



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



TRİTERPEN SAPONİN TÜRÜ BİLEŞİKLERİN POTANSİYEL ANTİKANSER ETKİNLİKLERİ VE TOKSİSİTESİ

Yüksek Lisans Tezi

Meryem Sıla DURMAZ

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**TRİTERPEN SAPONİN TÜRÜ
BİLEŞİKLERİN POTANSİYEL
ANTİKANSER ETKİNLİKLERİ VE
TOKSİSİTESİ**

Meryem Sıla DURMAZ

Danışman: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

Meryem Sıla DURMAZ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan Triterpen saponin türü bileşiklerin potansiyel antikanser etkinlikleri ve toksisitesi başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 14/08/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Üye : Prof.Dr. Lale AKTAŞ

Üye : Prof.Dr. Selma KATALAY

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Triterpen saponin türü bileşiklerin potansiyel antikanser etkinlikleri ve toksisitesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

14 / 08 / 2023

Meryem Sıla DURMAZ

ÖZET**TRİTERPEN SAPONİN TÜRÜ BİLEŞİKLERİN
POTANSİYEL ANTİKANSER ETKİNLİKLERİ
VE TOKSİSİTESİ**

DURMAZ, Meryem Sıla

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Ağustos 2023, 92 sayfa

Kanser, önemli ve küresel bir sağlık tehdidi olmakla birlikte dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Son birkaç on yıl içinde, kanser hücrelerinin, tümörün nüksetmesine neden olacak şekilde, geleneksel antikanser ilaçlara karşı çoklu ilaç direnci kazanabileceği açık hale geldiğinden yeni ve etkili antikanser ilaçları keşfetmeye sürekli bir ihtiyaç vardır. Bitkilerden elde edilen doğal ürünler, kanser ilaçlarının birincil kaynağı olarak hizmet vermiştir ve yeni bitki kaynaklı antikanser ilaçları sağlamaya devam etmektedir. Triterpenler, triterpenoidler olarak adlandırılan, bitkisel, hayvansal ve mantar kökenli doğal olarak oluşan alkenlerdir (Chudzik et al., 2015). Triterpen saponinler, saponin bileşikleri grubuna ait olan triterpenlerdir. Triterpen saponinler farklı etki mekanizmalarına sahip potansiyel antikanser ajanlar olarak bilinmektedir. Sitotoksik etkileri, apoptoz indüklenmesine veya apoptotik olmayan hücre ölümü stimülasyonuna bağlı olabilmektedir. Günümüze kadar birçok triterpen saponin bileşiği izole edilmiş olmakla birlikte bu bileşiklerin antikanser, anti-anjiyogenik aktivitesi ve toksisitesi üzerinde bu kapsamda bir çalışma mevcut literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, *Astragalus L.*'den izole edilen 3 triterpen saponin bileşiğinin (FA1, FA2, FA3) antioksidan kapasitesinin belirlenmesi, sitotoksik, genotoksik ve anti-anjiyogenik etkinlerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında 3 triterpen saponin bileşiğinin, *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenmesi için *In vitro* Hücre Temelli Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi testi ve MTT testi, apoptozun belirlenmesi için Flow Sitometri analizleri, genotoksik potansiyelin belirlenmesi için AMES testi ve anjiyogenik/antianjiyogenik etkiyi gözlemlemek için *In vitro* Scratch Assay ile Hücre Migrasyonunun Değerlendirilmesi ve HET-CAM testi yapılmıştır.

Kontrol hücreler (hücre canlılığı %100) ve 1 mM H₂O₂ ile hasara uğratılmış hücreler (hücre canlılığı %30.1) ile karşılaştırıldığında, FA1'in uygulanan konsantrasyonlarında H₂O₂ hasarına karşı koruyucu etki göstermediği belirlenmiştir. FA2'nin tüm konsantrasyonlarda (25, 50, 75 ve 100 µg/mL), FA3'ün ise 75 ve 100 µg/mL'de H₂O₂ hasarına karşı koruyucu antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. Sitotoksikite testinde yalnızca FA1'de sitotoksik etki gözlenmiş ve CCD34-LU, U87-MG ve SHSY-5Y hücre hatları için IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. FA1'in IC₅₀ değeri kullanılarak gerçekleştirilen flow sitometri analizinde apoptoz ve nekroz izlenmiştir. Üç bileşiğin de +S9 ve -S9 ortamlarda *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA102 suşlarına karşı maksimum konsantrasyonda (5000 µg/mL) bile genotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. FA1'in 400 µg/mL, FA2 ve FA3'ün 200 µg/mL ve üzeri uygulamalarında HET-CAM testi ile anti-anjiyogenik etki gösterdiği izlenmiştir.

Sonuç olarak bu 3 triterpen saponin bileşiğinin biyolojik aktivitesi ve toksisitesi moleküler seviyede ortaya konmuş ve bu bileşiklerin potansiyel antikanser ajanlar olabilecekleri gösterilmiştir. Daha ileri sonuçlar *in vivo* denemelerle desteklenmelidir.

Anahtar sözcükler: Anti-anjiyogenez, antikanser etkinlik, antioksidan kapasite, genotoksikite, sitotoksikite, triterpen saponin bileşikleri

ABSTRACT**POTENTIAL ANTICANCER ACTIVITIES
AND TOXICITIES OF TRITERPENE
SAPONINE COMPOUNDS**

DURMAZ, Meryem Sıla

MSc in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

August 2023, 92 pages

Cancer is a major global health threat and one of the leading causes of death worldwide. Over the past few decades, there is a constant need to discover new and effective anticancer drugs as it has become clear that cancer cells can acquire multidrug resistance to conventional anticancer drugs, causing tumor recurrence. Natural products derived from plants have served as the primary source of cancer drugs and continue to provide new plant-derived anticancer drugs. Triterpenes are naturally occurring alkenes of vegetable, animal, and fungal origin, called triterpenoids (Chudzik et al., 2015). Triterpene saponins are triterpenes that belong to the group of saponin compounds. Triterpene saponins are known as potential anticancer agents with different mechanisms of action. Their cytotoxic effects may be due to induction of apoptosis or stimulation of non-apoptotic cell death. Although many triterpene saponin compounds have been isolated to date, there is no study in the current literature on the anticancer, anti-angiogenic activity, and toxicity of these compounds. Therefore, this study, it was aimed to determine the antioxidant capacity of 3 triterpene saponin compounds (FA1, FA2, FA3) isolated from *Astragalus L.* and to reveal their cytotoxic, genotoxic, and anti-angiogenic effects.

Within the scope of the study, *In vitro* Cell Based Antioxidant Capacity Determination test and MTT test to determine the *in vitro* cytotoxic effect of 3 triterpene saponin compounds, Flow Cytometry analysis to determine apoptosis, AMES test to determine genotoxic potential and evaluation of Cell Migration by *In*

vitro Scratch Assay and HET-CAM test were performed to observe the angiogenic/antiangiogenic effect.

When compared with control cells (cell viability 100%) and cells damaged with 1 mM H₂O₂ (cell viability 30.1%), it was determined that FA1 did not show a protective effect against H₂O₂ damage at applied concentrations. It has been determined that FA2 has a protective antioxidant effect against H₂O₂ damage at all concentrations (25, 50, 75, and 100 µg/mL), and FA3 at 75 and 100 µg/mL. In the cytotoxicity test, the cytotoxic effect was observed only in FA1, and IC₅₀ values were calculated for CCD34-LU, U87-MG, and SHSY-5Y cell lines. Apoptosis and necrosis were observed in flow cytometry analysis using the IC₅₀ and the value of FA1. It was determined that all three compounds did not show genotoxic effects against *Salmonella typhimurium* TA98 and TA102 strains in +S9 and -S9 environments, even at maximum concentration (5000 µg/mL). The anti-angiogenic effect was observed with the HET-CAM test in the applications of FA1 at 400 µg/mL, FA2, and FA3 at 200 µg/mL and above.

As a result, the biological activity and toxicity of these 3 triterpene saponin compounds have been demonstrated at the molecular level and it has been shown that these compounds can be potential anticancer agents. Further results should be supported by *in vivo* trials.

Keywords: Anti-angiogenesis, anticancer activity, antioxidant capacity, genotoxicity, cytotoxicity, triterpene saponin compounds

ÖNSÖZ

Kanser hastalığı halk sağlığı için küresel bir tehdit oluşturmakta olup epidemiyolojik veriler, tüm dünyada kanser prevalansının yıldan yıla arttığını açıkça göstermektedir. Kanser, önemli ve küresel bir sağlık tehdidi olmakla birlikte dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Artan kanser insidansı nedeniyle daha az yan etkili yeni antikanser ilaçlara duyulan ihtiyaç ise hergün daha fazla artmaktadır.

Kanser tedavisinde yeni terapilere ve kemoterapötik ilaçlara acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez projesi kapsamında, *Astragalus* L.' den izole edilen 3 triterpen saponin bileşiğinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi, sitotoksik, genotoksik ve anti-anjiyogenik etkinlerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu amaçla izole edilen bileşiğin antikanser etkinliğinin moleküler seviyede ortaya konması ve olası toksisitesinin belirlenmesi ve literatüre katkı sağlaması hedeflenmektedir.

Bu tez çalışması Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu FYL-2023-28468 nolu proje ile desteklenmiştir. Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'na teşekkür ederim.

İZMİR

14/08/2022

Meryem Sıla DURMAZ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxii
1. Giriş	1
1.1. Kanser	3
1.1.1. Kanserin Nedenleri	4
1.1.2. Kanser Tedavi Yöntemleri	5
1.2. Tripten Saponin	6
1.2.1. Tripten Saponin Etki Mekanizması	9
1.2.2. Yan Etkileri	10
2. MATERYAL VE METOT	11
2.1. Materyal.....	11
2.2. Metot.....	12
2.2.1. <i>In vitro</i> Hücre Temelli Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi	12

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

2.2.2. Antikanser Etkinlik ve Apoptoz Değerlendirmesi.....	13
2.2.2.1. Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi (MTT Yöntemi).....	13
2.2.2.2. Apoptotik Etkinin Belirlenmesi (Flow Sitometri)	15
2.2.3. <i>Salmonella/Mikrozom</i> Mutasyon (Ames) Testi ile Genotoksik Potansiyelin Belirlenmesi.....	15
2.2.4. Anti-Anjiyogenik Etkinin Belirlenmesi	19
2.2.4.1. HUVEC Hücre Hattında Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi (MTT Yöntemi)	19
2.2.4.2. <i>In vitro</i> Scratch Assay ile Hücre Migrasyonunun Değerlendirilmesi	20
2.2.4.3. TNF- α Seviyesinin Belirlenmesi	20
2.2.4.4. Koryoallantoik Membran Testi (HET-CAM).....	21
3. BULGULAR	22
3.1. <i>In vitro</i> Hücre Temelli Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi.....	23
3.2. Antikanser Etkinlik ve Apoptoz Değerlendirmesi.....	25
3.2.1. Sitotoksisite Testi (MTT) Sonuçları	25
3.2.2. Flow Sitometri Sonuçları	41
3.3. <i>Salmonella/Mikrozom</i> Mutasyon (Ames) Testi ile Genotoksik Potansiyelin Belirlenmesi	43

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.4. Anti-Anjiyogenik Etkinin Belirlenmesi.....	43
3.4.1.1. HUVEC Hücre Hattında Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi (MTT Yöntemi)	43
3.4.1.2. In vitro Scratch Assay ile Hücre Migrasyonunun Değerlendirilmesi	45
3.4.1.3. TNF- α Seviyesinin Belirlenmesi	48
3.4.2. HET-CAM Testi Sonuçları	49
4. TARTIŞMA	51
5. SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR DİZİNİ	57
TEŞEKKÜR.....	65
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1. 2020’de her cinsiyetten ve her yaştan bildirilen yeni kanser vakaları	1
1.2. 2020’de her cinsiyetten ve her yaştan bildirilen kanser kaynaklı ölümler	2
1.3. Kansere neden olan faktörler	5
1.4. Triterpenoid Yapısı	7
1.5. Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin (FA1, FA2, FA3) yapısı	9
1.6. Saponinlerin kanser hücreleri üzerindeki çok yönlü etkileri	10
2.1. HET-CAM değerlendirilmesinde kullanılan skor değerleri	22
3.1. FA1’in uygulanan konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ hasarına karşı hücre canlılığı grafiği. Kontrol 1: Test materyali ve H ₂ O ₂ içermeyen ortam kullanılan kültür, Kontrol 2: Test materyali içermeyen, 1 mM H ₂ O ₂ içeren kültür	23
3.2. FA2’nin uygulanan konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ hasarına karşı hücre canlılığı grafiği. Kontrol 1: Test materyali ve H ₂ O ₂ içermeyen ortam kullanılan kültür, Kontrol 2: Test materyali içermeyen, 1 mM H ₂ O ₂ kültür	24
3.3. FA3’ün uygulanan konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ hasarına karşı hücre canlılığı grafiği. Kontrol 1: Test materyali ve H ₂ O ₂ içermeyen ortam kullanılan kültür, Kontrol 2: Test materyali içermeyen, 1 mM H ₂ O ₂ içeren kültür	24
3.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan 3 maddeye bağlı CCD 34 LU hücrelerinin canlılık değerleri.....	25
3.5. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan 3 maddeye bağlı U87 MG hücrelerinin canlılık değerleri	26

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil Sayfa

3.6. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan 3 maddeye bağlı SH-SY5Y hücrelerinin canlılık değerleri 26

3.7. CCD 34LU hücre hattında kontrol uygulamalarının morfolojik incelemesi. A: 0. Saat; B: 24 saat; C: 24saat maddeden sonra; D: 48 saat maddeden sonra. 27

3.8. CCD hücre hattında DOXO uygulaması A:DOXO 0.2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; B: DOXO 2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; C: DOXO 20ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat 28

3.9. FA1'in farklı dozlarının CCD 34LU hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması .. 29

3.10. FA2'nin farklı dozlarının CCD 34LU hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X) A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması ... 30

3.11. FA3'ün farklı dozlarının CCD 34LU hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması .. 31

3.12. U87 MG hücre hattında kontrol uygulamalarının morfolojik incelemesi. A: 24 saat; B: 24saat maddeden sonra; C: 48 saat maddeden sonra 31

3.13. U87 MG hücre hattında DOXO uygulaması A:DOXO 0.2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; B: DOXO 2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; C: DOXO 20ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat 32

3.14. FA1'in farklı dozlarının U87 MG hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması .. 33

3.15. FA2'nin farklı dozlarının U87 MG hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması .. 34

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil Sayfa

3.16. FA3'ün farklı dozlarının U87 MG hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması. .35

3.17. SH-SY5Y hücre hattında kontrol uygulamalarının morfolojik incelemesi. A: 0. Saat; B: 24 saat; C: 24saat maddeden sonra; D: 48 saat maddeden sonra 36

3.18. SH-SY5Y hücre hattında DOXO uygulaması A:DOXO 0.2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; B: DOXO 2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; C: DOXO 20ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat..... 37

3.19. FA1'in farklı dozlarının SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması ..38

3.20. FA2'nin farklı dozlarının SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması ..39

3.21. FA3'ün farklı dozlarının SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması ..40

3.22. (A) U87-MG hücre hattında DMSO uygulaması (kontrol), (B) U87-MG hücre hattında DMSO uygulaması (kontrol) (C) FA1 1x IC50 uygulaması, (D) FA1 2x IC50 uygulaması 41

3.23. (A) SH-SY5Y hücre hattında DMSO uygulaması (kontrol), (B) U87-MG hücre hattında DMSO uygulaması (kontrol) (C) FA1 1x IC50 uygulaması, (D) FA1 2x IC50 uygulaması 42

3.24. FA1 maddesinin HUVEC hücre hattında hücre canlılığı oranları (Negatif Kontrol: %1 Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besi ortamı) 44

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil	Sayfa
3.25. FA2 maddesinin HUVEC hücre hattında hücre canlılığı oranları (Negatif Kontrol: %1 Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besi ortamı).....	44
3.26. FA3 maddesinin HUVEC hücre hattında hücre canlılığı oranları (Negatif Kontrol: %1 Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besi ortamı).....	44
3.27. HUVEC hücre hattında test maddesi içermeyen kontrol grubunun A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi.....	45
3.28. HUVEC hücre hattında süramin uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi	45
3.29. HUVEC hücre hattında FA1 0.05 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi	46
3.30. HUVEC hücre hattında FA1 0.025 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi	46
3.31. HUVEC hücre hattında FA2 0.05 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi	46
3.32. HUVEC hücre hattında FA2 0.025 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi	47
3.33. HUVEC hücre hattında FA3 0.05 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi	47
3.34. HUVEC hücre hattında FA3 0.025 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi	47
3.35. TNF- α standart grafiği.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil	Sayfa
3.36 TNF- α konsantrasyonu (pg/ml).....	48
3.37. Çözgen kontrol (DMSO), B: Pozitif Kontrol (Süramin), C: Negatif Kontrol (NACL)	49
3.38. FA1'in farklı dozlarda uygulanmasıyla koryoallantoik membrandaki değişimler. A:100 ug/ml B: 200ug/ml C: 400 ug/ml	49
3.39. FA2'nin farklı dozlarda uygulanmasıyla koryoallantoik membrandaki değişimler. A:100 ug/ml B: 200ug/ml C: 400 ug/ml	50
3.40. FA3'ün farklı dozlarda uygulanmasıyla koryoallantoik membrandaki değişimler. A:100 ug/ml B: 200ug/ml C: 400 ug/ml	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge Sayfa

Çizelge 3.1: FA1, FA2 VE FA3'ün *Salmonella typhimurium* suşlarında
oluşturduğu revertant koloni sayıları 43



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
cm	Santimetre
dk	Dakika
IC ₅₀	% 50 inhibisyona neden olan konsantrasyon
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
nm	Nanometre
pH	H Hidrojen gücü
s	Saniye

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

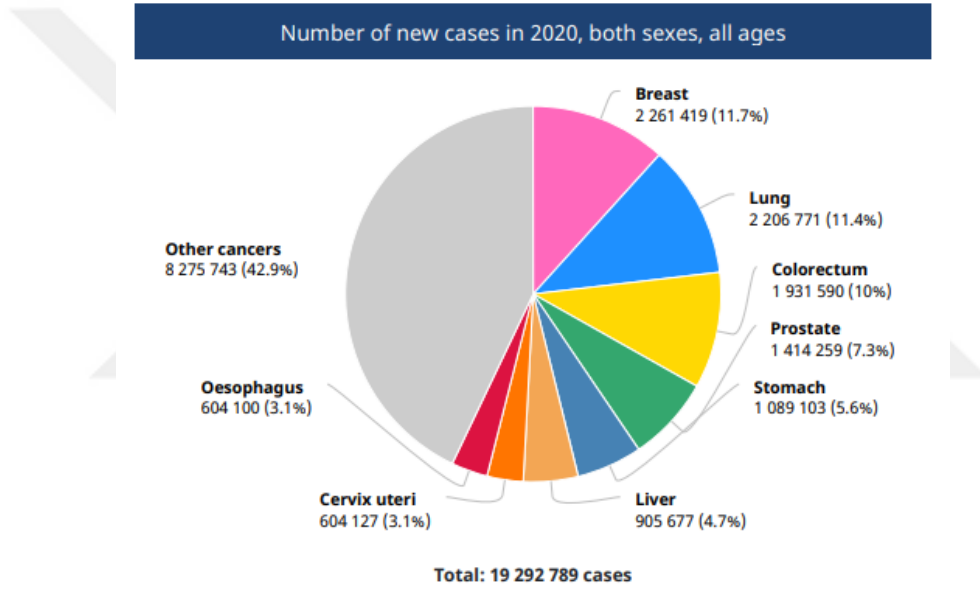
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CAM	Koryoallantoik membrane
CCD 34 LU	sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı
CO ₂	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetik sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal sığır serum
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HUVEC	İnsan Göbek Damarı Endotel Hücreleri
KCL	Potasyum klorür
His	Histidin
MGA	Minimal Glukoz Agar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

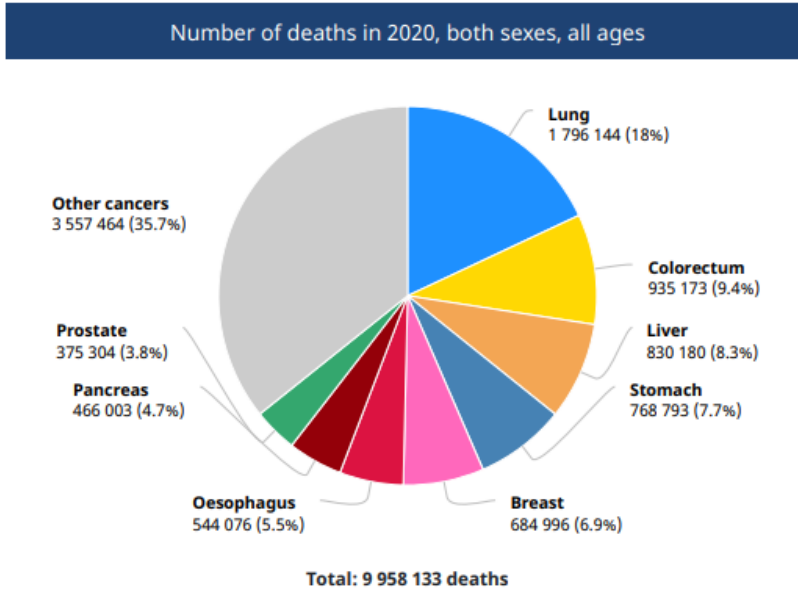
NaCl	Sodyum klorür
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
OECD	Ekonomik kalkınma ve işbirliği
PANC-1	İnsan pankreas karsinoma hücre hattı
PBS	Fosfat tuz tamponu
PI	Propidium iyodür
RNA	Ribonükleik asid
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SH-SY5Y	İnsan nöroblastoma hücre hattı
TS	Timidilat sentaz
U87 MG	İnsan glioblastoma hücre hattı
VERO	Cercopithecus aethiops böbrek fibroblast hücreleri

1. GİRİŞ

Kanser, önemli ve küresel bir sağlık tehdidi olmakla birlikte dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. 2020 yılında dünya çapında tahminen 19,3 milyon yeni kanser vakası (18,1 milyon melanom dışı cilt kanseri hariç) ve yaklaşık 10,0 milyon kanser ölümü (9,9 milyon melanom dışı cilt kanseri hariç) meydana geldi (Sung et al., 2021) (Şekil 1.1 ve 1.2). Son birkaç on yıl içinde, kanser hücrelerinin, tümörün nüksetmesine neden olacak şekilde, geleneksel antikanser ilaçlara karşı çoklu ilaç direnci kazanabileceği açık hale geldiğinden yeni ve etkili antikanser ilaçları keşfetmeye sürekli bir ihtiyaç vardır (Tilaoui et al., 2021).



