (87,40±9,81) solvent kontrole göre (1,28±0,40) mononükleer hücre MN frekansında belirgin bir artış olduğu saptanmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, Şekil 4.5, Çizelge 4.1).

PAX doz grubunda binükleer MN frekansında (277,51±79,34) negatif ve solvent kontrol gruplarına göre (1,59±0,16;1,28±0,40) belirgin şekilde artış meydana geldiği belirlendi ve bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu değerlendirildi ($p<0,05$, Şekil 4.6,

Çizelge 4.1). Çalışmamızdan elde edilen bulguların Paklitakselin lenfosit hücrelerinde DNA hasarını indükleyerek mikronükleus oluşumlarına neden olduğunu gösterdiği aynı zamanda mevcut literatür bilgilerini desteklediği görülmüştür (Digue ve diğerleri 2002).

PAX + α-Amyrin kombinasyon doz grubunda mononükleer ve binükleer hücrelerdeki MN frekansları (sırasıyla 109,90±29,49; 243±99,96) solvent ve negatif kontroller ile kıyaslandığında belirgin bir artış olduğu belirlenmiş ve meydana gelen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Çizelge 4.1). PAX+ α-Amyrin kombinasyon doz grubunda tek başına PAX dozuna göre mononükleer hücre MN frekansında istatiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gösterdiği bununla birlikte binükleer hücre MN frekansında ise (PAX: 277,51±79,34; PAX+ α-Amyrin: 243 ±99,96) bir azalma eğilimi göstermiş olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Şekil 4.5, Şekil 4.6 Çizelge 4.1). MN test sonuçlarındaki bu durum Alpha-Amyrin molekülünün PAX indüklemiş olduğu DNA hasarına karşı göreceli zayıf bir antigenotoksik etkisi olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Komet testi veya Tek Hücreli Jel Elektroforezi (SCGE) testi, bireysel hücrelerin seviyesinde DNA hasarını hızlı, duyarlı ve nispeten basit bir şekilde tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir (Singh ve diğerleri, 1988).

Komet testinin değerlendirilmesinde kullanılan Komet Alanı, Komet Yoğunluğu, Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk % DNA, Kafa % DNA, Olive Kuyruk Momenti, Kafa Çapı, gibi parametreler DNA hasarı ile ilgili ayrıntılı bilgi verirken, Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi parametreleri ise yapılan uygulamaların DNA üzerindeki hasar verici etkilerinin daha belirgin bir şekilde anlaşılmasını sağlamaktadır.

Komet alanı, hücrenin çekirdeğinden yayılan DNA'nın genel miktarını yansıtırken, Komet uzunluğu hücrenin çekirdeğinden yayılan DNA'nın jel üzerindeki uzunluğunu ifade eder. Komet yoğunluğu, hücre çekirdeğinden yayılan DNA'nın jel üzerindeki izlediği yolun ne kadar belirgin olduğunu gösterir. Kuyruk uzunluğu, hücre çekirdeğindeki DNA'nın jel içerisinde hangi uzaklığa kadar yayıldığını belirtir. Kuyruk % DNA oranı, hücrenin çekirdeğindeki fragmente olan DNA'nın kuyruk olarak önde koşan kısım içindeki toplam DNA yüzdesini ifade ederken, Kafa % DNA oranı hücrenin çekirdek bölümündeki DNA'nın toplam DNA içindeki yüzdesini yansıtır. Kafa Çapı, DNA'nın dağılımını ve hücrenin hasarlı DNA parçacıklarını jel üzerinde ne kadar geniş

bir alana yayıldığını gösterir. L/H oranı, Komet alanındaki kuyruk uzunluğunun kafa boyutuna oranıdır. L/H oranı, kuyruktaki DNA'nın, "kafa" olarak nitelendirilen ana çekirdek DNA'dan ne kadar uzaklaştığını gösterir (Kumaravel ve diğerleri 2009). Olive Kuyruk Momenti, kuyruk içindeki DNA dağılımındaki varyasyonları yakalayarak bir hücre popülasyonu içindeki heterojenliğin belirlenmesinde kullanılır (Olive ve diğerleri 1990).

Yapılan literatür taramasında Alpha-Amyrin molekülünün tek başına genotoksik antigenotoksik etkilerinin Komet test yöntemiyle araştırılmış olduğu herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak terpen ve benzeri bileşikleri içeren bazı bitki türlerine ait çalışmalar bulunmaktadır, örneğin *Himatanthus articulatus (Vahl) Woodson* (Apocynaceae) bitkisinin lateksi, farelerde in vivo Komet ve Mikronükleus testi kullanılarak genotoksik/antigenotoksik ve mutajenik potansiyeli araştırılmıştır (Reboças ve diğerleri, 2012). Kan preparatları, Hidrojen Peroksit ile (ex vivo koşullarda) maruz bırakılarak antigenotoksik etki değerlendirilmiştir. *H. articulatus* lateksi, tedavi edilen farelerde Komet testinde ölçülen DNA hasarının sıklığını artırmamıştır, bu da genotoksik ve mutajenik bir aktiviteye sahip olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, lateksin Hidrojen Peroksit tarafından indüklenen DNA hasarına karşı antigenotoksik aktivite sergilediği belirlenmiştir (Reboças ve diğerleri, 2012) .