Şekil 1.1: 2020’de her cinsiyetten ve her yaştan bildirilen yeni kanser vakaları (Globacan, 2020)



Şekil 1.2: 2020’de her cinsiyetten ve her yaştan bildirilen kanser kaynaklı ölümler (Globacan, 2020)

Bitkilerden elde edilen doğal ürünler, kanser ilaçlarının birincil kaynağı olarak hizmet vermiştir ve yeni bitki kaynaklı antikanser ilaçları sağlamaya devam etmektedir (Tilaoui et al., 2021). Bitkilerde bulunan sekonder metabolitler, oksidatif stres, inflamasyon, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve istila ile ilişkili hücre içi sinyal yollarının modülasyonu yoluyla kanser hücrelerini etkileyebilmektedir (Koczurkiewicz et al., 2015). Bazı *Astragalus* türlerinin Uzakdoğu geleneksel tıbbında kanser tedavisi için kullanıldığı bildirilmiştir. Bunlar arasında *Astragalus membranaceus* benzersiz bir öneme sahiptir. *A. membranaceus* tek başına veya bitkisel formüllerin bir bileşeni olarak kanser hastalarının hayatta kalma oranlarını artırmak için ilaç olarak reçete edilmekte veya kansere karşı profilaktik olarak kullanılmaktadır. *A.membranaceus*' un kök ekstraktlarının, kanser hastalarında bağışıklık fonksiyonlarını uyardığını ve konakçıya karşı aşı yanıtını arttırdığı gösterilmiştir (Yoshida et al., 1997; Yesilada et al, 2005).

Triterpenler, triterpenoidler olarak adlandırılan, bitkisel, hayvansal ve mantar kökenli doğal olarak oluşan alkenlerdir (Chudzik et al., 2015). Triterpen saponinler, saponin bileşikler grubuna ait olan triterpenlerdir. Saponinlerin farklı etki mekanizmalarına sahip potansiyel antikanser ajanlar olduğu bilinmektedir.

Sitotoksik etkileri, apoptoz indüklenmesine veya apoptotik olmayan hücre ölümü stimülasyonuna bağlı olabilmektedir (Podolak et al., 2010). Kansere hücrelerinde saponin tedavisi, otofajik hücre ölümünü uyarabilmekte, nitrik oksit üretimini azaltmakta ve hücre iskeleti bütünlüğünün bozulmasına neden olabilmektedir. Günümüze kadar birçok triterpen saponin bileşiği izole edilmiş olmakla birlikte bu bileşiklerin anti kanser, anti anjiyogenik aktivitesi ve toksisitesi üzerinde bu kadar ayrıntılı bir çalışma mevcut literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında, *Astragallus* L.' den izole edilen triterpen saponin bileşiklerinin sinir sistemi tümörleri üzerindeki antikanser etkinlikleri ile anti-anjiyogenik etkilerinin ortaya konması amaçlanmaktadır.

1.1.Kanser

Hücre bölünmesinin doğal sürecindeki patofizyolojik değişikliklerin hastalığı olan kanser, dünya çapında yıldan yıla çok sayıda ölümden sorumlu önemli bir hastalık olarak ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda 19,3 milyondan fazla (19.300.000) yeni kanser vakası teşhis ve rapor edilmiştir, bu da bildirilen verilere göre 2020'de yaklaşık 10 milyon ölüme yol açmıştır (Chhikara et al., 2022). Dünyada her yıl yaklaşık 19-20 milyon kişiye kanser teşhisi konmaktadır.

Mevcut literatür incelendiğinde 100'den fazla kanser türünün insan vücudunun çeşitli dokularını etkilediği bilinmektedir (Jemal et al., 2011; Cancer Research, 2016). Hem erkek ve hem de kadınlarda en sık görülen ve ölümlerle sonuçlanan kanser türü akciğer kanseridir. Erkeklerde 2.sırada prostat kanseri, kadınlarda ise meme kanseri gelmektedir (McGuire, 2014; Siegel et al., 2015). Merkezi sinir sisteminden (MSS) kaynaklanan kötü huylu tümörler en korkulan kanser türleri arasındadır. Glioblastoma, kötü prognozlu ve 1 yıllık sağ kalım oranı sadece %35.7 olan primer beyin tümörünün en yaygın malign formudur. Radyoterapi ve adjuvan ile kombine gerçekleştirilen cerrahi rezeksiyon, sağkalımı uzatan ancak küratif olmayan mevcut standart bakım tedavisi olarak bilinmektedir.

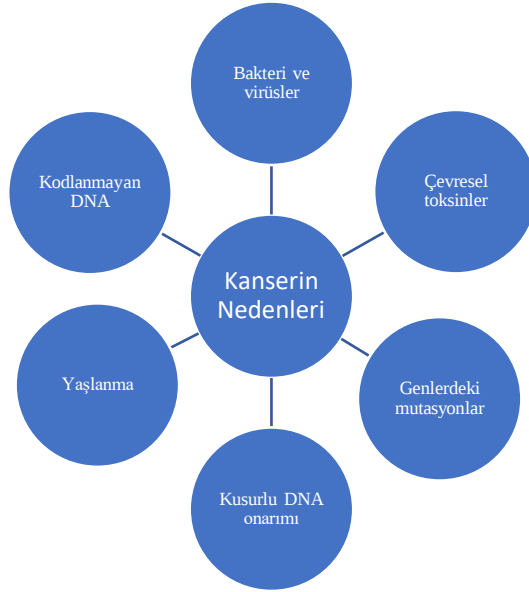
Glioblastoma yetişkinlerde daha sık görülmekte olup çocuklarda da ortaya çıkabilmektedir. Nöroblastoma ise, nöral krest hücrelerinden kaynaklanan ve çocuklarda en sık görülen ekstrakraniyal solid kanserdir. Düşük riskli nöroblastomlar iyi sonuçlarla ilişkilidir, ancak yüksek riskli nöroblastomlu çocuklar multimodal tedaviden sonra bile sıklıkla nüks edebilmektedir (Ramachandran et al., 2017).

Kanser Türleri (Etkilenen Doku Bazında);

- Karsinomlar, akciğer, meme ve kolon kanseri gibi vücudun iç ve dış kısımlarını kaplayan hücrelerle karakterize edilir.
- Sarkomlar, kemik, kıkırdak, yağ, bağ dokusu, kas ve diğer destekleyici dokularda bulunan hücreler ile karakterize edilir.
- Lenfomalar, lenf düğümlerinde ve bağışıklık sistemi dokularında başlayan kanserlerdir.
- Lösemiler, kemik iliğinde başlayan ve sıklıkla kan dolaşımında biriken kanserlerdir.
- Adenomlar tiroid, hipofiz bezi, adrenal bez ve diğer glandüler dokularda ortaya çıkan kanserlerdir (Mathur et al., 2015).

1.1.1. Kanser Nedenleri

Kanser kökeni ve ilerlemesi, hücre içindeki birçok faktöre (mutasyonlar, bağışıklık koşulları ve hormonlar) olduğu kadar çevreden gelen dış faktörlere (sigara, kimyasallar, bulaşıcı organizmalar ve radyasyonlar) bağlıdır (Şekil 1.3). Tüm bu unsurlar, anormal hücre davranışına ve kontrolsüz çoğalmaya neden olmak için birlikte hareket eder. Oluşan olağandışı hücre kütlesi vücutta büyür ve çevresindeki normal dokuları etkiler ve bazen vücudun diğer bölgelerine de yayılır (metastaz) (Rehman et al., 2018).



Şekil 1.3: Kansere neden olan faktörler (Rehman, 2018)

1.1.2. Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinin hedefleri, bilinen tümörleri tamamen ortadan kaldırmak, birincil kanserin tekrarını veya yayılmasını önlemek ve tüm makul iyileştirici yaklaşımlar tükendiğinde semptomları hafifletmeyi içerir. Kanser hastalarına uygulanan başlıca tedavi yöntemleri şu şekilde sıralanabilir:

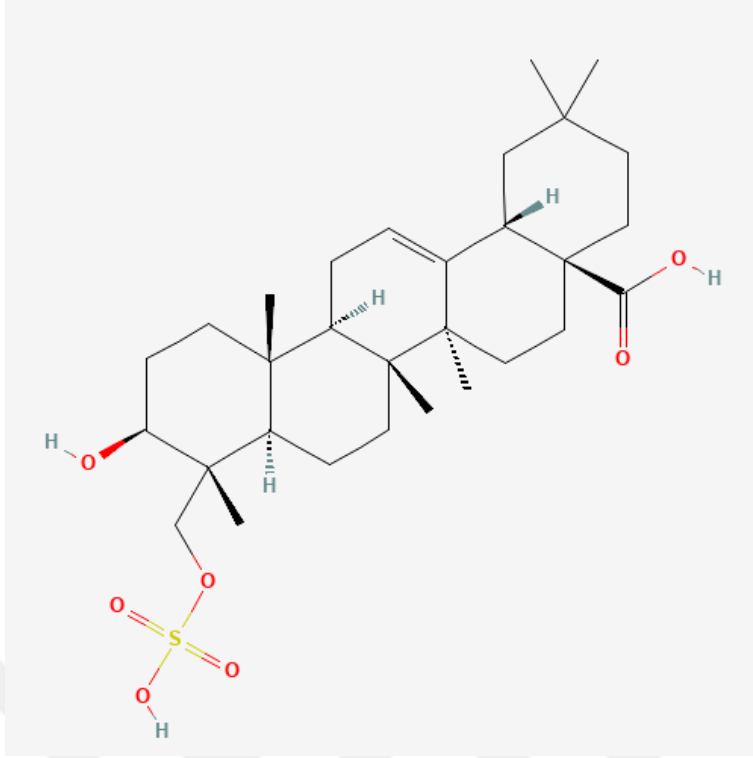
- Cerrahi operasyon,
- Kemoterapi,
- Radyoterapi,
- İmmünoterapi,
- Kök hücre ve kemik iliği nakli,
- Hormon tedavisi,
- Antikor tedavisi.

Kanser tedavisine önemli katkılarına rağmen, tüm geleneksel kemoterapi ilaçları, hızlı eliminasyon, zayıf biyoyararlanım, düşük intratumoral salınım, spesifik olmayan sitotoksikite ve bunun sonucunda sıklıkla ilaç direncinin başlamasıyla takip edilen sistemik yan etkiler dahil olmak üzere çeşitli dezavantajlardan muzdariptir (Ioel et al., 2022).

Önümüzdeki on yıl, hedeflenen ilaçları veya yeni terapötik ajanları ve sitotoksik maddeleri daha etkili bir şekilde birleştirmek için denemeler tasarlama zorluğunu ortaya çıkaracaktır. Bu denemelere, belirli ilaçlara yanıt verme olasılığı en yüksek olan hastaları belirlemek için genomik ve moleküler araştırmalar yardımcı olacak ve böylece etkisiz tedavinin maliyetini ve toksisitesini azaltacaktır. (Urruticoechea et al., 2010).

1.2.Triterpen Saponin

Triterpenler, triterpenoidler olarak adlandırılan, bitkisel, hayvansal ve mantar kökenli doğal olarak oluşan alkenlerdir (Chudzik et al., 2015). Triterpen saponinler, saponin bileşikleri grubuna ait olan triterpenlerdir. Tipik bir saponin molekülü, bir izoprenoid birimi ve bir şeker kalıntısından oluşan farklı yapısal bileşenlerden oluşmaktadır (Şekil 1.4). İlkine aglikon bileşeni, ikincisine ise glikon adı verilmektedir. Saponinlerin biyolojik aktivitelerinin bu amfifilik doğalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Triterpen saponinler (bazik), 2,3-oksidoskualenden türetilen 30 karbonlu bir omurga yapısına sahip dört veya beş halkadan oluşmaktadır. Pentasiklik triterpenoidler bitkilerde en bol bulunanlardır ve oleananlar, lupanlar, ursanlar ve türevlerini içermektedirler (Elekofehinti et al., 2021). Triterpen glikozitler, doğada en yaygın bulunan saponinlerdir.



Şekil 1.4: Triterpenoid Yapısı (National Center for Biotechnology Information, 2023)

Saponinlerin farklı etki mekanizmalarına sahip potansiyel antikanser ajanlar olduğu bilinmektedir. Sitotoksik etkileri, apoptoz indüklenmesine veya apoptotik olmayan hücre ölümü stimülasyonuna bağlı olabilmektedir (Podolak et al., 2010). Kanser hücrelerinde saponin tedavisi, otofajik hücre ölümünü uyarabilmekte, nitrik oksit üretimini azaltmakta ve hücre iskeleti bütünlüğünün bozulmasına neden olabilmektedir. Bu bileşiklerin sitotoksik etkilerinin, apoptoz veya hücre ölümünün apoptotik olmayan uyarımı ile başlatılabildiği düşünülmektedir. Kapsamlı literatür araştırması, saponinlerin apoptoz, ferroptoz, onkotik nekroz, nekroptoz ve otofaji yoluyla kanser hücresi ölümünü indüklemedeki önemli yeteneğini ortaya çıkarmıştır (Elekofehinti et al., 2021). Bunun yanı sıra triterpen saponinler geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesine sahiptir. Bunlar arasında biyolojik zarlarla etkileşime girme yetenekleri uzun süredir çalışılmaktadır. Bu bileşikler kısa süreli hücre zarı yeniden düzenlemelerine veya tamamen yok olmasına neden olabilmektedirler. Saponinler, zarda gözenek oluşturabilmeleri sayesinde hücrelerin iyonik dengesini bozarak hücre lizisine ve ölümüne yol açabilmektedirler. Literatürde nispeten iyi tanımlanmış olan saponositlerin sitotoksik ve hemolitik aktiviteleri dikkati çekmektedir (Koczurkiewicz et al., 2015).

Çok sayıda çalışmadan elde edilen gözlemler, saponinlerin biyolojik aktivitesinin hem aglikon hem de şeker kısmından etkilendiğini doğrulamaktadır. Yapı-aktivite ilişkileriyle ilgili mevcut bilgilerin çoğu, saponinlerin hemolitik etkisi üzerine yapılan araştırmalardan gelmektedir (Podolak et al, 2010).

Triterpenler sadece neoplastik hücre dizilerinin yaşamını inhibe etmekle kalmamakta, aynı zamanda kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyerek vücudun normal hücrelerine tehdit oluşturmada intihar ölümlerine neden olmaktadır. Triterpenlerin aktivitesinin seçiciliği, onları kanser tedavisi ve önlenmesinde alternatifler olarak sunmaktadır. Bu nedenle, sitotoksik özelliklerinin ve altta yatan mekanizmaların değerlendirilmesi için bu tür bileşiklerin izolasyon yoluyla elde edilmesi esastır (Chudzik et al., 2015). Bitkilerden izole edilen triterpenoidler, doğal ürünlerin en büyük gruplarından biridir ve bazıları antioksidan aktivite, antiinflamatuvar aktivite, hepatoprotektif etkiler ve antitümör aktivite gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedirler. Modern farmakolojik çalışmada bu bitkinin antioksidan, nöroproteksiyon, kandaki lipiti azaltma ve antidiyabetik aktivite dahil olmak üzere birçok biyolojik aktivitesi gösterilmiştir (Yan Zhang et al., 2018).

Bu çalışmada kullanılan triterpen saponin bileşikler Şekil 1.5’de sunulmuştur.

FA1: α -6-O- β -D-Glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,24 α -tetrahydroxy-20(R),25-epoxycycloartane

FA2: Cyclocephaloside 1

FA3: Oleifolioside B

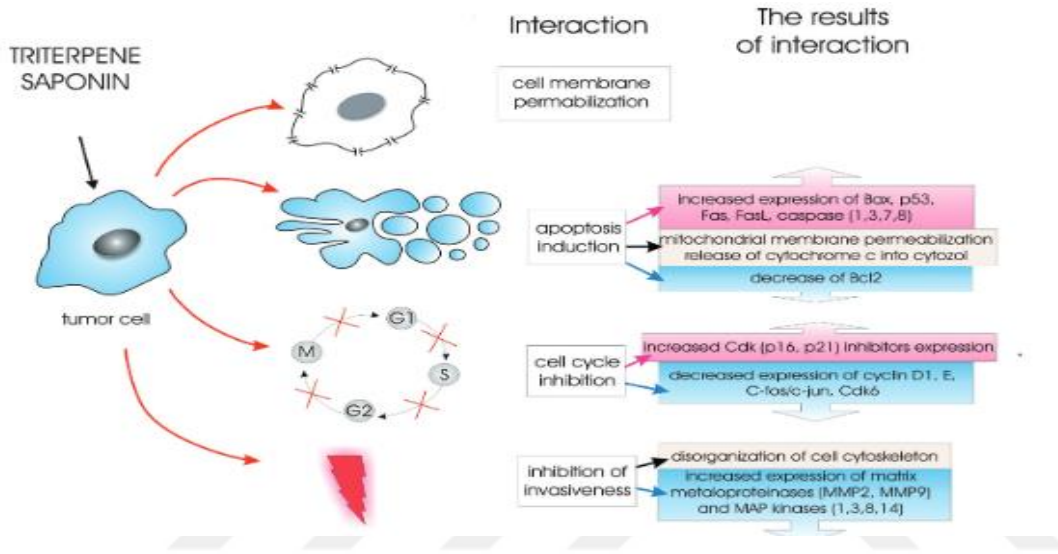
Bileşimin Adı	Bileşimin Yapısı
1 6- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-3β,6α,16β,24α-tetrahydroxy-20(R),25-epoxycycloartane	
2 Cyclocephaloside 1	
3 Oleifolioside B	

Şekil 1.5: Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin (FA1, FA2, FA3) yapısı.

1.2.1. Etki mekanizması

Kimyasal olarak triterpen saponinler, triterpenlerin glikozitleridir. Aglycone veya sapogenin olarak adlandırılan polar glikon kısmı (şeker) ve şeker olmayan polar olmayan bileşenlerden oluşurlar. Molekölün iki kısmı çoğunlukla bir eter bağı ile birbirine bağlanır. Aglykoniler çoğunlukla pentasiklik, karbon halkarından yapılıdır. Şeker parçaları, monosakkaritlerden oluşan 1-3 düz veya dallı zincir içerir ve bunların en yaygın olanları şunlardır: D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz, L-arabinoz, D-ksiloz, L-fukoz ve yağ asitleri: D-glukuronik asit ve D-galakturonik asit (Koczurkiewicz et al., 2015). Moleküllerdeki kayda değer, küçük yapısal değişiklikler, bu bileşiklerin aktivitelerinde büyük farklılıklar gösterebilir. Çeşitli saponinlerin ve birçok steroidal glikoalkaloidin en yoğun olarak incelenen etkisi, membran pertürbasyonuna neden olma yetenekleridir. Saponinlerin sıklıkla gözlemlenen memeli eritrositlerinin parçalanmasına neden olma yeteneğinin moleküler temeli olduğu düşünüldüğünden, bu özellik genellikle "saponinlerin hemolitik aktivitesi" olarak adlandırılır (Augustin et al., 2011).

Bu konuyla ilgili raporların sayısı katlanarak artmaktadır ve saponinlerin aktivitesine ilişkin *in vitro* veriler son zamanlarda *in vivo* analizlerle daha sık tamamlanmaktadır. Tümör hücreleri üzerindeki 3 temel saponozid etki kategorisini tanımlamaya yardımcı oldular. Bunlar şunları içerir: (1) sitostatik (2) pro-apoptotik ve (3) anti-metastatik etkiler. Saponinler ayrıca kanser hücrelerini diğer kemoterapötik ilaçların sitostatik, pro-apoptotik ve anti-metastatik etkilerine karşı duyarlı hale getirir (Koczurkiewicz et al., 2015) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6: Saponinlerin kanser hücreleri üzerindeki çok yönlü etkileri (Koczurkiewicz et al., 2015)

1.2.2. Yan etkileri

Birçok saponin glikozit, uzun bir süre boyunca yüksek dozlarda toksik etkiler göstererek aşırı salivasyon, ishal, kusma, iştahsızlık ve felç belirtileri gibi sorunlara neden olur. Sıcakkanlı hayvanlarda saponinlerin oral toksisitesi, bağırsak sisteminden düşük emilimi nedeniyle nispeten düşüktür (çoğu soğukkanlı hayvan, örneğin balık için yüksek toksisitenin aksine).

Bununla birlikte, saponinler gastrointestinal tahriş edicidir ve daha hafif örneklerde bu, hassas veya aşırı kilolu hastalarda özofageal reflüye yol açabilir. Bağırsak yolu nedeniyle saponinlerin düşük mevcudiyeti, önemsiz toksisite ile sonuçlanır. Ek olarak, intravenöz olarak verildiklerinde oldukça toksiktirler (Bartnik et al., 2017).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Proje kapsamında materyal olarak EÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. Tamer Karayıldırım ve Araş. Gör. Dr. Rabia Nur ÜN tarafından *Astragallus* sp. den izole edilen triterpen saponin bileşikleri kullanıldı.

AMES testi için kullanılan, test bakterisi, *Salmonella typhimurium* suşları stok halinde (Xenometrix, İsviçre) satın alınmıştır. HET-CAM analizi için kullanılan Leghron beyaz tavuk yumurtaları İzmir Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü'nden satın alınmıştır. MTT ve Flow Sitometri analizlerinde kullanılan hücre kültürleri malzemeleri; DMEM/F12, %0,25'lik Tripsin-EDTA, FBS, penisilin (Gibco, ABD), MTT (Sigma, ABD), HEPES (Sigma, ABD), PBS (Gibco, ABD), Doxorubicin (Sigma, ABD), DMSO (Sigma, ABD), Invitrogen eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit (Invitrogen, ABD), 6 gözlü ve 96 gözlü mikroparka (Corning, ABD), T-flask (25 cm² , 75 cm²).

Cihazlar; Sınıf 2 laminar akışlı biyogüvenlik kabini (ESCO, Singapur), CO₂'li İnkübatör (ThermoFisher Scientific, ABD), flow sitometri (BD Biosciences, ABD), 96 gözlü spektrofotometre, santrifüj cihazı, -86 °C ve -20 °C dondurucu (Thermo Fisher Scientific, ABD), inverted mikroskop (Zeiss, ABD), ışık mikroskobu (Olympus, Hamburg, Almanya), Vorteks Karıştırıcı (ThermoFisher Scientific, ABD), Ultrasonik banyo (ISOLAB, Türkiye) şeklindedir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre hatları; VERO hücre hattında (C.aethiops böbrek fibroblast hücresi, ATCC CRL-1587), SHSY-5Y (İnsan nöroblastoma hücre hattı, ATCC HTB-11), U87-MG (İnsan glioblastoma hücre hattı, ATCC HTB-14) ve CCD34-LU (sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı, ATCC N.CRL-1491) Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden Prof. Dr. Ayşe Nalbantsoy' dan ve EGE MATAL'ın hücre kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Triterpen Saponin Bileşiklerinin *In vitro* Hücre Temelli Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Bileşiklerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde hücre kültürünün temel alındığı yöntemin kullanılması planlanmıştır. Bu yöntemin uygulanması kapsamında H₂O₂ uygulanmasının ardından hücrelerde stres meydana getirilmesi ve ardından bileşik uygulanmasından sonra hücre canlılığındaki değişikliğin tespit edilmesi planlanmıştır. (Zhang et al., 2013).

Hücre temelli antioksidan kapasitenin belirlenmesi yöntemi doğrultusunda VERO hücre hattı (*Cercopithecus aethiops* böbrek fibroblast hücreleri ATCC® CRL-1587TM) biyolojik aktivitenin hücresel düzeyde etkilerini araştırmak amacıyla kullanılmıştır.

- Öncelikle VERO hücreleri, fetal sıgır serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren MEM (Minimum Essential Medium Eagle) ortamında, 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.
- Hücreler 96 kuyucuklu plakalarda %80 konfluent oluncaya kadar büyütülmüştür.
- Bileşikler kuyucuklara eklenmiş ve sonrasında hücreler 2 saat inkübe edilmiştir.
- Bu işlemin ardından eklenen bileşikleri uzaklaştırmak için hücreler PBS ile yıkanmış ve sonrasında hücrelerde oksidatif stres oluşturmak amacıyla H₂O₂ uygulanmıştır. Daha sonra hücreler 1,25 mM H₂O₂ eklenerek %5 CO₂, nemli ortam, 37 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir.
- Bu sürenin sonunda, hücre canlılığını belirlemek için MTT testi gerçekleştirilmiştir.

- Bileşik uygulanmasından ve inkübasyon sürelerinin tamamlanmasından sonra her bir kuyucuğa 110 μ L (%10) MTT çözeltisi eklenmiş %5 CO₂ ortamında 37 °C’de 4 saat daha inkübe edilmiştir.
- Bu süreçte hücre içerisinde oluşan formazan kompleksini çözmek için 100 μ L SDS tuzu (10 mL 0,01 M HCl içerisinde 1 g SDS çözölmüş çözelti) kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyondan sonra 570 nm ve 630 nm’de spektrofotometre ile absorbans ölçömleri sonrasında % hücre canlılığı hesaplanmıştır.

Bileşiklerin hücre temelli antioksidan kapasitesi, bu işlemler sonrasında kontrol grubunun hücre canlılığı ile karşılaştırılarak değeriendirilmiştir.

2.2.2 Antikanser Etkinlik ve Apoptoz Değeriendirmesi

2.2.2.1 Sitotoksisite Testi (MTT)

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla kolorimetrik metodlardan biri olan MTT testi kullanılmıştır. MTT testi canlı hücrelerdeki mitokondriyal aktivitenin belirlenmesini ve kontrol grubu ile karşılaştırarak muamele edilen moleküllerin sitotoksik özelliklerinin belirlenmesini sağlar (Mosmann, 1983). Bu çalışmada, sağlıklı hücre hattı olarak SHSY-5Y (İnsan nöroblastoma hücre hattı, ATCC HTB-11), U87-MG (İnsan glioblastoma hücre hattı, ATCC HTB-14) ve CCD34-LU (sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı, ATCC N.CRL-1491) ile çalışılmıştır ve sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde kullanılmak üzere deney Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarı’nda yürütölmüştür.

Hücre hatları başlangıç hücre konsantrasyonları 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde 96 gözlü mikroyeytlere ekilmiştir. Hücreler, %10 FBS (Biological Industries, Cat: 04-121-1), %1 L-glutamin (Biological Industries, Cat: 41-218-100), %1 gentamisin (Biological Industries, Cat: 03-035-1C), %2 NaHCO₃ (%5,5) (Sigma, CAS Number 144-55-8), 1 mM HEPES (Biological Industries, Cat: 03-025-1B), 100 U/ml penisilin ve 100 μ g/mL streptomisin içeren DMEMF12 besiyeri ortamı (Biological Industries, Cat: 01- 170-1B) içinde 24 saat boyunca %5 CO₂ ile

%95 nemli atmosferde 37 °C’de inkübe edilmiştir. Besi ortamı içerisinde çoğalan hücreler, Inverted Araştırma Mikroskopunda incelendi ve sitotoksosite testi için istenilen hücre sayısına ulaşıp ulaşılmadığı belirlenmiştir. Logaritmik fazda aktif olarak çoğalan hücreler sitotoksosite testlerinde kullanılmıştır. 3 madde DMSO ile çözülerek 20 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Bu süreyi takiben hücreler, maddelerin farklı konsantrasyonlarıyla (1000, 100, 10 µg/ml) eklenerek 48 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Doxorobicin (20,2,0.2 µg/ml) konsantrasyonlarında eklenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 20 µl MTT (2.5 mg/ml) solüsyonu eklenmiştir ve 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sürecin sonunda gözlerdeki inkübasyon ortamları uzaklaştırılarak, mitokondriyal enzim aktivitesi (süksinat dehidrogenaz) sonucu oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözülmesi için 150 µl DMSO eklenmiştir. Çözünen ve homojen hale gelen krisyallerin optik yoğunlukları 570 nm dalga boyunda (referans filtresi 630 nm) UV görülür spektrofotometre ile ölçüm alınmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda bileşiklere maruz bırakılmış hücrelerin 24. ve 48. saatteki morfolojik incelemeleri inverted mikroskop altında yapılarak fotoğraflanmıştır. Sitotoksosite, herhangi bir ajana maruz bırakılmamış kontrol $\pm$ SD’ye bağlı olarak yüzde artış şeklinde belirlenmiştir. Kontrol değeri % 0 sitotoksik olarak alınmıştır. Sitotoksosite verileri sigmoidal eğriye oturturuldu ve herhangi bir materyal uygulaması yapılmamış kontrol grubuna kıyasla % 50 inhibisyona neden olan konsantrasyon değeri olan IC50 değerinin hesaplanmasında 4 parametrelili lojistik model kullanılmıştır. IC50 değeri $\pm$ 95 güven aralığında belirlenmiştir. İstatistiksel analiz GraphPad Prism (San Diego, CA) ile yapılmıştır.

Formül:

% Canlılık =

$$\frac{(\text{molekül ile muamele edilen hücrelerin absorbanısı} - \text{kör değerinin absorbanısı})}{(\text{molekül ile muamele edilen hücrelerin absorbanısı} - \text{kör değerinin absorbanısı})} \times 100$$

IC₅₀ (inhibisyon konsantrasyonu %50) değerleri $\pm$ 95% güven aralığında, Graph Pad Prism 5 (San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.2.2 Apoptotik Etkinin Belirlenmesi (Flow Sitometri)

Sitotoksosite testi sonrasında sitotoksosite belirlenen konsantrasyonlarda hücre kültürlerinde apoptozis oranı Anneksin V-Pi boyama ile belirlenmiştir. Anneksin V boyama sonrasında apoptotik hücreler görünür hale gelmiş ve flow sitometri ile ölçülmüştür. Nekrotik hücrelerin belirlenmesi için ise propidyum iyodür (Pi) kullanılmıştır. Bu şekilde canlı hücreler, erken ve geç apoptotik hücreler ve nekrotik hücrelerin % oranları da belirlenmiştir (Morrone, 2007).

2.2.3 *Salmonella*/Mikrozom Mutasyon (Ames) Testi ile Genotoksik Potansiyelin Belirlenmesi

Ames testi (*Salmonella*/Mikrozom testi), kısa zamanlı testlerin en yaygın kullanılabildiği, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş olmasının yanı sıra bilinen mutajen ve kanserojenlerle denenerek geçerliliği kabul edilmiş olanıdır. Bu testte, test edilen kimyasal maddenin *Salmonella typhimurium* his⁻ (histidin okzotrofu) mutantlarını his⁺ (prototrof; yaban tipi) haline çevirme gücü ölçülmektedir (Maron and Ames, 1983; OECD Guideline 471). Bakteri (prokaryotik) ve eukaryotik genetik materyelin yapı ve regülasyonundaki farklılıklar ve eukaryotlara özgü belirli organel ve metabolik reaksiyonların kendisi mutajen olmayan maddeleri canlı organizmada mutajenlere çevirebilmesi nedeniyle Ames testinin örneğin memeli hücreleri ile gerçekleştirilen mutajenite analizlerine göre daha yüksek yanlış negatif oranları gösterdiği bilinmektedir. Ames testi bir maddenin mutajenitesinin göreceli olarak hızlı biçimde belirlenmesi için yararlı alternatif testlerdendir ve başka testler ile birlikte kullanıldığında yararlılığı artmaktadır.

Çalışmamızda *Salmonella typhimurium*' un TA98, TA102 okzotrof suşları kullanıldı. Bakteriler, petri kutusu başına 0,1 ml olacak şekilde, nutrient broth içinde yaklaşık 120 rpm sallamayla, 37 °C' de, 10-14 saat (1×10^9 bakteri/mL olacak şekilde) büyütülmüştür. Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadıkları kontrol edilmiştir (OECD Guideline 471). Farklı konsantrasyonlardaki bileşikler ve pozitif kontrol olarak kullanılan kimyasallar, S9 karışımı (mikrozomal enzimlerin metabolik aktivasyon) varlığında

ve yokluğunda bakteri içeren ortamlarda test edilmiş ve 37 °C' de inkübasyon sonrasında mutajenite revertant kolonilere göre hesaplanmıştır.

His D 3052: Histidinol dehidrojenaz enzimi His D+ geni tarafından kodlanmaktadır. Mutasyon tiplerinden biri olan (-I) çerçeve kayması hisD 3052 mutasyonu, GCGCGCGC- bölgesi içindedir ve bu bölgede nükleotid eksikliği his D- geni içinde 8 kere tekrarlanmaktadır. Bu sebeple suş his+ hale mutajenik/karsinojenik kimyasallarla dönüştürülmektedir ve bu hali daha çok çerçeve kayması tipi mutasyonlara neden olmaktadır.

Rfa: Bu tip mutasyon sayesinde, hücre yüzeyinin dışını kaplayan lipopolisakkarit tabakasının zayıflatarak benzopiren gibi normal boyuttaki hücrelere giremeyecek kadar büyük moleküller testte kullanılan bakterilere girebilmektedir.

+R: pKM101, Hücrelerde fazlaca bulunan ve direnç geni olan Ampisilini taşıyan plazmittir. Plazmidin hücrede var olması, normal şartlar altında hücrelerde bulunan ve aynı zamanda hata frekansının fazla olduğu -error-proneI DNA onarım yolağının aktive olmasını sağlayarak spontan gerçekleşen mutasyon sayısının artışına neden olmaktadır.

Δ: Delesyon, —Excision repairI görevi olan Uvr B geni bir enzimi kodlanmaktadır. Dolayısıyla bu enzimin yokluğu mutant suşu değişik mutajenlere karşı daha duyarlı yapmaktadır.

Metabolik Aktivasyonu Sağlayan S9 Karışımının Hazırlanması:

Bakterilerde, memelilerde bulunan detoksifikasyon ya da biyoaktivasyon enzim sistemi bulunmaz. Bunun sistemin yapay biçimde oluşturulması adına, sıçanların kimyasal kullanılarak uyarılmış karaciğer dokularından S9 fraksiyonu homojenize edilir. Hücrede gerçekleştirilen homojenizasyon sırasında ER membranı, -mikrozomI adlı küreciklere dönüşür. Mikrozomlar biyotransformasyonda rol alan enzimlerin önemli kısmını içeren yapılardır. Promutajen / prekanserojen gibi maddelerin tespiti için, farede metabolik aktivasyon sisteminin arttırılması gerekir. 12 haftalık olan farelerin metabolik

aktivasyon artışı Araclor 1254 (CAS 48586) Sigma Aldrich (Germany) ile sağlanmıştır. Ölüme gönderilmeden önceki geçen 5 günde 80 mg/kg olacak şekilde, mısır yağı içerisinde 200 mg/mL konsantrasyon ayarlanarak Araclor, fareye oral yoldan verilmiştir.

a) **Fareden karaciğerin çıkartılması:** Servikal dislokasyonla öldürülen fareler, steril makas ve bistüri kullanılmasıyla karaciğer aseptik olarak çıkarılmıştır.

b) **Karaciğer S9 karışımının hazırlanması:** Farelerden çıkartılan karaciğer tartılmıştır. 0,15 M KCl solüsyonuna, 0-4 °C'de, 1 g karaciğer / 1 mL KCl olacak şekilde konulmuştur. Birkaç sefer soğuk KCl ile yıkanarak 3 mL 0,15M KCl / 1 g karaciğer oranı sabit kalacak şekilde KCl eklenmiştir. Karaciğer dokuparçaları steril makaslarla parçalanarak homojenize işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta oluşturulan homojenat 10 dk 8700 rpm'de santrifüjlenmiştir. S9'u barındıran supernatant kısmı ayrılarak -20 °C'de bir sonraki işlemler için saklanmıştır. Bu işlemlerin tümü 0-4 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

c) **S9 karışımı:** S9 fraksiyonu içinde var olan mikrozomal enzimlerin metabolik olarak aktif olup reaksiyonlarını yürütebilmeleri için ihtiyaç duydukları kofaktörler S9 karışımına eklenmelidir. Bu yüzden deney aşamalarına geçmeden S9 karışımı taze olarak hazırlanmıştır.