Komet testinden elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, α-Amyrin 100 µM doz grubunda Negatif Kontrol ve Solvent Kontrol gruplarına göre Komet Alanı, Komet Uzunluğu, Komet Yoğunluğu ve Kuyruk Uzunluğu oranlarında belirgin bir değişim olmadığı saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmedi ($p>0,05$, Şekil 4.8, Çizelge 4.2). Kuyruk % DNA oranında 100 µM α-Amyrin dozunda negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış olduğu görüldü ($p>0,05$, Şekil 4.12, Çizelge 4.1). L/H Oranı, Olive Kuyruk Momenti oranlarında da negatif ve solvent kontrol grubuna göre herhangi bir değişim görülmedi ($p>0,05$, Şekil 4.16, Şekil 4.13, Çizelge 4.1).

Bununla birlikte α-Amyrin 100 µM dozunda negatif kontrol göre (0,58±0,34) Genetik Hasar İndeksinde bir artış olduğu tespit edilmiş olsa da (0,89±0,46) bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı değerlendirilmiştir ($p>0,05$, Şekil 4.17, Çizelge 4.3). Solvent kontrol (0,93±0,35) grubuna göre 100 µM α-Amyrin doz grubunda Genetik Hasar

İndeksinde (0,89±0,46) istatistiksel olarak anlamlı olmayan (p>0,05, Şekil 4.17, Çizelge 4.3) kısmi bir azalma olduğu görüldü. Hasarlı Hücre Yüzdesinde negatif kontrole kıyasla (0,08±0,11) 100 µM α-Amyrin doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan (p>0,05, Şekil 4.18, Çizelge 4.3) bir artış (0,15±0,16) meydana geldiği bununla birlikte solvent kontrole göre belirgin bir değişim olmadığı gözlendi.

Komet Alanı, Komet Uzunluğu, Komet Yoğunluğu oranlarında 400 µM α-Amyrin dozunun negatif ve solvent kontrollere göre belirgin bir değişim yaratmadığı belirlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (p>0,05, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Çizelge 4.1). Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk % DNA, Olive Kuyruk Momenti, L/H Oranı parametrelerinde negatif kontrole göre 400 µM α-Amyrin dozunda belirgin bir artış gözlenirken, Kafa % DNA oranında ise azalma olduğu belirlendi ve bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı oldukları saptandı (p<0,05, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.16, Şekil 4.14, Çizelge 4.1). α-Amyrin 400 µM dozunda solvent kontrole göre Kuyruk Uzunluğu, Olive Kuyruk Momenti, Kafa % DNA ve L/H Oranı oranlarında kısmi bir artış görülse de bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı değerlendirildi (p>0,05, Şekil 4.11, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.16, Çizelge 4.1). Genetik Hasar İndeksinde 400 µM α-Amyrin doz grubunda (1,19±0,31) negatif (0,58±0,34) ve solvent (0,93±0,35) kontrol gruplarına göre belirgin artış olduğu saptanmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05, Şekil 4.17, Çizelge 4.3). Hasarlı Hücre Yüzdesi oranında ise negatif (0,08±0,11) ve solvent kontrollere (0,17±0,15) kıyasla tek başına 400 µM α-Amyrin dozunda (0,31±0,19) belirgin bir artış meydana gelmesine rağmen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05, Şekil 4.18, Çizelge 4.3). Alpha-Amyrin'in her iki doz grubunda çeşitli komet parametrelerinde artış ya da azalmalar meydana gelmiştir. Komet parametrelerinde meydana gelen istatiksel olarak anlamlı bulunmayan değişimler göz önüne alındığında Alpha-Amyrin molekülünün tek başına belirgin bir genotoksik etkisi olmadığı görülmektedir.

Tek başına EMS doz grubunda negatif ve solvent kontrol gruplarına kıyasla Komet Alanının anlamlı derecede yükseldiği saptandı (sırasıyla p<0,05; p<0,01, Şekil 4.8, Çizelge 4.1). Komet Uzunluğunun EMS doz grubunda negatif ve solvent kontrol gruplarına göre belirgin bir şekilde artış gösterdiği belirlendi bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,01, Şekil 4.9, Çizelge 4.1). Negatif kontrole göre EMS doz

grubunda Komet Yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artışın olduğu saptandı ($p<0,001$, Şekil 4.10, Çizelge 4.1). Bununla birlikte solvent kontrol grubuna kıyasla Komet Yoğunluğunda EMS dozunda belirgin bir derecede ve istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p<0,001$, Şekil 4.10, Çizelge 4.1). Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk % DNA oranında EMS doz grubunda negatif ve solvent kontrollere göre (sırasıyla $p<0,01$;$p<0,05$, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Çizelge 4.1) belirgin bir şekilde artış olduğu tespit edildi. Olive Kuyruk Momenti oranı kontrol gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde ($p<0,01$, Şekil 4.13, Çizelge 4.1) belirgin bir artış olduğu görüldü. Kafa % DNA oranında kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0,01$, Şekil 4.14, Çizelge 4.1) belirgin bir azalma olduğu saptandı. Kafa Çapı oranının EMS doz grubunda kontrol gruplarına dramatik bir azalma olduğu değerlendirildi ($p<0,01$, Şekil 4.15). L/H Oranında ise kontrol gruplarına kıyasla belirgin derecede ve istatistiki olarak anlamlılık düzeyinde bir artış ($p<0,05$, Şekil 4.16, Çizelge 4.1) olduğu görüldü.

Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi verileri değerlendirildiğinde EMS doz grubunda kontrol gruplarına kıyasla Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesinde belirgin bir şekilde artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Çizelge 4.3).