Tuz Çözeltisi (1,65 M KCl + 0,4 M MgCl₂)

Kullanımı: S9 karışımı

KCl 61,5 g

MgCl₂.6 H₂O 40,7 g

Distile su 500 mL

121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

0,2 M Sodyum fosfat tamponu, pH 7,4

Kullanımı: S9 karışımı

0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (13,8 g/500 mL) 60 mL

0,2 M Na_2HPO_4 (14,2 g/500 mL) 440 mL

121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

0,1 M NADP Çözeltisi

Kullanımı: S9 karışımı

NADP (FW 765,4) 19,15 mg

Steril distile su 25 mL

0,22 µm delik çaplı filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

1 M Glukoz 6 fosfat

Kullanımı: S9 karışımı

Glukoz-6-fosfat 2,82 g

Steril distile su 10 mL

0,22 µm delik çaplı filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

S9 karışımı

Kullanımı: mutasyon deneyi

S9: 2 mL

MgCl₂ – KCl tuzları 1 mL

1 M Glukoz-6-fosfat 0,25 mL

0,1 M NADP 2 mL

0,2 M fosfat tamponu, pH 7,4 25 mL

Steril distile su 19,75 mL

2.2.4 Anti-Anjiyogenik Etkinin Belirlenmesi

2.2.4.1. HUVEC Hücre Hattında Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi (MTT Yöntemi)

Sitotoksikite testi HUVEC hücreleri ile gerçekleştirilmiştir.

- Kültür ortamı olarak DMEM F12 %10 Fetal Bovine Serum kullanılmıştır.
- 96 kuyucuklu mikropalakalar üzerine 1×10^5 hücre/mL konsantrasyonda ekilmiştir.
- Hücreler üzerine 4 farklı konsantrasyonda (100,75,50,25 ug/ml) 24, 48 ve 72 saat süresince uygulanmıştır.
- Materyallerin (37°C'de %5,0 CO₂ ve %95 nemli ortamda) sitotoksik etkisi MTT testi ile spektrofotometre de (570 nm) absorbansları okunarak değerlendirilmiştir.

2.2.4.2. *In vitro* Scratch Assay ile Hücre Migrasyonunun Değerlendirilmesi

In vitro scratch hücre migrasyonu değerlendirilmesi, Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC hücre hattı) üzerinde gerçekleştirilmiştir.

- Hücreler, %5 CO₂ atmosferi ve sabit nem altında 37 °C'de, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren bir DMEM ortamında 5x10⁵ hücre/mL çoğaltılmıştır.
- Yara alanı polipropilen pipet ucu ile HUVEC hücre tek tabakasında (5x10⁴ hücre/cm²) gerçekleştirilmiştir. Kontrol hücreleri de çizilmiş ve %1 FBS içeren ortamda tutulmuştur.
- Farklı konsantrasyonlarda madde uygulaması yapılmasının ardından 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- Boşluğun başlangıç genişliği ölçülecek ve yara iyileşme sonuçlarının yüzdesi, ImageJ yazılımı kullanılarak bileşiklere maruziyetinden sonra çizilen bölgeye hücre göçüne göre değerlendirilmiştir.
- Muamele edilmeyen hücreler, bir kontrol grubu (%100 canlı hücre) olarak tanımlanacak ve her deneme 2 kez tekrar edilmiştir.

2.2.4.3 TNF- α Seviyesinin Belirlenmesi

İnsan göbek damarı endotel hücrelerinde (HUVEC) TNF- α kaynaklı oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoza sebep olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada oksidatif stresi belirlemek adına RayBio® TNF-alpha ELISA Kit kullanılmıştır.

TNF-alfa ELISA kiti serum, plazma ve hücre kültürü süpernatantlarında TNF-alfa'nın kantitatif ölçümü için bir *in vitro* enzim bağlantılı immünosorbent testidir. HUVEC hücre hattında üç maddenin etkinliği incelenmiştir.

2.2.4.4. HET-CAM Assay ile anti-anjiyogenik etki belirlenmesi

HET-CAM metodu, bir ajanın potansiyel anti-anjiyogenik etkisinin belirlenmesinde kullanılan ve sonuçların hızlı olarak elde edilmesi bakımından sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Bu çalışmada triterpen saponin bileşiklerinin anti-anjiyogenik aktivitesini değerlendirmek için, koryoallantoik membran (CAM) deneyi yapılmış ve bu amaçla döllenmiş Ross 308 yumurtaları, İzmir Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir (Ulus et al., 2018).

Dölenen yumurtalar 0.gün yatay pozisyonda 37,5°C' de ve %70 nemde inkübasyona bırakılmıştır. 6.gün, yumurtanın bir tarafında 2 cm²'lik bir pencere kesilerek koryoallantoik membran analiz edilecek ve normal gelişen embriyolar teste dahil edilirken, kusurlu/ölü embriyolar test dışı tutulmuştur.

CAM alanları numaralandırılmış ve yumurtalar aşağıda belirtilen gruplara her grupta 6 yumurta bulunacak şekilde ayrılmıştır.

Grup 1: Negatif kontrol grubu

Grup 2: Pozitif kontrol grubu (Süramin kullanılmıştır)

Grup 3. Bileşiklerin denendiği gruplar

Bileşikler 6 günlük embriyoların CAM'ına uygulanmıştır. Yumurtalar 24 saat daha inkübe edildikten sonra anti-anjiyogenik aktiviteleri değerlendirilmiştir.

Anjiyogenez skorlaması ve bileşiklerin CAM üzerindeki anti-anjiyogenik etkileri Altun et al. (2013) tarafından kullanılan skorlama sistemine göre, stereomikroskop altında gözlemlenerek değerlendirilmiştir (Şekil 2.1).

Skor	Etki	İzlenim/Açıklama
< 0,5	Yok	Embriyo gelişiminde fark gözlenmemektedir. Etraftaki kapillere kıyasla değişiklik görülmemiştir. Hemoraj, vasküler lizis veya koagülasyon gözlenmemiştir.
0,5 - 1	Düşük	Kapillersiz alanda yoğunluk az veya belirli bir alanda azalma şeklindedir. Etkilenen kısımlar madde uygulanan alanın 2 katını geçmeyecek şekildedir.
> 1	Yüksek	Kapillersiz alanlar belirlenebilmektedir. Embriyo oluşumu normal şekilde gözlenmemektedir.

Şekil 2.1: HET-CAM değerlendirilmesinde kullanılan skor değerleri

Ortalama puanı hesaplama denklemi; Ortalama puan = (yumurta sayısı [puan 2] $\times$ 2 + yumurta sayısı [puan 1] $\times$ 1 / (toplam yumurta sayısı [puan 0, 1, 2]) şeklinde olacaktır.

Bu sisteme göre <0,5 puan anti-anjiyogenik etki olmadığını, 0,5-1 düşük anti-anjiyogenik etkiyi ve >1 güçlü bir anti-anjiyogenik etkiyi göstermektedir.

3. BULGULAR

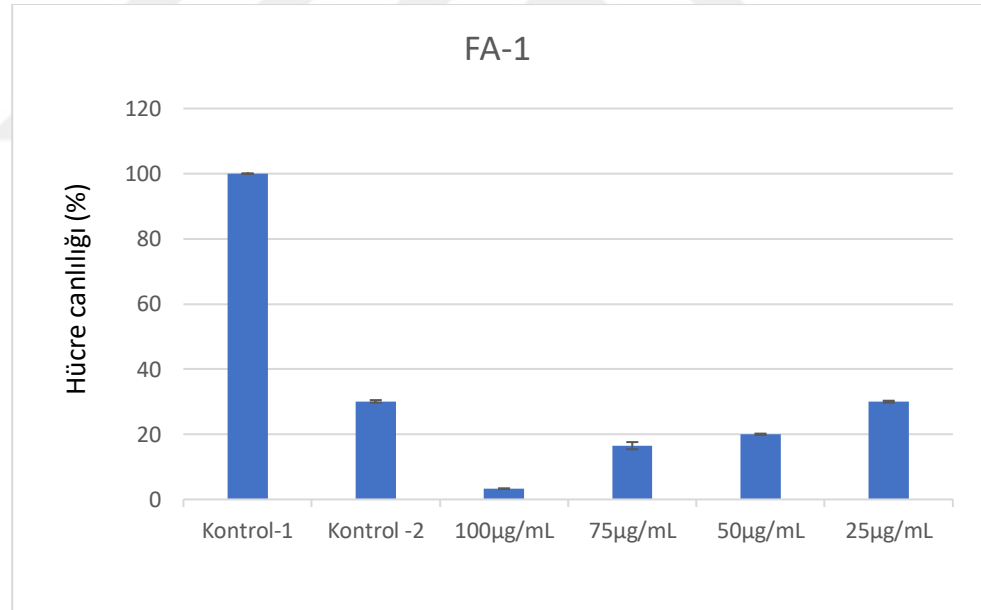
3.1. *In vitro* Hücre Temelli Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Kontrol hücreler (hücre canlılığı %100) ve 1 mM H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile hasara uğratılmış hücreler (hücre canlılığı %30.1) ile karşılaştırıldığında;

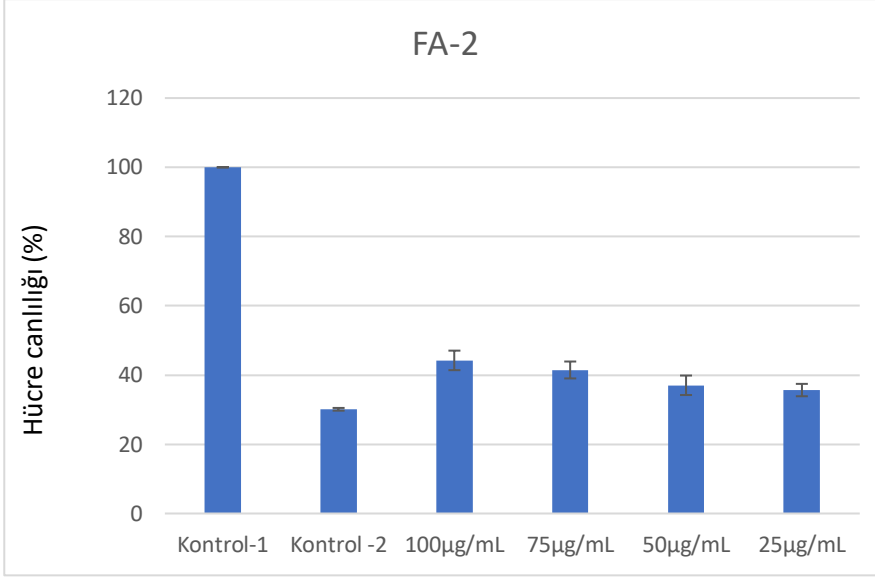
FA1'in uygulanan konsantrasyonlarında H₂O₂ hasarına karşı koruyucu etki göstermediği belirlenmiştir (Şekil 3.1).

FA2'nin tüm konsantrasyonlarda H₂O₂ hasarına karşı koruyucu antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.2).

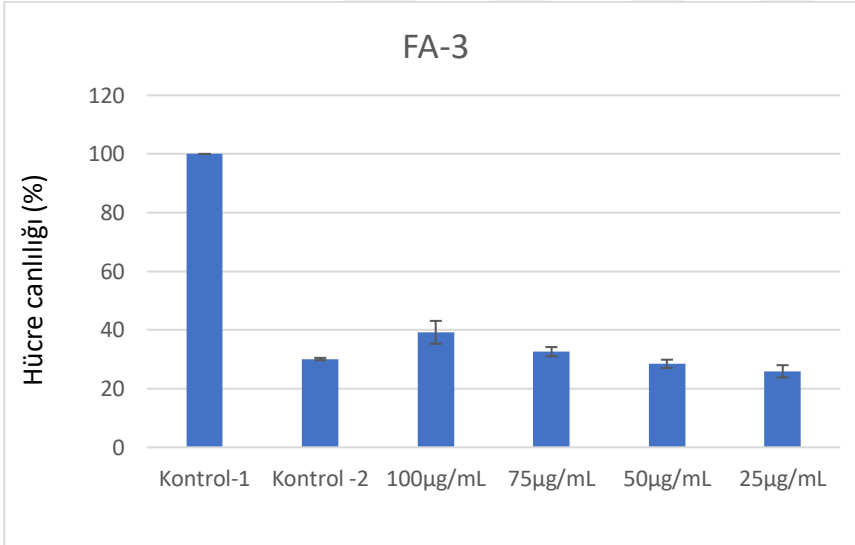
FA3'ün ise 75 ve 100 µg/mL'de H₂O₂ hasarına karşı koruyucu antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.1: FA1'in uygulanan konsantrasyonlarında H₂O₂ hasarına karşı hücre canlılığı grafiği. Kontrol 1:Test materyali ve H₂O₂ içermeyen ortam kullanılan kültür, Kontrol 2: Test materyali içermeyen, 1 mM H₂O₂ içeren ortam kullanılan kültür.



Şekil 3.2: FA2'nin uygulanan konsantrasyonlarında H₂O₂ hasarına karşı hücre canlılığı grafiği. Kontrol 1:Test materyali ve H₂O₂ içermeyen ortam kullanılan kültür, Kontrol 2: Test materyali içermeyen, 1 mM H₂O₂ içeren ortam kullanılan kültür.



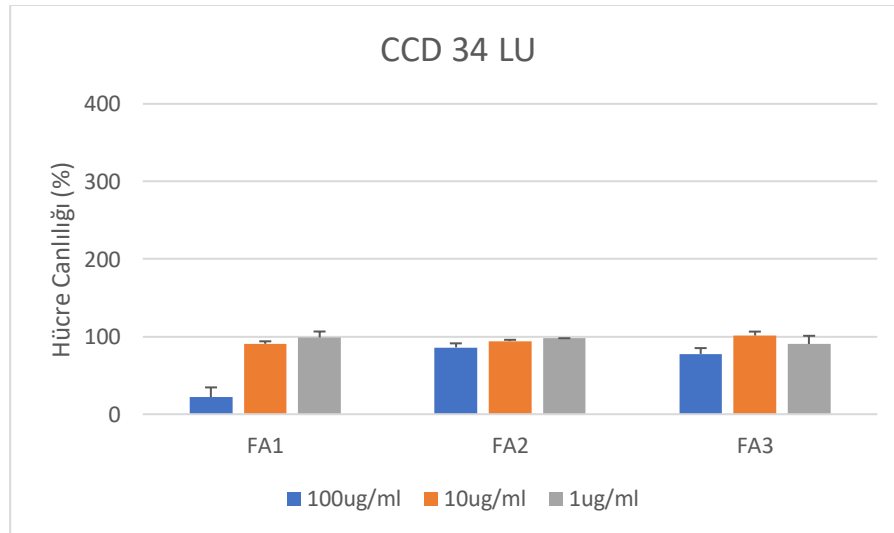
Şekil 3.3: FA3'ün uygulanan konsantrasyonlarında H₂O₂ hasarına karşı hücre canlılığı grafiği. Kontrol 1:Test materyali ve H₂O₂ içermeyen ortam kullanılan kültür, Kontrol 2: Test materyali içermeyen, 1 mM H₂O₂ içeren ortam kullanılan kültür.

3.2. Antikanser Etkinlik ve Apoptoz Değerlendirmesi

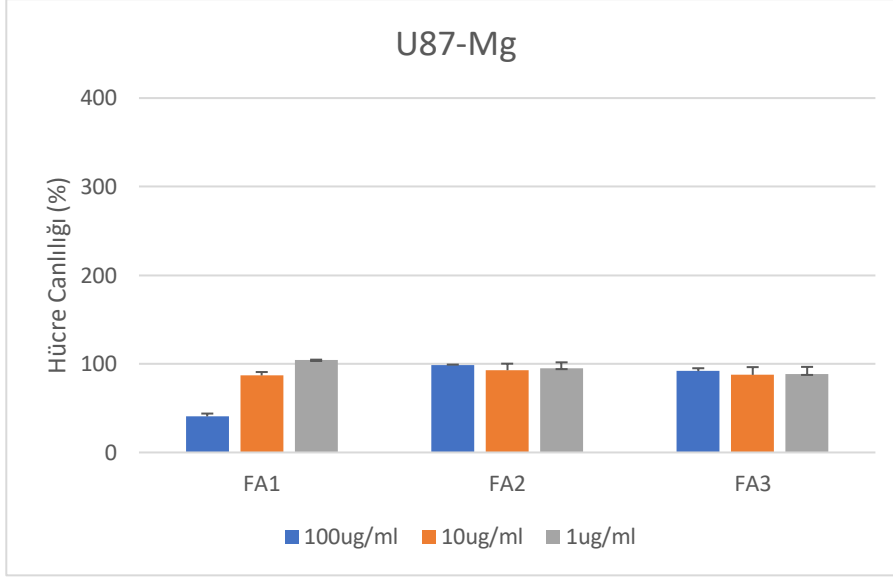
3.2.1. Sitotoksikite Testi (MTT) Sonuçları

Sitotoksikite testinde yalnızca FA1’de sitotoksik etki gözlenmiştir. CCD34-LU (Şekil 3.4), U87-MG (Şekil 3.5) ve SHSY-5Y (Şekil 3.6) hücre hatları için canlılık değerleri hesaplanmıştır. CCD 34-LU, U87-MG VE SHSY-5Y hücre hatlarında FA1’ in IC50 değerleri sırasıyla 44.14, 69.24 ve 35,24 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

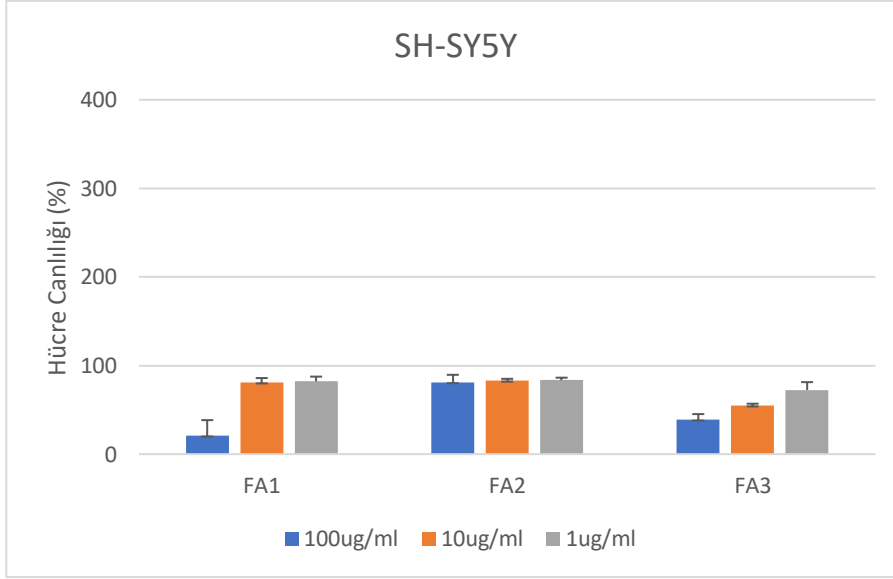
CCD 34-LU hücre hattında kontrol (DMSO) (3.7), DOXO (3.8), FA1 (3.9), FA2 (3.10), ve FA3 (3.11) madde uygulamaları sonunda 0. Saat; 24 saat; C: 24saat maddeden sonra; D: 48 saat maddeden sonra.şeklinde morfolojik incelemeleri yapılmıştır. U87-MG hücre hattında kontrol (DMSO) (3.12), DOXO (3.13), FA1 (3.2.14), FA2 (3.15), ve FA3 (3.16) madde uygulamaları sonunda 0. Saat; 24 saat; C: 24saat maddeden sonra; D: 48 saat maddeden sonra.şeklinde morfolojik incelemeleri yapılmıştır. SHSY-5Y hücre hattında hücre hattında kontrol (DMSO) (3.2.17), DOXO (3.2.18), FA1 (3.2.19), FA2 (3.2.20), ve FA3 (3.2.21) madde uygulamaları sonunda 0. Saat; 24 saat; C: 24saat maddeden sonra; D: 48 saat maddeden sonra.şeklinde morfolojik incelemeleri yapılmıştır.