Komet testinden elde edilen veriler değerlendirildiğinde insan periferal kan lenfosit hücrelerinde yalnızca EMS dozunun tüm Komet parametrelerinde kontrol gruplarına kıyasla meydana getirmiş olduğu değişimler göz önüne alındığında EMS'nin lenfosit hücrelerinde çeşitli Komet parametrelerinde önemli ölçüde azalış ya da artış meydana getirmesi nedeniyle çalışma sonuçlarımız EMS'nin genotoksik etkisinin değerlendirilmiş olduğu literatür çalışmalarıyla uyumlu olup mevcut literatürü destekler niteliktedir (Sarımahmut ve diğerleri, 2016).

EMS+α-Amyrin kombinasyon doz grubunda EMS doz grubuna göre Komet Alanı, Komet Uzunluğu, Kuyruk Uzunluğu, Komet Yoğunluğu, Olive Kuyruk Momenti parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ($p>0,05$, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.13, Çizelge 4.1) belirgin bir azalma eğilimi olduğu belirlendi. Bunun yanında Kafa Çapında dramatik bir şekilde azalma olduğu saptandı ($p<0,001$, Şekil 4.15). Ayrıca Kuyruk % DNA, Kafa % DNA ve L/H Oranı parametrelerinde EMS +α-Amyrin kombinasyon dozlarında anlamlı olmayan ($p>0,05$, Şekil 4.12, Şekil 4.14, Şekil 4.16,

Çizelge 4.1) bir artış olduğu görüldü. Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi verileri incelendiğinde EMS +α-Amyrin kombinasyon dozunda EMS dozuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma eğilimi olduğu belirlendi ($p>0,05$, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Çizelge 4.3). Tüm Komet verileri ele alındığında Alpha-Amyrin molekülünün EMS tarafından indüklenen genotoksik etkilere karşı koruyucu özellikte olduğu değerlendirilebilir. EMS ile α-Amyrin kombinasyon uygulamalarındaki azalışın istatistiki anlamlılık göstermemesini; deney grupları arasındaki standart sapma oranlarının yüksek olması, donör sayısının azlığı ve donörler arasındaki fizyolojik farklılık gibi çalışma sınırlılığına neden olan etmenler ile açıklayabiliriz.

Paklitaksel doz grubunda Komet Uzunluğu, Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk % DNA, Olive Kuyruk Momenti, L/H Oranı gibi bazı komet parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$, Şekil 4.9, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.16, Çizelge 4.1) belirgin bir artış olduğu görüldü. Bununla birlikte Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi parametrelerinde Paklitaksel doz grubunda kontrol gruplarına kıyasla belirgin bir artış meydana geldiği görüldü ($p<0.05$, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Çizelge 4.3).

Yalnızca Paklitaksel dozunda kontrol gruplarına kıyasla bazı komet parametrelerinde artış olduğunun belirlenmesi, Paklitakselin tek başına insan periferal kan lenfosit hücrelerinde DNA hasarını indükleyerek genotoksik etki oluşturduğunu göstermiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular mevcut literatürü destekler nitelikte olmuştur (Branham ve diğerleri, 2004).

PAX + α-Amyrin kombinasyon doz gruplarında tek başına PAX doz grubuna göre Komet Alanı, Komet Uzunluğu, Komet Yoğunluğu, Kuyruk % DNA, Olive Kuyruk Momenti ve L/H Oranı parametrelerinde bir miktar artış gerçekleşmiş ve bazı parametrelerdeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, Şekil 4.8, Şekil 4.10, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.16, Çizelge 4.1). Bunun yanı sıra PAX+α-Amyrin kombinasyon doz grubunda tek başına PAX ile kıyaslandığında Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesinde istatiksel olarak anlamlı bulunmayan ($p>0,05$, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Çizelge 4.3) belirgin bir artış meydana geldiği görülmüş olup bu durum Alpha-Amyrin molekülünün Paklitaksel ile sinerjik etki gösterebileceğini düşündürmüştür.

Bu tez çalışmasından elde edilen antioksidan aktivite bulguları Alpha-Amyrin molekülünün kuvvetli bir antioksidan aktiviteye sahip olmadığını açık bir şekilde göstermiştir. Öte yandan genotoksik ajanlara karşı göreceli olarak antigenotoksik potansiyeli olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte bu çalışmada Alpha-Amyrin molekülünün kuvvetli bir antioksidan aktivitesi olmamasına rağmen antigenotoksik özelliklere sahip olması bu aktivitenin Alpha-Amyrin'in antioksidan özellikleri ile değil diğer hücresel mekanizmalar ile etkileşimi aracılığıyla olabileceğini düşündürmüştür. Bu doğrultuda Alpha-Amyrin molekülünün hücresel düzeydeki farklı etki mekanizmalarının ileri ve farklı araştırma teknikleri ve çalışma yöntemleriyle belirlenebileceği önerilmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen MN ve Komet verileri göz önüne alındığında Alpha-Amyrin molekülünün tek başına herhangi bir genotoksik etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra Alpha-Amyrin molekülünün EMS'nin insan periferal kan lenfosit hücrelerindeki genotoksik etkisine karşı istatistiksel olarak görece anlamlı olmayan antigenotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ancak donör sayısının yetersizliği, donörler arasındaki fizyolojik farklılık, deney grupları arasında standart sapmaların yüksekliği gerçekleştirilen deneylerin kısıtları arasındadır.

Mikronükleus ve Komet testinden elde edilen veriler ele alındığında Alpha-Amyrin molekülünün Paklitaksel ile kombinasyonlarında MN ve Komet test parametrelerinde tek başına Paklitaksel doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar yarattığı belirlendi. Çalışma sonuçları Alpha-Amyrin molekülünün Paklitaksel ile sinerjik etki oluşturduğunu ve insanlarda kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanımında dikkatli olunması gerektiği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Akkuş, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları, Konya*, *1*, 57-63.

Alkan, F. Ü., Gürsel, F. E., Ateş, A., Özyürek, M., Güçlü, K., & Altun, M. (2012). Protective effects of Salvia officinalis extract against cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress in rats. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *36*(6), 646-654.

Anonim, (2006) Erişim adresi: http://en.wikipedia.org/wiki/*Terpene*

Anonim, 2022 Erişim adresi: https://en.wikipedia.org/wiki/*Paclitaxel*

Anonim, 2023 Erişim adresi https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma

Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences*, *16*(3), 5517–5527. https://doi.org/10.3390/ijms16035517

Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(26), 7970–7981. https://doi.org/10.1021/jf048741x

Axel, D. I., Kunert, W., Göggelmann, C., Oberhoff, M., Herdeg, C., Küttner, A., Wild, D. H., Brehm, B. R., Riessen, R., Köveker, G., & Karsch, K. R. (1997). Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. *Circulation*, *96*(2), 636–645. https://doi.org/10.1161/01.cir.96.2.636

Aydemir, B., & SARI, E. K. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, *2*(2), 56-60.

Babaoğlu, M., Gürel, E., & Özcan, S. (2001). Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları. *Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya*.

Bakhoum, S. F., Silkworth, W. T., Nardi, I. K., Nicholson, J. M., Compton, D. A., & Cimini, D. (2014). The mitotic origin of chromosomal instability. *Current biology: CB*, *24*(4), R148–R149. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.019

Barros, F. W., Bandeira, P. N., Lima, D. J., Meira, A. S., de Farias, S. S., Albuquerque, M. R., dos Santos, H. S., Lemos, T. L., de Morais, M. O., Costa-Lotufo, L. V., & Pessoa, C.doÓ. (2011). Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *19*(3), 1268–1276. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.12.016

Bishayee, A., Ahmed, S., Brankov, N., & Perloff, M. (2011). Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *16*(3), 980–996. https://doi.org/10.2741/3730

Biskup, E., Gołębiowski, M., Gniadecki, R., Stepnowski, P., & Łojkowska, E. (2012). Triterpenoid α-amyrin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. *Acta biochimica Polonica*, *59*(2), 255–260.

Bora, T., & Delen, N. (1981). Türkiye'de Bitkisel Üretimde Tarımsal İlaç Sorunu ve Öneriler. *Tar. Kom. TebI*, *809*, 824.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.

Branham, M. T., Nadin, S. B., Vargas-Roig, L. M., & Ciocca, D. R. (2004). DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. *Mutation research*, *560*(1), 11–17. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.01.013

Budisan, L., Gulei, D., Zanoaga, O. M., Irimie, A. I., Sergiu, C., Braicu, C., Gherman, C. D., & Berindan-Neagoe, I. (2017). Dietary Intervention by Phytochemicals and Their Role in Modulating Coding and Non-Coding Genes in Cancer. *International journal of molecular sciences*, *18*(6), 1178. https://doi.org/10.3390/ijms18061178

Burkhart, C. A., Berman, J. W., Swindell, C. S., & Horwitz, S. B. (1994). Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression and cytotoxicity. *Cancer research*, *54*(22), 5779–5782.

Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, *67*(12), 2141-2153.

De Flora, S., & Ferguson, L. R. (2005). Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation research*, *591*(1-2), 8–15. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.02.029

Digue, L., Orsière, T., Baciuchka-Palmaro, M., Duffaud, F., Pompili, J., Favre, R., & Botta, A. (2002). Intérêt de l'étude de la génotoxicité in vitro d'une molécule de chimiothérapie sur cellules humaines : exemple du paclitaxel [Interest of studying the in vitro genotoxicity of an antineoplastic drug on healthy human cells: paclitaxel example]. *Bulletin du cancer*, *89*(10), 887–892.

Dinçer, Y., & Kankaya, S., (2010), "DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay", *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, *30*(4), ss. 1365-1373.

Doğan, S., Alan, Ü., & Doğan, M. (2014). The effect of sodium tetraborate on antioxidant enzymes under in vitro conditions.

Eastmond, D. A., & Tucker, J. D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and molecular mutagenesis*, *13*(1), 34–43. https://doi.org/10.1002/em.2850130104

Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation research*, *567*(1), 1–61. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001

Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*, *455*(1-2), 81–95. https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00065-8

Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, *2*(5), 1084–1104. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77

Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation research*, *147*(1-2), 29–36. https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9

Ferguson, L. R., Philpott, M., & Karunasinghe, N. (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, *198*(1-3), 147–159. https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.01.035

Finar, J.L., D.Sc., Ph.D., ARIÇ, "Spectroskopi and The Chemistry of Natural Products" *Organic Chemistry, Longman, Fifth Edition,* 2 (8), 354-385,440- 441,451,459. (1975).

Fuchs, D. A., & Johnson, R. K. (1978). Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent from Taxus brevifolia, acts as a mitotic spindle poison. *Cancer treatment reports*, *62*(8), 1219–1222.

Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht, B. D., Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation*, *16*(8), 1093–1107. https://doi.org/10.1038/cdd.2009.44

Gilbert, D. F., & Boutros, M. (2016). A Protocol for a High-Throughput Multiplex Cell Viability Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1470*, 75–84. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6337-9_6

Gök, V., Kayacıer, A., & Telli, R. (2006). Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, *2*, 35-40.

Güven, A., & Gürsul, I. (2014). Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit sentezi. *Gıda*, *39*(5), 299-306.