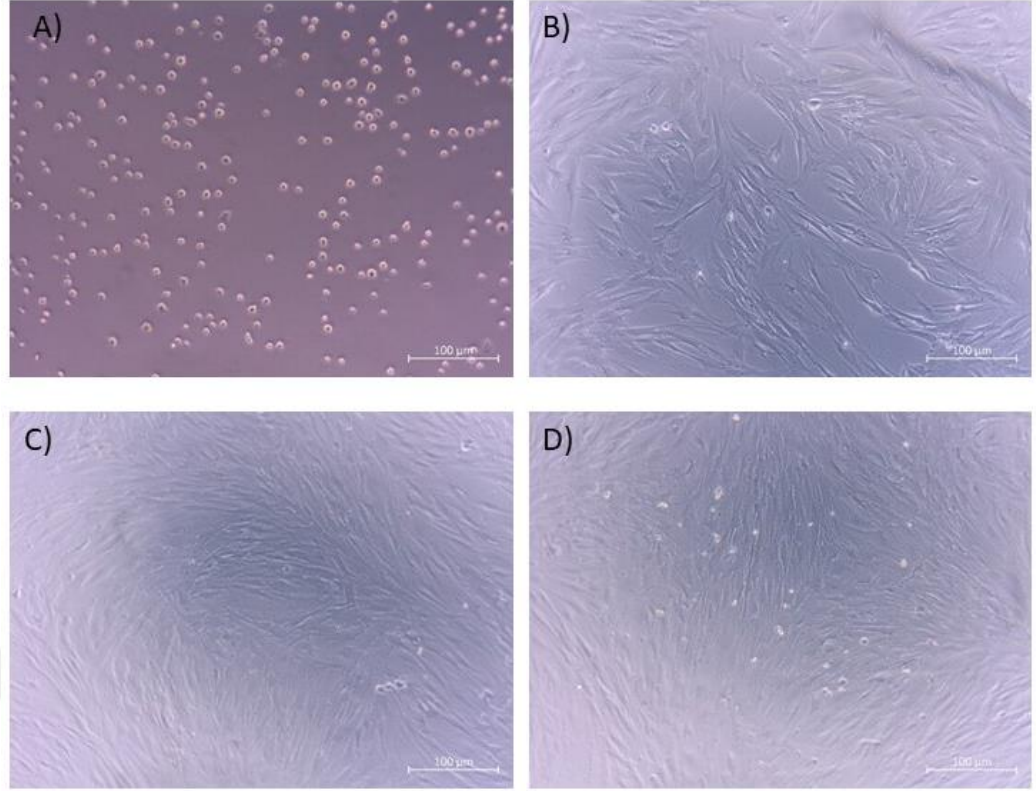
Şekil 3.4: Farklı konstrasyonlarda uygulanan 3 maddeye bağlı CCD 34 LU hücrelerinin canlılık değerleri.



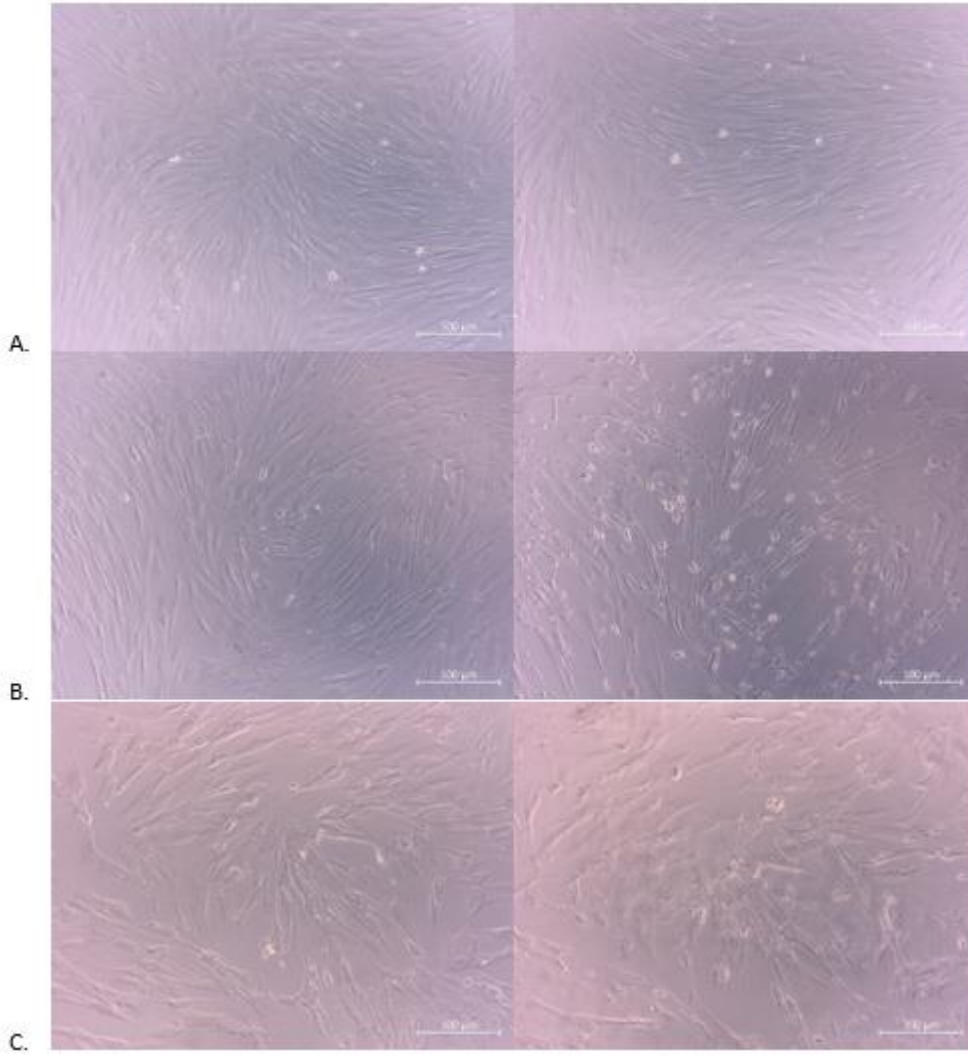
Şekil 3.5: Farklı konstrasyonlarda uygulanan 3 maddeye bağlı U87 Mg hücrelerinin canlılık değerleri.



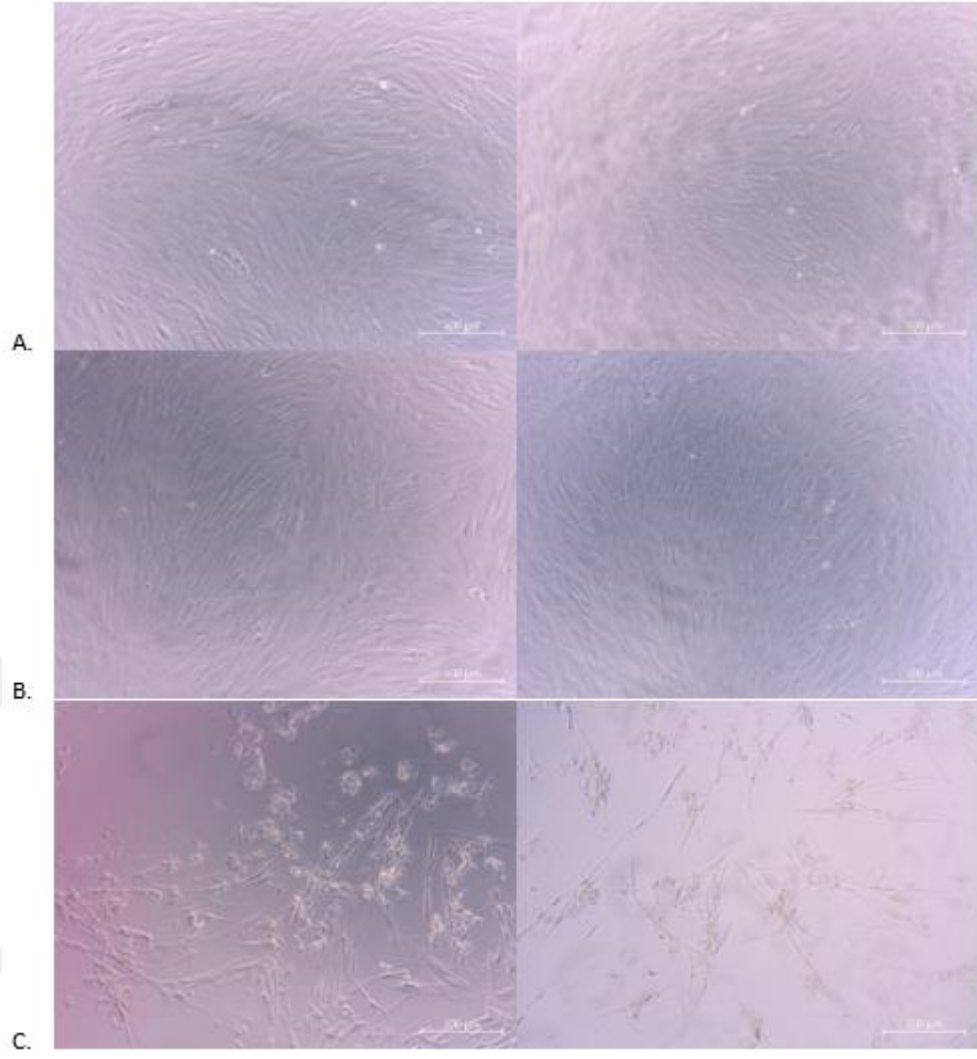
Şekil 3.6: Farklı konstrasyonlarda uygulanan 3 maddeye bağlı SH-SY5Y hücrelerinin canlılık değerleri.



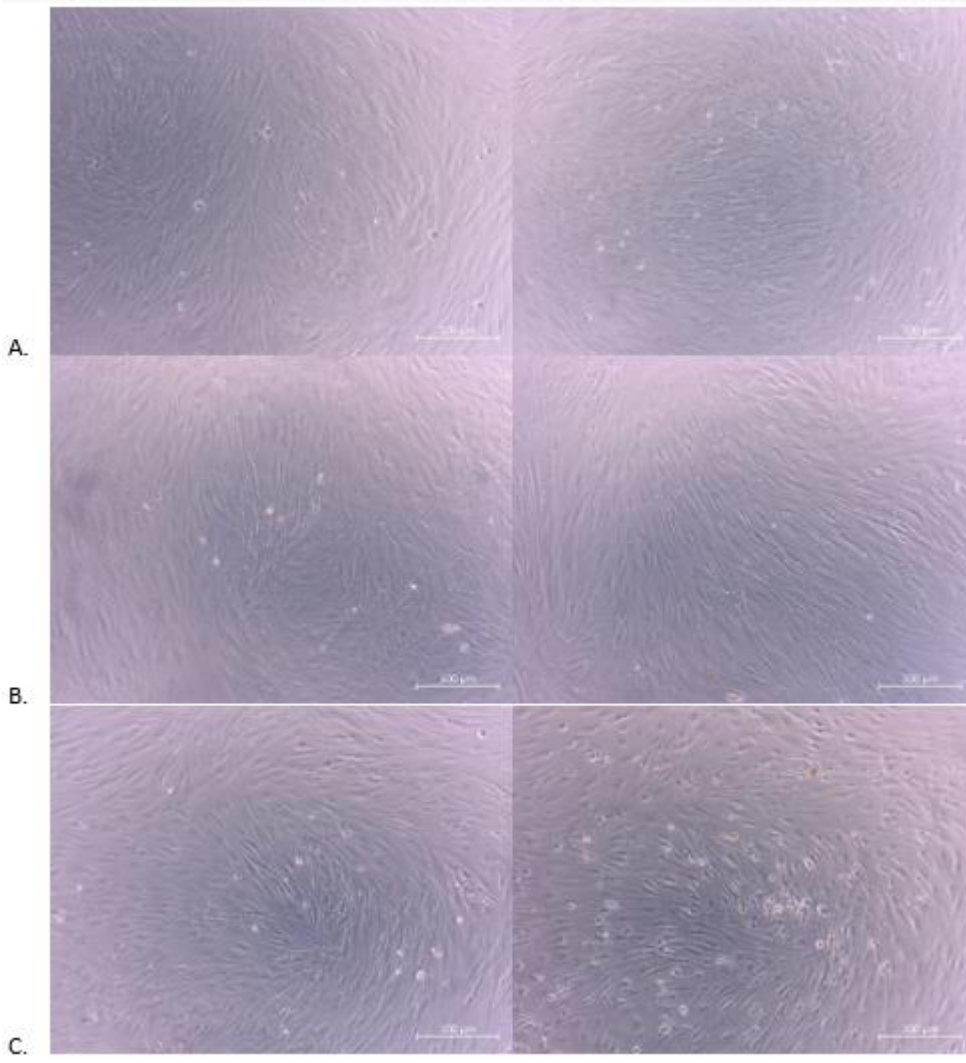
Şekil 3.7: CCD 34LU hücre hattında kontrol uygulamalarının morfolojik incelemesi. A: 0. Saat; B: 24 saat; C: 24saat maddeden sonra; D: 48 saat maddeden sonra.



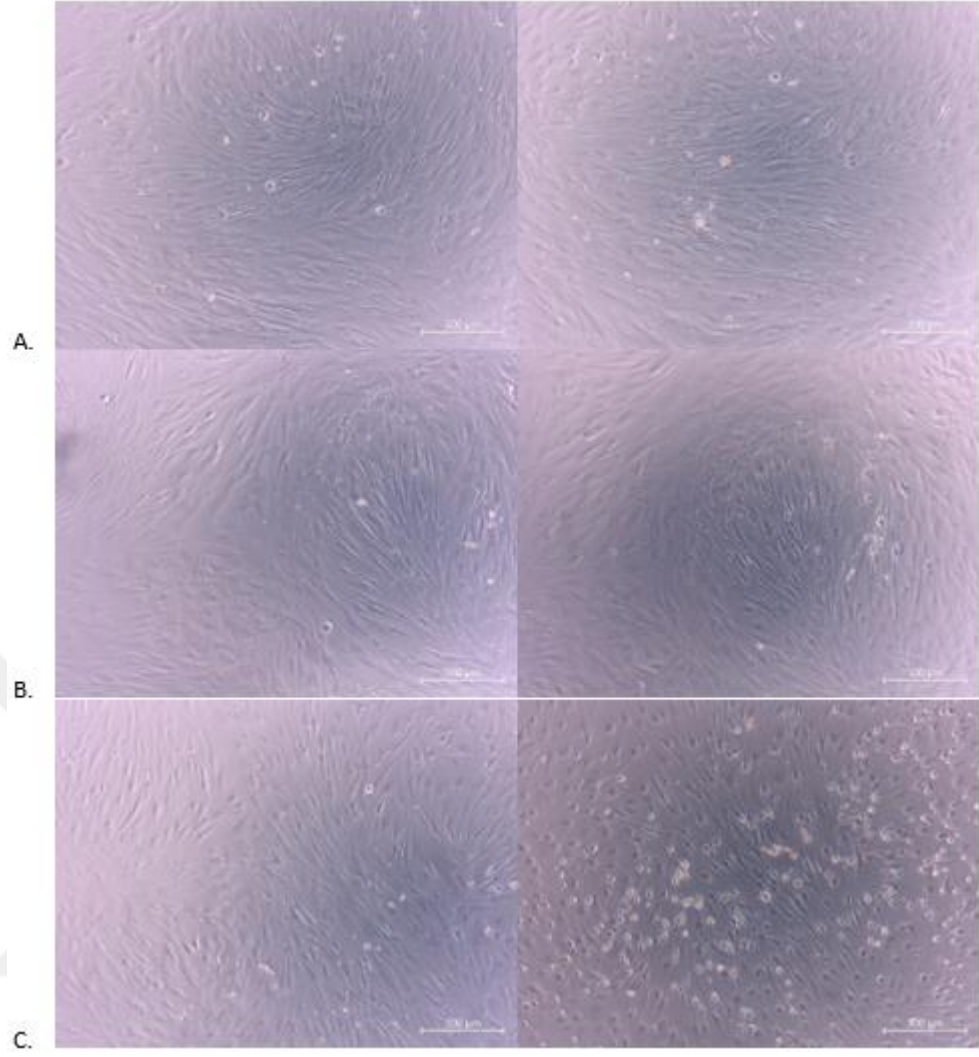
Şekil 3.8: CCD hücre hattında DOXO uygulaması A:DOXO 0.2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; B: DOXO 2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; C: DOXO 20ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat



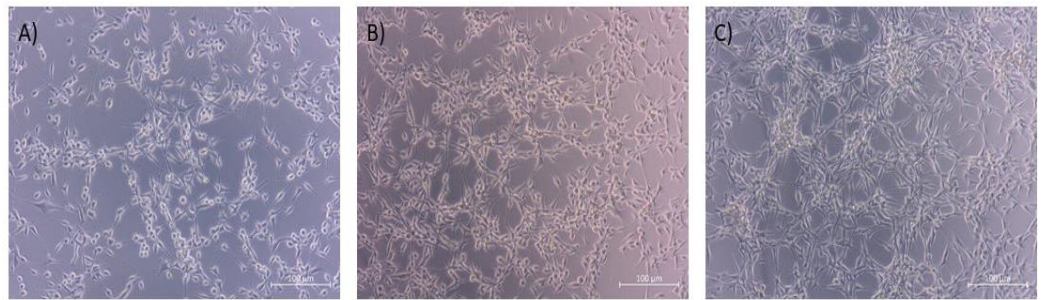
Şekil 3.9: FA1'in farklı dozlarının CCD 34LU hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması.



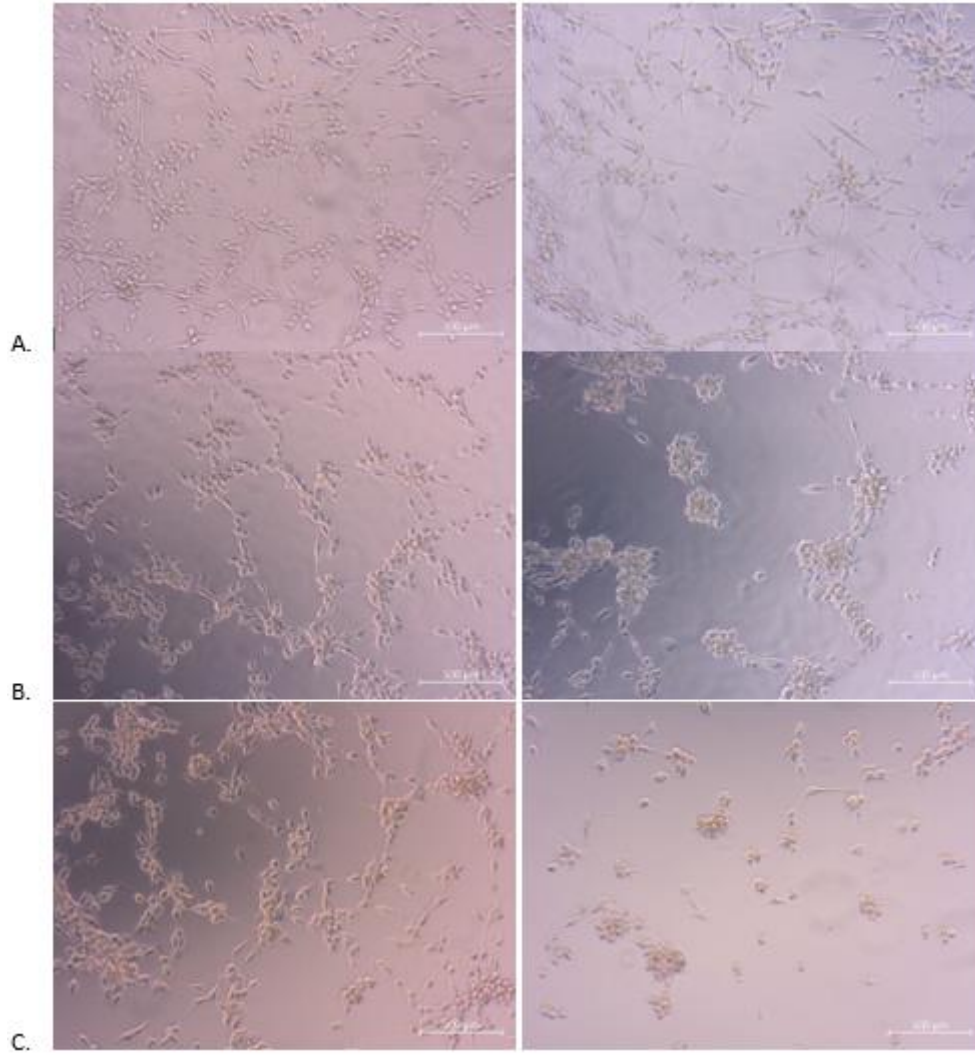
Şekil 3.10: FA2'nin farklı dozlarının CCD 34LU hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması.