Güvercin, R. Ş. (2020). Etil Metan Sülfonat Mutageninin Pamuk (Gossypium hirsutum L. ve Gossypium barbadense L.) Tohumu Çimlenmesine Etkisi. *Uluslararası Anadolu Ziraat Mühendisliği Bilimleri Dergisi*, *2*(1), 24-29.

Hanukoglu I. (2006). Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug metabolism reviews*, *38*(1-2), 171–196. https://doi.org/10.1080/03602530600570040

Hernández-Vázquez, L., Mangas, S., Palazón, J., & Navarro-Ocaña, A. (2010). Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, *31*(3), 476-480.

Holanda Pinto, S. A., Pinto, L. M., Cunha, G. M., Chaves, M. H., Santos, F. A., & Rao, V. S. (2008). Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from Protium heptaphyllum in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, *16*(1), 48–52. https://doi.org/10.1007/s10787-007-1609-x

Höfling, J. F., Anibal, P. C., Obando-Pereda, G. A., Peixoto, I. A., Furletti, V. F., Foglio, M. A., & Gonçalves, R. B. (2010). Antimicrobial potential of some plant extracts against Candida species. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, *70*(4), 1065–1068. https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000500022

Ionescu, M. E., Ciocirlan, M., Becheanu, G., Nicolaie, T., Ditescu, C., Teiusanu, A. G., Gologan, S. I., Arbanas, T., & Diculescu, M. M. (2011). Nuclear Division Index may Predict Neoplastic Colorectal Lesions. *Maedica*, *6*(3), 173–178.

Iqbal, J., Abbasi, B. A., Ahmad, R., Batool, R., Mahmood, T., Ali, B., Khalil, A. T., Kanwal, S., Afzal Shah, S., Alam, M. M., Bashir, S., Badshah, H., & Munir, A. (2019). Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *109*, 1381–1393. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.107

Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. N., & Scheffler, A. (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *14*(6), 2016–2031. https://doi.org/10.3390/molecules14062016

Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, *7*(1), 1-7.

Kada, T., & Shimoi, K. (1987). Desmutagens and bio-antimutagens--their modes of action. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, *7*(3), 113–116. https://doi.org/10.1002/bies.950070305

Kasımoğulları, Serap Çelikler, et al. "Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of Usnea filipendula Stirt. in vitro." *Turkish Journal of Biology* 38.6 (2014): 940-947.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, *94*(4), 550-557.

Koch, A. C., Ramgareeb, S., Rutherford, R. S., Snyman, S. J., & Watt, M. P. (2012) An in vitro mutagenesis protocol for the production of sugarcane tolerant to the herbicide imazapyr. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *48*, 417-427.

Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2009). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell biology and toxicology*, *25*(1), 53–64. https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9

Langseth, L. (1995). *Oxidants, antioxidants, and disease prevention* (pp. 1-26). Brussels's, Belgium: ILSI Europe.

Liby, K. T., & Sporn, M. B. (2012). Synthetic oleanane triterpenoids: multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease. *Pharmacological reviews*, *64*(4), 972–1003. https://doi.org/10.1124/pr.111.004846

Louis, K. S., Siegel, A. C., & Levy, G. A. (2011). Comparison of manual versus automated trypan blue dye exclusion method for cell counting. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. Series Methods in Molecular Biology. Springer Protocols*, 7-12.

Machado, M. P., Filho, E. R., Terezan, A. P., Ribeiro, L. R., & Mantovani, M. S. (2005). Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of Agaricus blazei determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, *19*(4), 533–539. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.12.005

Maneesai, P., Bunbupha, S., Kukongviriyapan, U., Prachaney, P., Tangsucharit, P., Kukongviriyapan, V., & Pakdeechote, P. (2016). Asiatic acid attenuates renin-angiotensin system activation and improves vascular function in high-carbohydrate, high-fat diet fed rats. *BMC complementary and alternative medicine*, *16*, 123. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1100-6

Manfredi, J. J., Parness, J., & Horwitz, S. B. (1982). Taxol binds to cellular microtubules. *The Journal of cell biology*, *94*(3), 688–696. https://doi.org/10.1083/jcb.94.3.688

Manguro, L. O. A., Opiyo, S. A., Herdtweck, E., & Lemmen, P. (2009). Triterpenes of Commiphora holtziana oleo-gum resin. *Canadian Journal of Chemistry*, *87*(8), 1173-1179.

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., & Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, *88*(11),1515–1531. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.004

Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., & Heddle, J. A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation research*, *239*(1), 29–80. https://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90030-f

Mirunalini, S., Isabella, S., & Vaithiyanathan, V. (2016). Antiproliferative effect of alpha amyrin on Hep2 cells by inducing cytotoxicity and oxidant antioxidant status modifications. *FoodSci: Indian Journal of Research in Food Science and Nutrition*, *3*(2), 44-47.

Mishra, T., Arya, R. K., Meena, S., Joshi, P., Pal, M., Meena, B., Upreti, D. K., Rana, T. S., & Datta, D. (2016). Isolation, Characterization and Anticancer Potential of Cytotoxic Triterpenes from Betula utilis Bark. *PloS one*, *11*(7), e0159430. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159430

Mohamed, S. A. K. S., Upreti, S., Rajendra, S. V., & Dang, R. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, testing guidelines and methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, *1*(5), 133-138.

Mohammadi, N., & Shaghaghi, N. (2020). Inhibitory effect of eight secondary metabolites from conventional medicinal plants on COVID_19 virus protease by molecular docking analysis.

Narender, T., Khaliq, T., Singh, A. B., Joshi, M. D., Mishra, P., Chaturvedi, J. P., Srivastava, A. K., Maurya, R., & Agarwal, S. C. (2009). Synthesis of alpha-amyrin derivatives and their in vivo antihyperglycemic activity. *European journal of medicinal chemistry*, *44*(3), 1215–1222. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.09.011

Nath, C. J., & Ong, T. (1990). Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, *10*(3), 273–279. https://doi.org/10.1002/tcm.1770100310

Neto, S. F., Prada, A. L., Achod, L. D. R., Torquato, H. F. V., Lima, C. S., Paredes-Gamero, E. J., Silva de Moraes, M. O., Lima, E. S., Sosa, E. H., de Souza, T. P., & Amado, J. R. R. (2021). α-amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *139*, 111656. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111656

Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*, *17*(3), 215–234. https://doi.org/10.1039/a902202c

Niles, A. L., Moravec, R. A., Eric Hesselberth, P., Scurria, M. A., Daily, W. J., & Riss, T. L. (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical biochemistry*, *366*(2), 197–206. https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.04.007

Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology & medicine*, *31*(11), 1287–1312. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00724-9

Ogbonna, J., Kenechukwu, F., Attama, A., & Chime, S. (2012). Different approaches to formulation of herbal extracts/phytopharmaceuticals/bioactive phytochstituents-a review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, *16*(1), 1-8.

Okoye, N. N., Ajaghaku, D. L., Okeke, H. N., Ilodigwe, E. E., Nworu, C. S., & Okoye, F. B. (2014). beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of Alstonia boonei display profound anti-inflammatory activity. *Pharmaceutical biology*, *52*(11), 1478–1486. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.898078

Olive, P. L., Banáth, J. P., & Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation research*, *122*(1), 86–94.

Oliveira, F. A., Chaves, M. H., Almeida, F. R., Lima, R. C., Jr, Silva, R. M., Maia, J. L., Brito, G. A., Santos, F. A., & Rao, V. S. (2005). Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from Protium heptaphyllum (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of ethnopharmacology*, *98*(1-2), 103–108. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.036

P. Kaur, A. Walia, S. Kumar, and S. Kaur, “Antigenotoxic Activity of Polyphenolic Padmavathi, G., Roy, N. K., Bordoloi, D., Arfuso, F., Mishra, S., Sethi, G., & Kunnumakkara, A. B. (2017). Butein in health and disease: A comprehensive review. *Phytomedicine*, *25*, 118-127.

Pakdeechote, P., Bunbupha, S., Kukongviriyapan, U., Prachaney, P., Khrisanapant, W., & Kukongviriyapan, V. (2014). Asiatic acid alleviates hemodynamic and metabolic alterations via restoring eNOS/iNOS expression, oxidative stress, and inflammation in diet-induced metabolic syndrome rats. *Nutrients*, *6*(1), 355–370. https://doi.org/10.3390/nu6010355

Parikh, N. R., Mandal, A., Bhatia, D., Siveen, K. S., Sethi, G., & Bishayee, A. (2014). Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, *13*(4), 793–810. https://doi.org/10.1007/s11101-014-9337-5

Prabhakar, P., Reeta, K. H., Maulik, S. K., Dinda, A. K., & Gupta, Y. K. (2017). α-Amyrin attenuates high fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, *42*(1), 23–32. https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0088

Rama, R. P., Kaul, C. L., & Jena, G. B. (2002). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: Impact of ICH guidelines. *Indian journal of pharmacology*, *34*(2), 86.

Rao, V. S., de Melo, C. L., Queiroz, M. G., Lemos, T. L., Menezes, D. B., Melo, T. S., & Santos, F. A. (2011). Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from Sambucus australis, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet. *Journal of medicinal food*, *14*(11), 1375–1382. https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0267

Rebouças, S. D. O., Silva, J. D., Groff, A. A., Nunes, E. A., Ianistcki, M., & Ferraz, A. D. B. (2012). The antigenotoxic activity of latex from Himatanthus articulatus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *22*, 389-396.

Ribas, G., Surrallés, J., Carbonell, E., Xamena, N., Creus, A., & Marcos, R. (1996). Genotoxicity of the herbicides alachlor and maleic hydrazide in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, *11*(3), 221–227. https://doi.org/10.1093/mutage/11.3.221

Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and drug development technologies*, *2*(1), 51–62. https://doi.org/10.1089/154065804322966315

Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2006). Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In *Cell biology* (pp. 25-31). Academic Press.

Riss, T. L., Moravec, R. A., & Niles, A. L. (2011). Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *740*, 103–114. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_12

Sabudak, T., Orak, H. H., Gulen, D., Ozer, M., Caliskan, H., Bahrisefit, I., & Cabi, E. (2017). Investigation of some antibacterial and antioxidant properties of wild Cirsium vulgare from Turkey. *Indian J. Pharm. Educ. Res*, *51*(363), 48.

Santos Mello, R., Kwan, D., & Norman, A. (1974). Chromosome aberrations and T-cell survival in human lymphocytes. *Radiation research*, *60*(3), 482–488.

Santos, F. A., Frota, J. T., Arruda, B. R., de Melo, T. S., da Silva, A. A., Brito, G. A., Chaves, M. H., & Rao, V. S. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α, β-amyrin, a triterpenoid mixture from Protium heptaphyllum in mice. *Lipids in health and disease*, *11*, 98. https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-98

Sarimahmut, M., Balikci, N., Celikler, S., Ari, F., Ulukaya, E., Guleryuz, G., & Ozel, M. Z. (2016). Evaluation of genotoxic and apoptotic potential of Hypericum adenotrichum Spach. in vitro. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, *74*, 137–146. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.11.010

Schiff, P. B., Fant, J., & Horwitz, S. B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, *277*(5698), 665–667. https://doi.org/10.1038/277665a0

Seyhan, S. A. (2019). DPPH antioksidan analizinin yeniden değerlendirilmesi. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, *9*(2), 125-135.