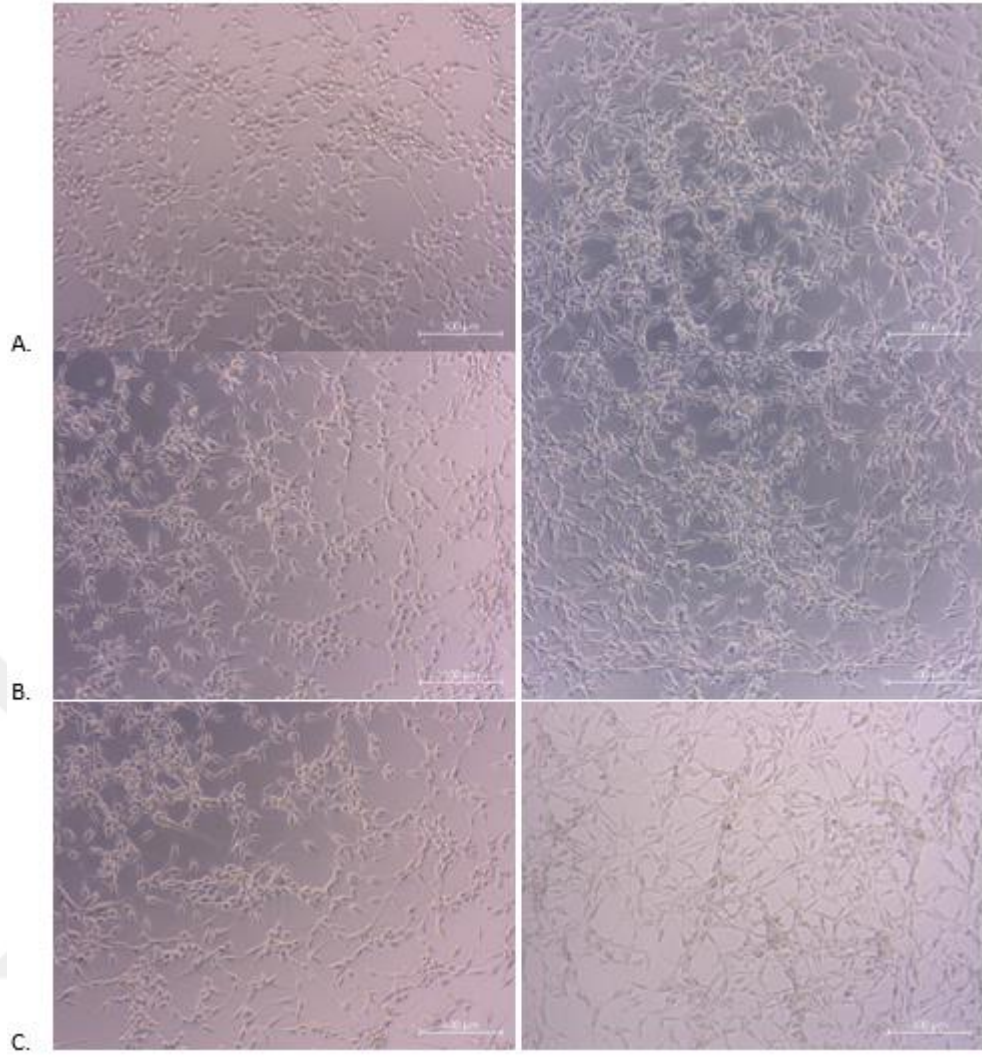
Şekil 3.11: FA3'ün farklı dozlarının CCD 34LU hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A: 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması.



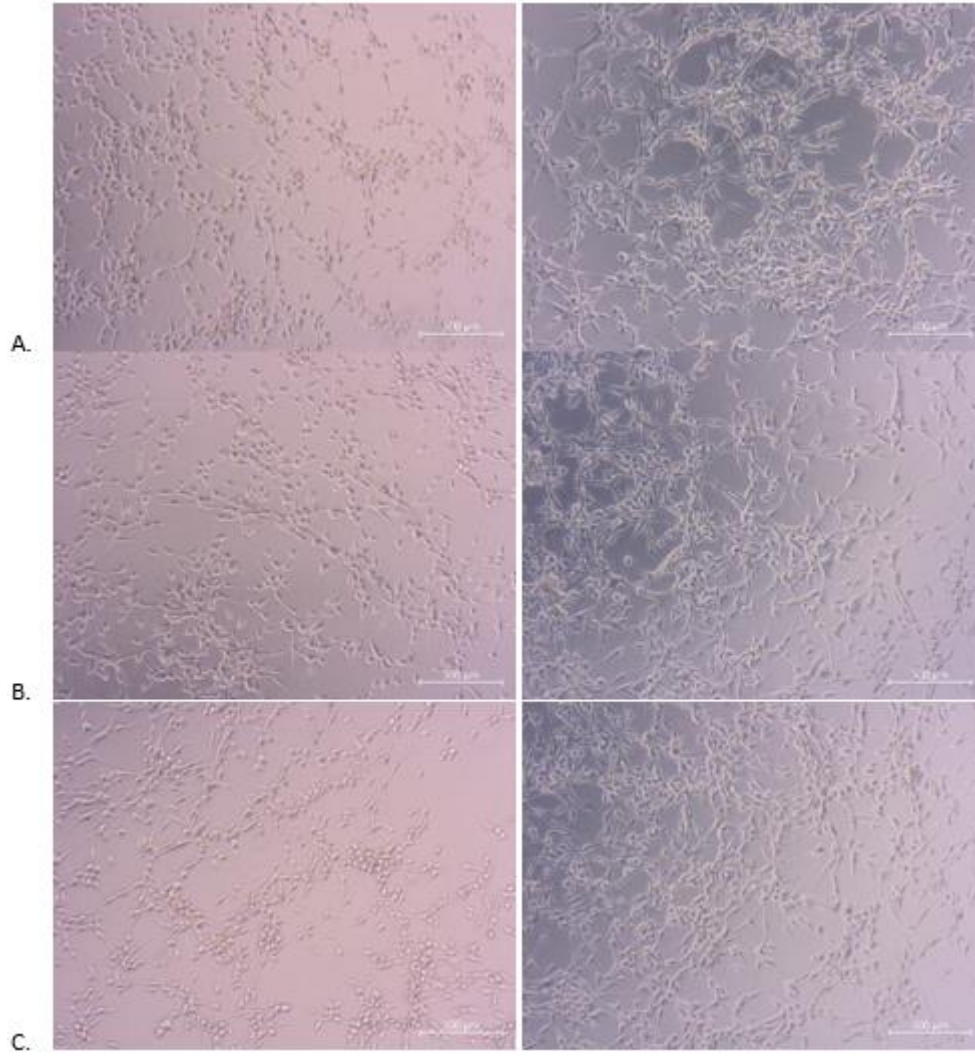
Şekil 3.12: U87 MG hücre hattında kontrol uygulamalarının morfolojik incelemesi. A: 24 saat; B: 24saat maddeden sonra; C: 48 saat maddeden sonra.



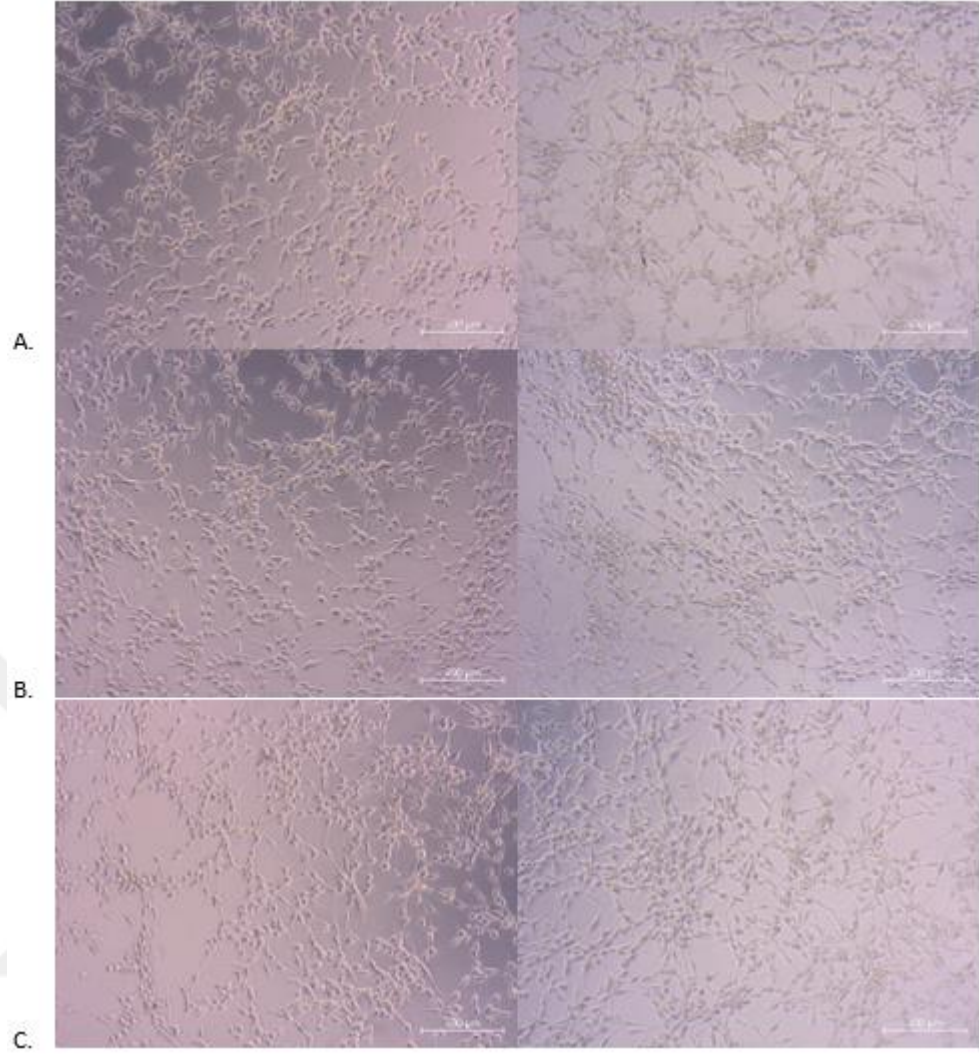
Şekil 3.13: U87 MG hücre hattında DOXO uygulaması A:DOXO 0.2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; B: DOXO 2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; C: DOXO 20ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat



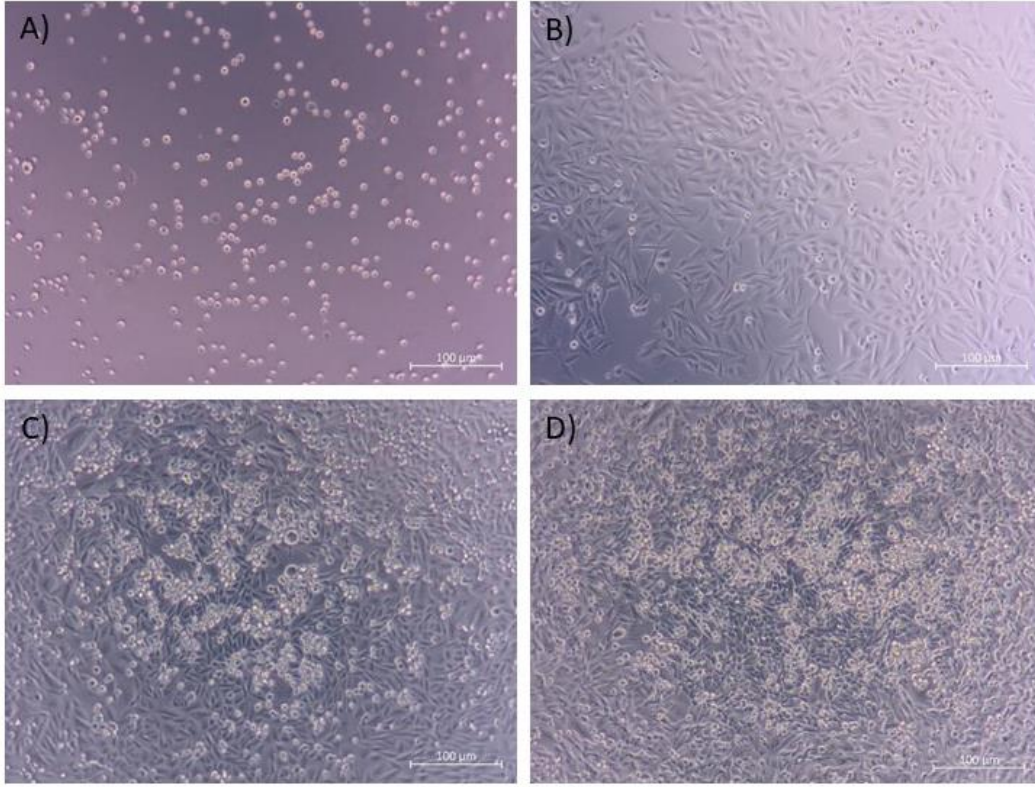
Şekil 3.14: FA1'in farklı dozlarının U87 MG hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması.



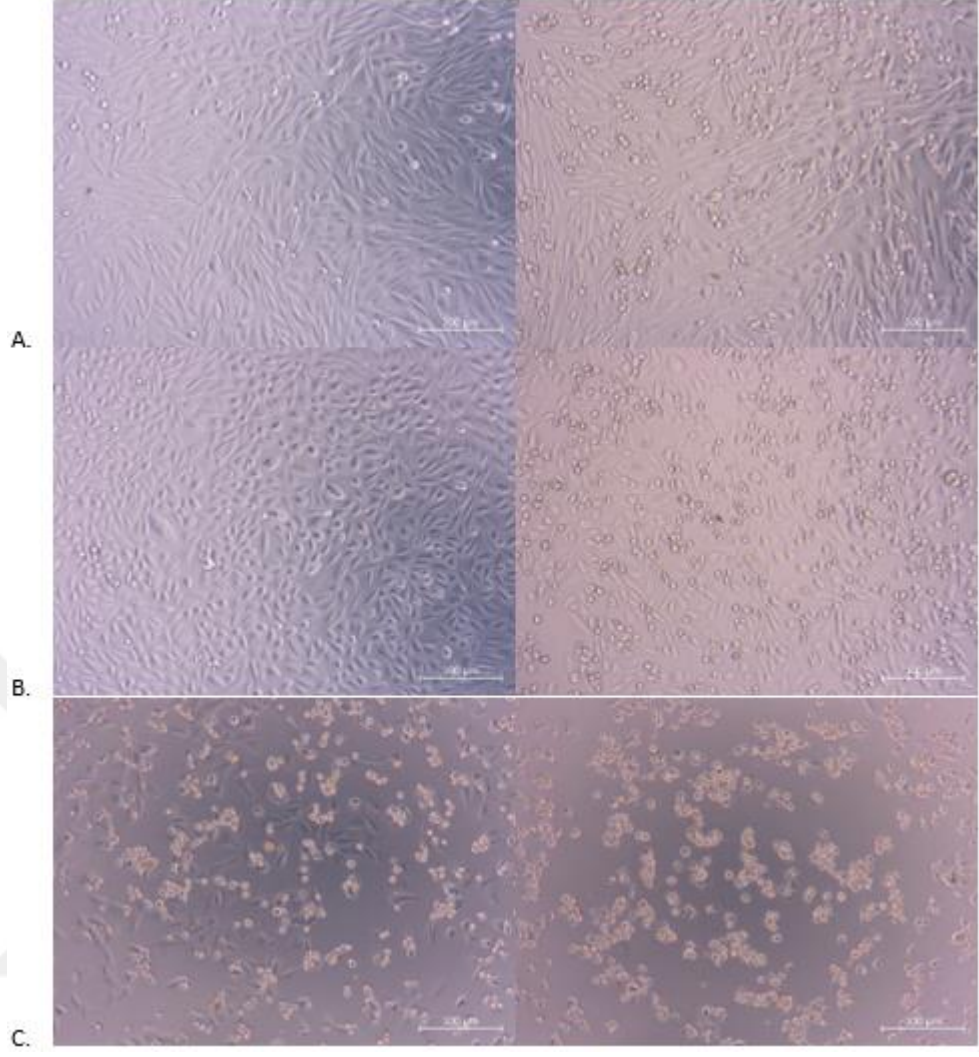
Şekil 3.15: FA2'nin farklı dozlarının U87 MG hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması.



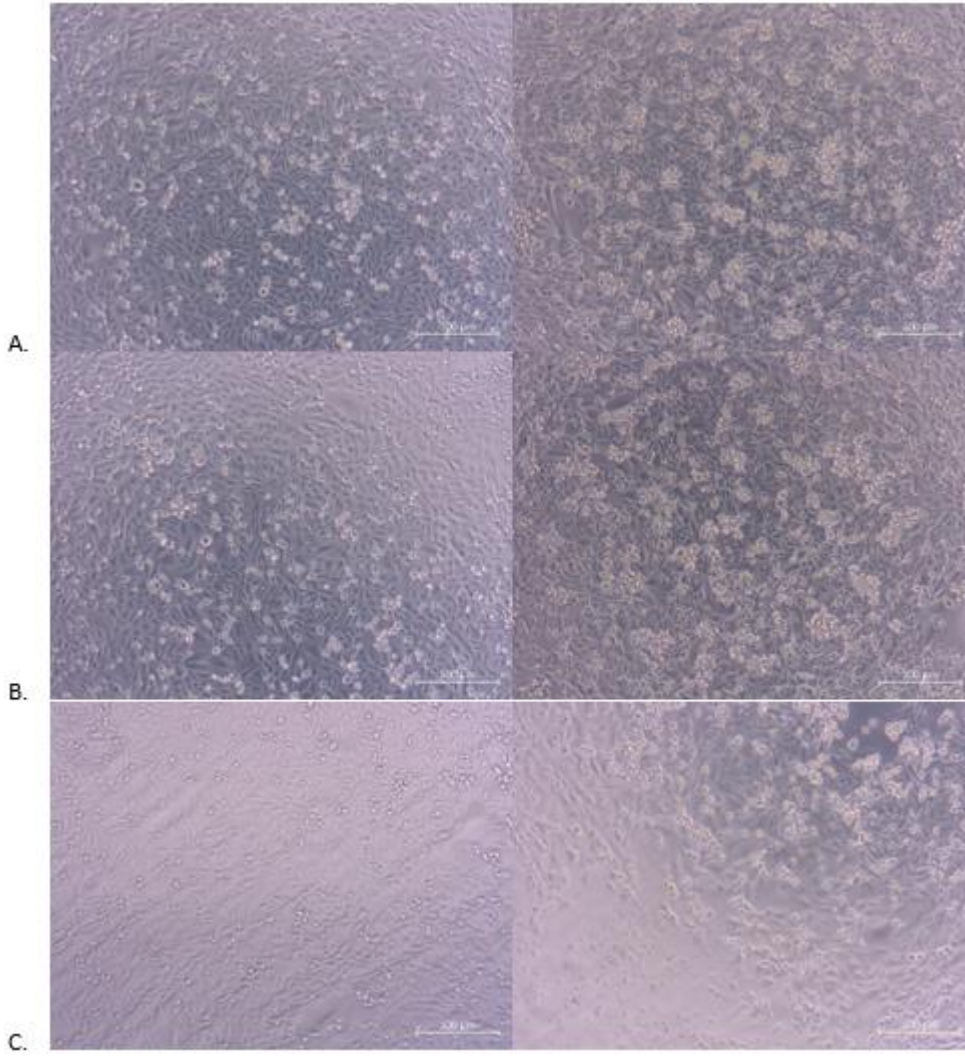
Şekil 3.16: FA3'ün farklı dozlarının U87 MG hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması.



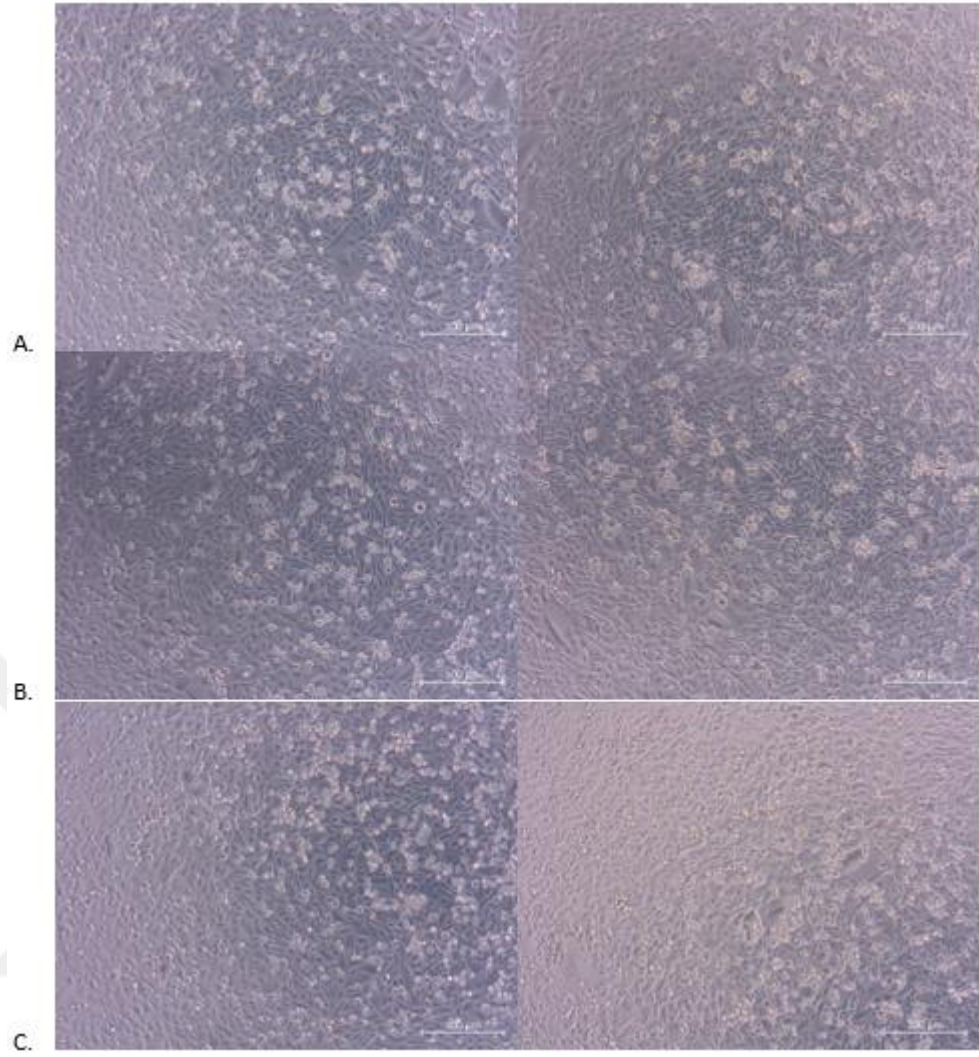
Şekil 3.17: SH-SY5Y hücre hattında kontrol uygulamalarının morfolojik incelemesi. A: 0. Saat; B: 24 saat; C: 24saat maddeden sonra; D: 48 saat maddeden sonra.



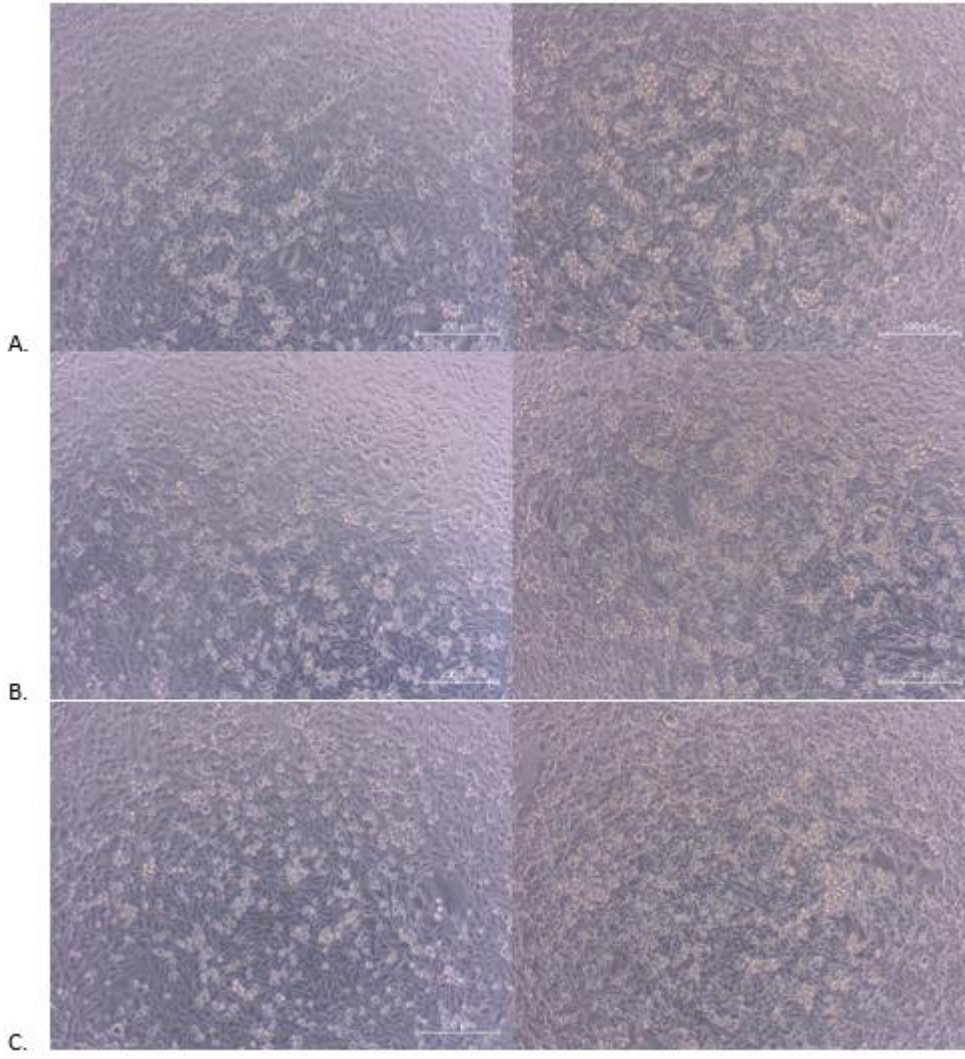
Şekil 3.18: SH-SY5Y hücre hattında DOXO uygulaması A:DOXO 0.2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; B: DOXO 2ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat; C: DOXO 20ug/ml uygulaması 24saat ve 48saat



Şekil 3.19: FA1'in farklı dozlarının SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması.



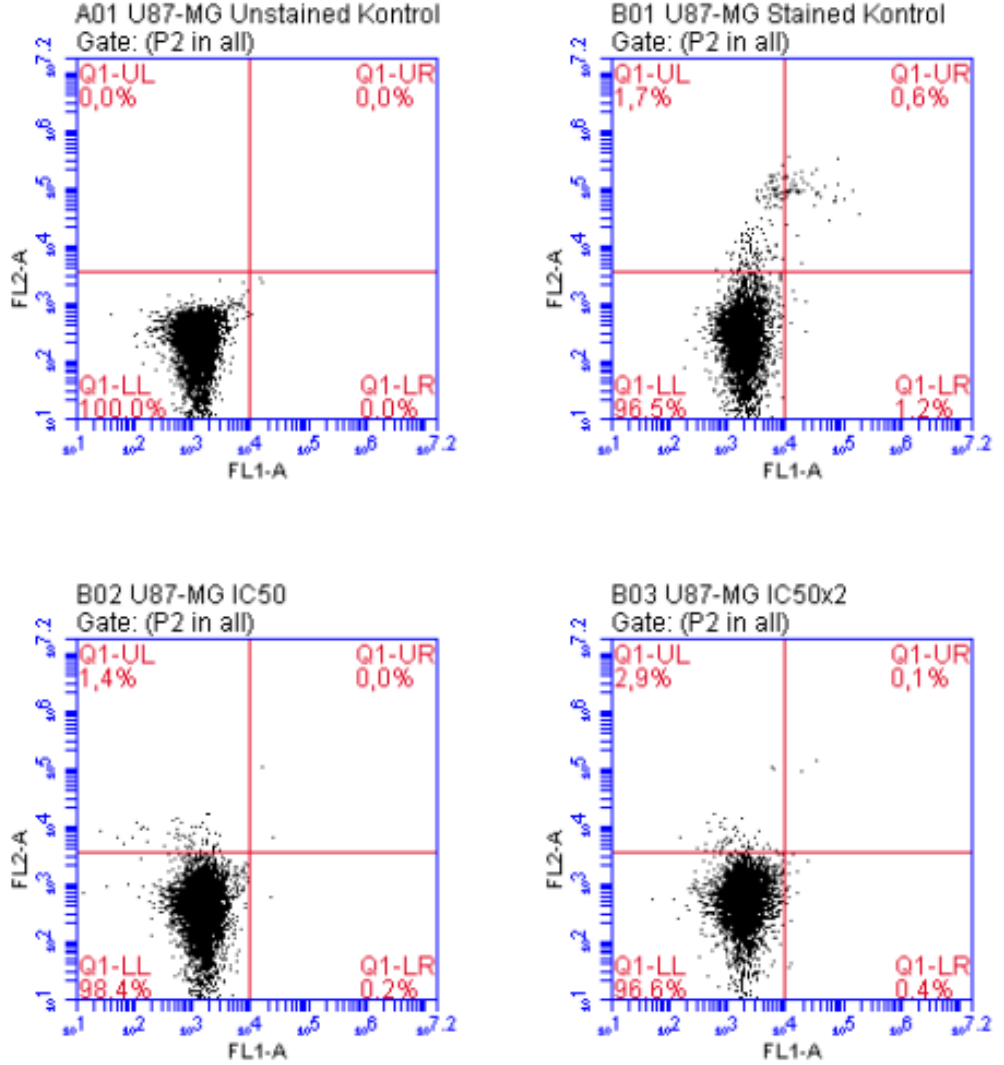
Şekil 3.20: FA2'nin farklı dozlarının SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması.



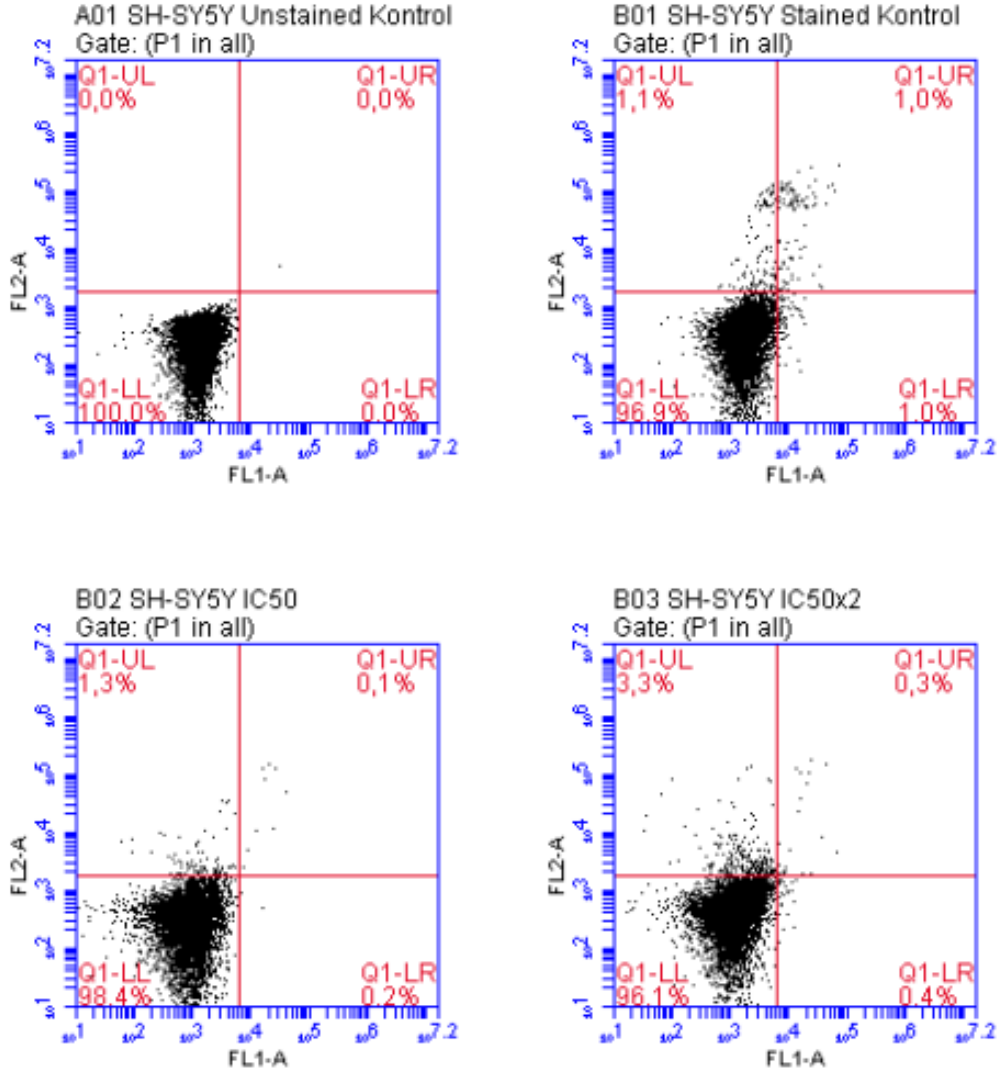
Şekil 3.21: FA3'ün farklı dozlarının SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik morfolojik incelemesi (10X). A. 1ug/ml; B: 10ug/ml; C:100ug/ml uygulaması.

3.2.2. Flow Sitometri Sonuçları

FA1'in IC50 değeri kullanılarak gerçekleştirilen flow sitometri analizinde apoptoz ve nekroz izlenmiştir. U87-MG (Şekil 3.22) ve SH-SY57 (Şekil 3.23) hücre hatlarında uygulama sonrası grafikler gösterilmiştir.



Şekil 3.22: (A) U87-MG hücre hattında DMSO uygulaması (kontrol), (B) U87-MG hücre hattında DMSO uygulaması (kontrol) (C) FA1 1x IC50 uygulaması, (D) FA1 2x IC50 uygulaması



Şekil 3.23: (A) SH-SY5Y hücre hattında DMSO uygulaması (kontrol), (B) U87-MG hücre hattında DMSO uygulaması (kontrol) (C) FA1 1x IC50 uygulaması, (D) FA1 2x IC50 uygulaması

3.3. *Salmonella*/Mikrozom Mutasyon (Ames) Testi ile Genotoksik Potansiyelin Belirlenmesi

Üç bileşiğin de +S9 ve -S9 ortamlarda *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA102 suşlarına karşı maksimum konsantrasyonda (5000 µg/mL) bile genotoksik etki göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Uygulama	Konsantrasyon	Ort. his + revertant / plak			
		TA 98		TA 102	
		+S9	-S9	+S9	-S9
FA1	5000 µg/mL	29	10	596	476
FA2	5000 µg/mL	22	16	516	556
FA3	5000 µg/mL	20	18	520	360
Pozitif Kontrol (Sodyum Azid)	10 µg	25,5	17,5	600	460
Negatif Kontrol (DMSO)	100 µL	27	4,5	488	768

Çizelge 3.1: FA1, FA2 VE FA3'ün *Salmonella typhimurium* suşlarında oluşturduğu revertant koloni sayıları

3.4. Anti-Anjiyogenik Etkinin Belirlenmesi

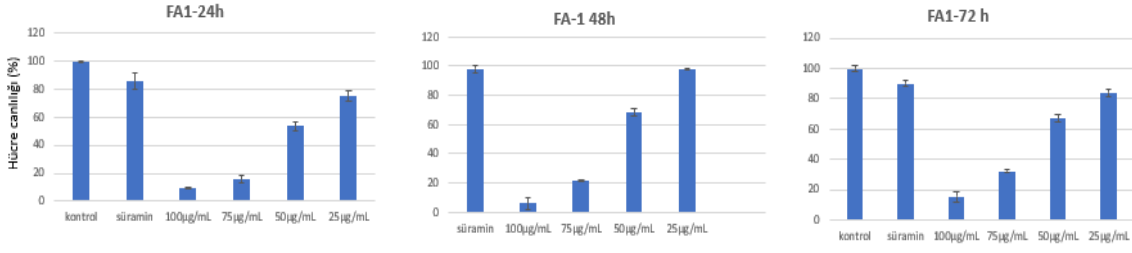
3.4.1 HUVEC Hücre Hattında Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi (MTT Yöntemi)

HUVEC hücre hattı üzerinde 24. 48 ve 72. saatlerde yapılan MTT sonucuna göre hücre canlılığı oranı %70'in üstünde olduğu için,

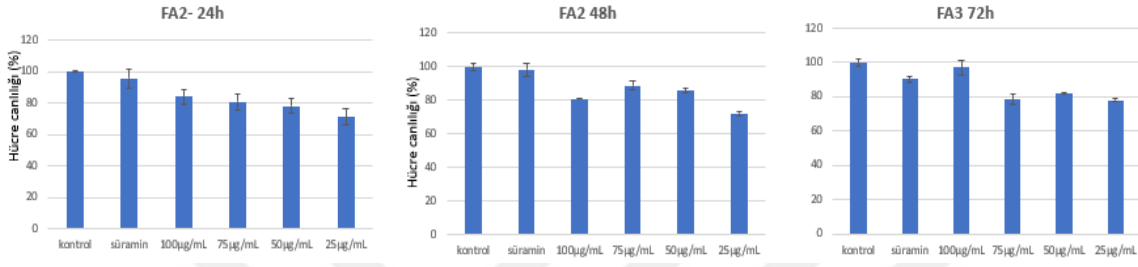
FA1'in 25 µg/mL konsantrasyonu (Şekil 3.24),

FA2 (25,50,75 ve 100 µg/mL) (Şekil 3.25),

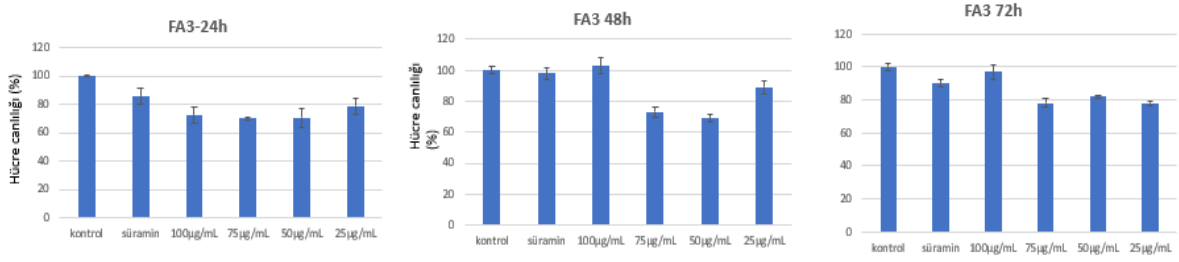
FA3 (25,50,75 ve 100 µg/mL) (Şekil 3.26), hücre ölümü bakımından sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Negatif Kontrol olarak %1 Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besi ortamı kullanılmıştır.