Sezginer, Hazal, and Feruzan Dane, 2015, "Toksik Maddelerin Genotoksik Analiz Yöntemleri", *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 1: 50-55.

Shanmugam, M. K., Dai, X., Kumar, A. P., Tan, B. K., Sethi, G., & Bishayee, A. (2014). Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence. *Cancer letters*, *346*(2), 206–216. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.016

Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, *113*(4), 1202-1205.

Sheng, H., & Sun, H. (2011). Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Natural product reports*, *28*(3), 543–593. https://doi.org/10.1039/c0np00059k

Shirasawa, K., Hirakawa, H., Nunome, T., Tabata, S., & Isobe, S. (2016). Genome-wide survey of artificial mutations induced by ethyl methanesulfonate and gamma rays in tomato. *Plant biotechnology journal*, *14*(1), 51–60. https://doi.org/10.1111/pbi.12348

Sil, R., Ray, D., & Chakraborti, A. S. (2013). Glycyrrhizin ameliorates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative stress in fructose-induced metabolic syndrome-X in rat model. *Indian journal of experimental biology*, *51*(2), 129–138.

Sil, R., Ray, D., & Chakraborti, A. S. (2015). Glycyrrhizin ameliorates metabolic syndrome-induced liver damage in experimental rat model. *Molecular and cellular biochemistry*, *409*(1-2), 177–189. https://doi.org/10.1007/s11010-015-2523-y

Silva, M.deL., David, J. P., Silva, L. C., Santos, R. A., David, J. M., Lima, L. S., Reis, P. S., & Fontana, R. (2012). Bioactive oleanane, lupane and ursane triterpene acid derivatives. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *17*(10), 12197–12205. https://doi.org/10.3390/molecules171012197

Simsek, F. (1999). Free radicals, antioxidants and lipid peroxidation. *Turkiye Klinikleri Journal of Pediatrics*, *8*(1), 42-47.

Singh, A. B., Yadav, D. K., Maurya, R., & Srivastava, A. K. (2009). Antihyperglycaemic activity of alpha-amyrin acetate in rats and db/db mice. *Natural product research*, *23*(9), 876–882. https://doi.org/10.1080/14786410802420416

Singh, D., Arya, P. V., Sharma, A., Dobhal, M. P., & Gupta, R. S. (2015). Modulatory potential of α-amyrin against hepatic oxidative stress through antioxidant status in Wistar albino rats. *Journal of ethnopharmacology*, *161*, 186–193. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.025

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schnider, E.L. 1988**.** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.,* 175: 184–191.

Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., & Waszkielewicz, A. M. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of applied genetics*, *55*(2), 273–285. https://doi.org/10.1007/s13353-014-0198-9

Sob, S. V. T., Wabo, H. K., Tchinda, A. T., Tane, P., Ngadjui, B. T., & Ye, Y. (2010). Anthraquinones, sterols, triterpenoids and xanthones from Cassia obtusifolia. *Biochemical Systematics and Ecology*, *38*(3), 342.

Stoddart M. J. (2011). Cell viability assays: introduction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *740*, 1–6. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1

Strober W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, *111*, A3.B.1–A3.B.3. https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111

Sumner, J. (2000). *The natural history of medicinal plants*. Timber press.

Syaza, S. K. F., Umar, R., Hazmin, S. N., Kamarudin, M. K. A., Hassan, A., & Juahir, H. (2017). Non-ionizing radiation as threat in daily life. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, *9*(2S), 308-316.

Szakiel, A., Pączkowski, C., Pensec, F., & Bertsch, C. (2012). Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, *11*(2-3), 263–284. https://doi.org/10.1007/s11101-012-9241-9

Şekeroğlu, V., & Atlı-Şekeroğlu, Z. (2011). Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *68*(4), 241-252.

Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V., & Kolören, Z., (2011), "The in vitro alkaline comet assay in genetic toxicology", *Journal of Applied Biological Sciences*, *5*(1), 49-54.

Şekeroğlu, Zülal Atlı, ve Vedat Şekeroğlu, "Genetik toksisite testleri", *TÜBAV Bilim Dergisi* 4.3 (2011): 221-229.

Tabakoğlu, E., & Durgut, R. (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *Avkae Derg*, *3*(1), 69-75.

Tekin, A., Dumlupinar, Z., & Bardak, A. (2022). Molecular characterization of mutant lines of Ayvalik olive cultivar obtained by chemical mutation. *Genetika*, *54*(2), 717-728.

Tiring, G., Satar, S., & Özkaya, O. (2021). Sekonder metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *35*(1), 203-215.

Turkez, H., Tatar, A., Hacimuftuoglu, A., & Ozdemir, E. (2010). Boric acid as a protector against paclitaxel genotoxicity. *Acta biochimica Polonica*, *57*(1), 95–97.

Ülger, T. G., & Ayhan, N. Y. (2020). Bitki sekonder metabolitlerinin sağlık üzerine fonksiyonel etkileri. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (3), 384-390.

Vasanthi, H. R., ShriShriMal, N., & Das, D. K. (2012). Retraction Notice: Phytochemicals from plants to combat cardiovascular disease. *Current medicinal chemistry*, *19*(14), 2242–2251. https://doi.org/10.2174/092986712800229078

Vatan, O., Celikler, S., & Yildiz, G. (2011). In vitro antigenotoxic and anti-oxidative capacity of *Hypnea musciformis (Wulfen) Lamouroux* extract in human lymphocytes. *African Journal of Biotechnology*, *10*(4), 484.

Viet, T. D., Xuan, T. D., & Anh, H. (2021). α-Amyrin and β-Amyrin Isolated from *Celastrus hindsii* Leaves and Their Antioxidant, Anti-Xanthine Oxidase, and Anti-Tyrosinase Potentials. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(23), 7248. https://doi.org/10.3390/molecules26237248

Yeum, K. J., Russell, R. M., & Aldini, G. (2010). Antioxidant activity and oxidative stress: An overview. *Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications*, 3-19.

Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(5), 559. https://doi.org/10.3390/molecules21050559

Zeiger E. (2004). History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and molecular mutagenesis*, *44*(5), 363–371. https://doi.org/10.1002/em.20062

Žiberna, L., Šamec, D., Mocan, A., Nabavi, S. F., Bishayee, A., Farooqi, A. A., Sureda, A., & Nabavi, S. M. (2017). Oleanolic Acid Alters Multiple Cell Signaling Pathways: Implication in Cancer Prevention and Therapy. *International journal of molecular sciences*, *18*(3), 643. https://doi.org/10.3390/ijms18030643

Zinkel, D. F., & Russell, J. (1989). Naval stores: production, chemistry, utilization. *(No Title)*

EKLER

EK 1 Etik Kurul Karar Yazısı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Alphn-Amyrin Molekülünün Potansiyel Genotoksik/Antigenotoksik, Sitotiksik ve Antioksidatif Etkilerinin in vilro Yöntemlerle Araştırılması
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 201 1-KAEK-26
	AÇIK ADRESİ	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat.] Görükle Kampüsü Nilüfer/ Bursa
	TELEFON	0.224.295 00 20
	FAKS	0.224. 295 oo 29
	E-POSTA	uukaek uluda .edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADVSOYADI	Prof.Dr.Serap Çelikler Kasımoğulları		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı		
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADVSOYADI	Yüksek Lisans Öğrencisi Gülay Bulut, Araş.Gör.Dr.Mehmet Sarımahmut		
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı		
	DESTEKLEYİCİ	Bursa Uluda Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Pro•eleri Berimi		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Pros ektifara tırma		
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Yüksek lisans tez alı ması		
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	15.12.2022/ 12 ay		
	GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI	4		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ 8	ÇOK MERKEZLİ	ULUSAL ULUSLARARASI

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Bel e Adı	Tarihi	Dili
	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	08.09.2022	Türkçe
	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	09.09.2022	Türkçe

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Bel e Adı		Açıklama
	ARA TIRMABÜTÇE FORMU	8	Tarih: 09.09.2022
	ARAŞTIRICILAR içiN TAAHHÜTNAME FORMU	8	Tarih: 09.09.2022
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARA TIRMA TAAHHÜTNAMESİ		Tarih: 09.09.2022
	KU klavuzunun okundu una dair taahhütname	8	Tarih: 09.09.2022
	SONY ÖZET RAPORU		
	DİĞER:		Araştırma ilk başvuru ön yazısı (Tarih- 13.09 2022), sorumlu araştırmacı özgeçmişi, tüm araştırıcılar tarafından imzalanmış Dün a Tl Birli i Helsinki Bildi esi, literatür

Şekil A.1. Etik kurul karar yazısı 1.sayfası

ULUDAG UNIVERSITESI TIP FAKULTESI KLINIK ARASTIRMALAR ETIK KURULU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Alpha-Amyrin Molekülünün Potansiyel Genotoksik/Antigenotoksik, Sitotiksik ve Antioksidatif Etkilerinin *in vitro* Yöntemlerle Araştırılması**

Karar No: 2022-16/65 **Tarih: 08 Kasım 2022**

KARAR BİLGİLERİ

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelendi.

1-Araştırmanın başvurusu dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna,

2- Araştırmanın yürütülmesi sırasında Etik kurul kaşesi bulunan "Onam" formlarının kullanılması ve bu formun çalışmaya katılan gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulmasına,

3-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine,

4-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırıcılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

ÜYELER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.M.Sertaç YILMAZ Üye	Farmakoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Yenidoğan BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	Bursa UÜ. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Özen ÖZ GÜL Üye	İç Hastalıkları Endokr.ve Metab.	BUÜ.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Endokrinoloji ve Metabolizma BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İzinli
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi. Tıp Tarihi ve Etik AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Av. Ahmet BAYRAM	Hukuk	Bursa UÜ.Rektörlüğü Hukuk Bürosu	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Ayşe ŞEN Üye	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye	Serbest Meslek	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Sayfa 2

Şekil A.2. Etik kurul karar yazısı 2. sayfası

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Gülay BULUT
Doğum Yeri ve Tarihi	: M.K.Paşa/BURSA
Yabancı Dil	: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise	: M.K.Paşa Sağlık Meslek Lisesi (2009)
Lisans	: BUÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2020)
Yüksek Lisans	: BUÜ Fen Bilimler Enstitüsü (2024)
Çalıştığı Kurum/Kurumlar	: Edirne Sultan I. Murat Devlet Hastanesi (2013)
	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bursa Yüksek İhtisas EAH (2013-)

İletişim (e-posta) : 502003008@ogr.uludag.edu.tr

Yayınları