Şekil 3.24: FA1 maddesinin HUVEC hücre hattında hücre canlılığı oranları



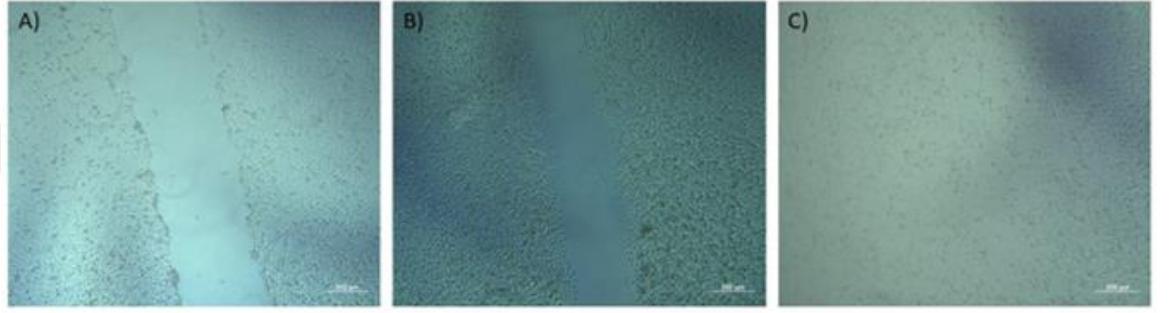
Şekil 3.25: FA2 maddesinin HUVEC hücre hattında hücre canlılığı oranları



Şekil 3.26: FA3 maddesinin HUVEC hücre hattında hücre canlılığı oranları

3.4.2. *In vitro* Scratch Assay ile Hücre Migrasyonunun Değerlendirilmesi

In vitro scratch hücre migrasyonu değerlendirilmesi, Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC hücre hattı) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Test maddesi içermeyen kontrol hücreler (Şekil 3.27), Pozitif kontrol Süramin (Şekil 3.28), FA1 0.05 mg/ml (Şekil 3.29), FA1 0.025 mg/ml (Şekil 3.30), FA2 0.05 mg/ml (Şekil 3.31), FA2 0.025 mg/ml Şekil (Şekil 3.32), FA3 0.05 mg/ml (Şekil 3.33), FA3 0.025 mg/ml Şekil (Şekil 3.34) 0-4-24. saatlerdeki mikroskop görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 3.27: HUVEC hücre hattında test maddesi içermeyen kontrol grubunun A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi



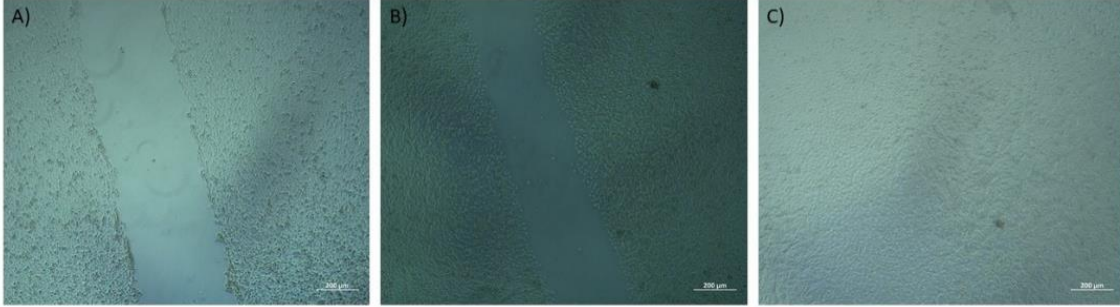
Şekil 3.28: HUVEC hücre hattında süramin uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi



Şekil 3.29: HUVEC hücre hattında FA1 0.05 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi



Şekil 3.30: HUVEC hücre hattında FA1 0.025 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi



Şekil 3.31: HUVEC hücre hattında FA2 0.05 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi



Şekil 3.32: HUVEC hücre hattında FA2 0.025 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi



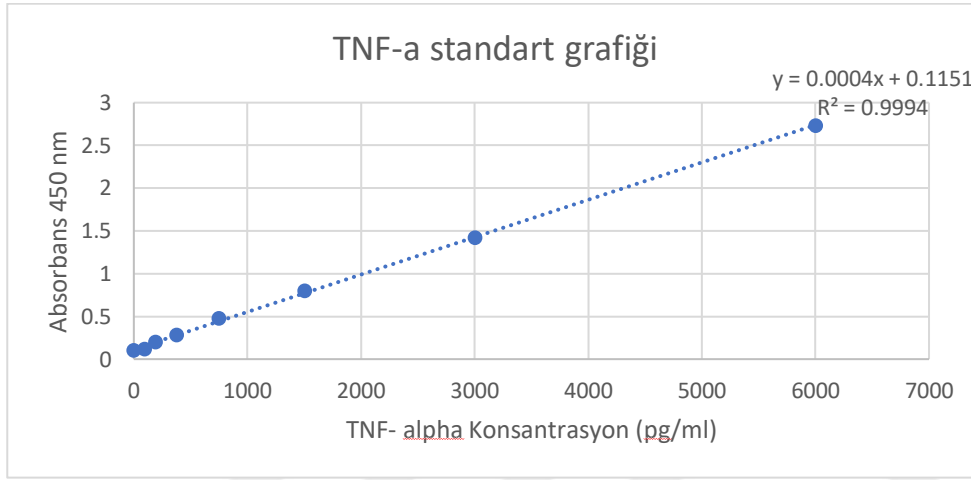
Şekil 3.33: HUVEC hücre hattında FA3 0.05 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi



Şekil 3.34: HUVEC hücre hattında FA3 0.025 mg/ml uygulanmasının A) 0. saat B) 4. Saat ve C) 24. Saat morfolojik görüntülemesi

3.4.3 TNF- α Seviyesinin Belirlenmesi

Deney sonunda TNF- α standart grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.35) FA1 uygulanan hücrelerdeki TNF- α seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.36). TNF- α kaynaklı oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoza sebep olabilmektedir. Yapılan FA1 uygulamasının TNF- α seviyesindeki artışla birlikte sitotoksosite ve apoptozu indüklediği gözlenmiş olup bu bulgular flow sitometre sonuçları ile de uyumluluk göstermektedir.



Şekil 3.35: TNF- α standart grafiği

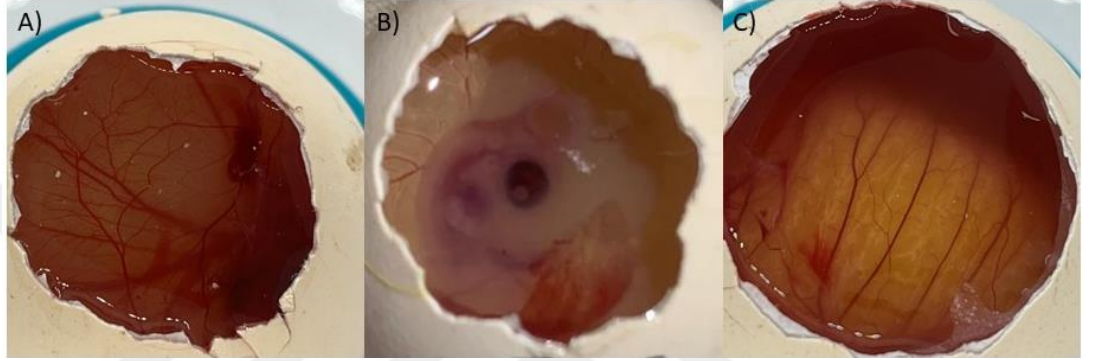
	TNF-alfa (pg/ml)
FA1 50 μ g/ml	0.182* $\pm$ 0.08
FA1 25 μ g/ml	0.112 $\pm$ 0.001
FA2 50 μ g/ml	0.137 $\pm$ 0.010
FA2 25 μ g/ml	0.168 $\pm$ 0.046
FA3 50 μ g/ml	0.145 $\pm$ 0.110
FA3 25 μ g/ml	0.132 $\pm$ 0.020
Kontrol	0.139 $\pm$ 0.040
Süramin	0.120 $\pm$ 0.023

Şekil 3.36: TNF- α konsantrasyonu (pg/ml)

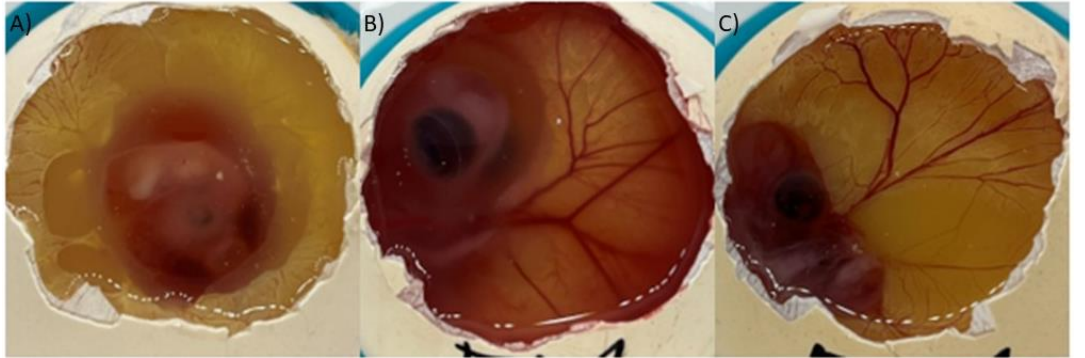
3.4.4. HET-CAM Testi Sonuçları

FA1'in 400 $\mu\text{g/mL}$, FA2 ve FA3'ün 200 $\mu\text{g/mL}$ ve üzeri uygulamalarında HET-CAM testi ile anti-anjiyogenik etki gösterdiği izlenmiştir.

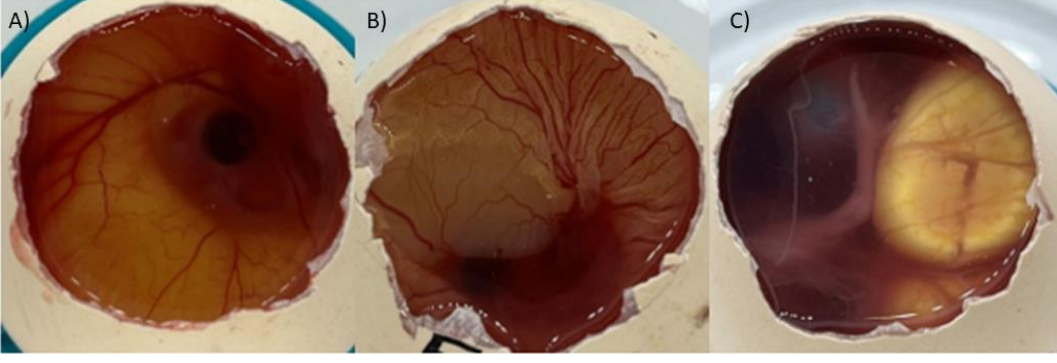
Test maddeleri farklı dozda (100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$) ve kontrol gruplarının yumurtalara uygulanmış ve 24. saatteki değişimleri Şekil 3.37, 3.38, 3.39 ve 3.40'de gösterilmiştir.



Şekil 3.37: Çözgen kontrol (DMSO), B: Pozitif Kontrol (Süramin), C: Negatif Kontrol (NaCl)

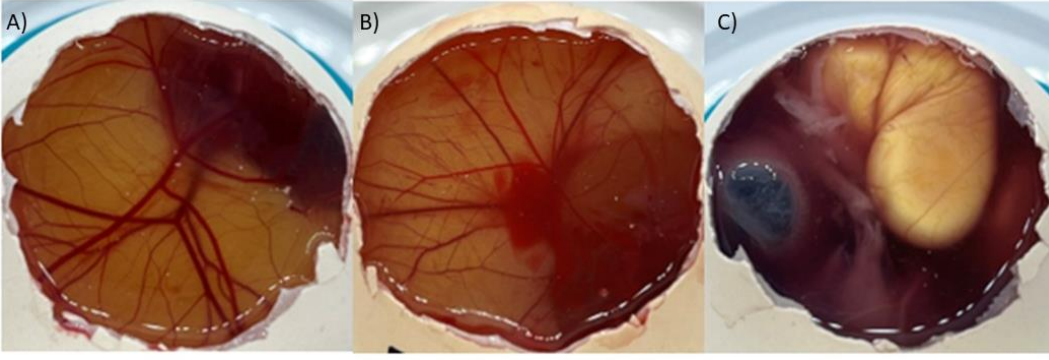


Şekil 3.38: FA1'in farklı dozlarda uygulanmasıyla koryoallantoik membrandaki değişimler. A:100 $\mu\text{g/mL}$ B: 200 $\mu\text{g/mL}$ C: 400 $\mu\text{g/mL}$



Şekil 3.39: FA2'nin farklı dozlarda uygulanmasıyla koryoallantoik membrandaki değişimler.

A:100 ug/ml B: 200ug/ml C: 400 ug/ml



Şekil 3.40: FA3'ün farklı dozlarda uygulanmasıyla koryoallantoik membrandaki değişimler.

A:100 ug/ml B: 200ug/ml C: 400 ug/ml

4. TARTIŞMA

Bitkisel türevli bileşikler, her zaman çeşitli hastalıkların tedavisi için önemli bir ilaç kaynağı olmuştur. Yeni keşfedilen doğal kaynaklı anti-kanser ajanlar, yüksek biyoaktif bileşikler içermelerinden ötürü tedavilerde hedef oluşturmaktadırlar. dünya çapında görülen yaygın kanser vakalarında doğal ürünlerin, kimyasalların zararlı etkilerine karşı koruyucu ajanlar olduklarını göstermektedir. Bu doğal ürünlerin büyük bir çoğunluğu güçlü antioksidandır ve doğal ortamlarında fenol içeren bitkilerden oluşmaktadır; diğerleri ise farklı işlevsel grup içeren koruyucu niteliklere sahip olanlardır.

Triterpenler, triterpenoidler olarak adlandırılan, bitkisel, hayvansal ve mantar kökenli doğal olarak oluşan alkenlerdir (Chudzik et al., 2015). Triterpen saponinler ise saponin bileşikleri grubuna ait olan triterpenler olarak adlandırılmakta; triterpen glikozitler de doğada en yaygın bulunan saponinler olarak bilinmektedir (Podolak et al., 2010). Saponinlerin kanser tedavisinde kullanımında otofajik hücre ölümünü uyarılabilmekte, nitrik oksit üretimini azalmakta ve hücre iskeleti bütünlüğünün bozulması gerçekleşmektedir. Bu bileşiklerin sitotoksik etkilerinin, apoptoz veya hücre ölümünün apoptotik olmayan uyarımı ile başlatılabildiği düşünülmektedir.

Kapsamlı literatür araştırması, saponinlerin apoptoz, ferroptoz, onkotik nekroz, nekroptoz ve otofaji yoluyla kanser hücresi ölümünü indüklemedeki önemli yeteneğini ortaya çıkarmıştır (Elekofehinti et al., 2021). Bunun yanı sıra triterpen saponinler geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesine sahiptir (Podolak et al., 2010). Bu bileşikler kısa süreli hücre zarı yeniden düzenlemelerine veya tamamen yok olmasına neden olabilmektedirler. Saponinler, zarda gözenek oluşturabilmeleri sayesinde hücrelerin iyonik dengesini bozarak hücre lizisine ve ölümüne yol açabilmektedirler (Koczurkiewicz et al., 2015). Triterpen saponinler sadece neoplastik hücre dizilerinin yaşamını inhibe etmekle kalmamakta, aynı zamanda kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyerek vücudun normal hücrelerine tehdit oluşturmadan intihar ölümlerine neden olmaktadır. Triterpen saponinlerin aktivitesinin seçiciliği, onları kanser tedavisi ve önlenmesinde alternatifler olarak sunmaktadır. Bu nedenle, sitotoksik özelliklerinin ve altta yatan mekanizmaların değerlendirilmesi için bu tür bileşiklerin izolasyon yoluyla elde edilmesi esastır.

Modern farmakolojik çalışmada bu bitkinin antioksidan, nöroproteksiyon, kandaki lipiti azaltma ve antidiyabetik aktivite dahil olmak üzere birçok biyolojik aktivitesi gösterilmiştir (Yan Zhang et al., 2018).

Günümüze kadar birçok triterpen saponin bileşiği izole edilmiş olmakla birlikte bu bileşiklerin antikanser, anti-anjiyogenik aktivitesi ve toksisitesi üzerinde bu kapsamda bir çalışma mevcut literatürde bulunmamaktadır (Podolak et al., 2023). Bu nedenle tez çalışması kapsamında *Astragalus* L.'den izole edilen 3 triterpen saponin bileşiğinin (FA1, FA2, FA3) antioksidan kapasitesinin belirlenmesi, sitotoksik, genotoksik ve anti-anjiyogenik etkinlerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

In vitro hücre canlılığı ve sitotoksikite deneyleri, çeşitli maddelerin sitotoksikite testleri ve ilaç taraması için yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Aslantürk Ö.S., 2018). MTT testi, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksikitenin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır (Ghasemi et al., 2021). Saponinlerin aktivitesi doza bağlıdır ve oral dozajda önemli bir artış, saponin toksisitesini önemli ölçüde artırabilen biyoyararlanım ve etkide önemli bir artış anlamına gelir (Elekofehinti et al., 2021). Çalışmamızın ilk basamağını 3 triterpen saponin bileşiğinin (FA1, FA2, FA3) sitotoksikite denemeleri oluşturmuştur. Yapılan değerlendirilmeler sonucu FA2 ve FA3'te hücre canlılığı yüksek oranda olduğu için sitotoksik olmadığı kanısına varılmıştır. FA1 maddesinde doz arttıkça hücre canlılığı düşmüştür. Hücre kültürü sonuçlarına göre yalnızca FA1'de sitotoksik etki gözlenmiş ve CCD34-LU, U87-MG ve SHSY-5Y hücre hatları için IC₅₀ değerleri sırasıyla 44.14, 69.24 ve 35,24 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bazı saponinlerin sitotoksik aktivitesini, tümörü önlemek için sinyal yolları aracılığıyla apoptoz yoluyla gösterdiği bildirilmektedir (Alam et al., 2017). Buradan yola çıkarak FA1'in IC₅₀ değerleriyle flow sitometri yapılmıştır.

Programlı hücre ölümünün formları, malignan neoplastik hücrelerin kaderine yön veren özgüllükleri nedeni ile günümüz anti-kanser çalışmalarının odak noktası haline gelmişlerdir. Hücre içerisindeki ölüm sinyallerinin belirlenebilmesine yönelik moleküler çalışmaların ışığında, bu üç ölüm formunun ayırt edilebilmesi,

yeni anti-kanser terapötik stratejilerinin geliştirilmesinde önemlidir. Günümüz anti-kanser fitoterapötik geliştirme girişimlerinde de apoptoz, öncelikli olarak dikkat çeken programlı hücre ölüm tipidir. Çalışma kapsamında MTT test sonuçlarına bakılarak sadece FA1'in IC₅₀ değeri hesaplanabilmiştir. FA2 ve FA3'te sitotoksik etki görülmemiştir. Bu bulgulara göre FA2 ve FA3 apoptoz veya nekroz odaklı anti-kanser ajan olarak değerlendirilemezler. FA1'in IC₅₀ değeri kullanılarak gerçekleştirilen flow sitometri analizinde geç apoptoz ve nekroz izlenmiştir. Apoptoz ve nekroz, kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasında yer alan ve başarılı tedaviye yol açan çeşitli hücre ölüm mekanizmaları arasındadır. Bu nedenle, kanser hücrelerini öncelikle apoptoz yoluyla nekroz olmadan veya daha az nekrozla ortadan kaldıran ilaçlar, inflamatuvar yanıtların olmaması nedeniyle iyi kanser ilacı adaylarıdır (Jantamat et al., 2019). Onlarca yıllık araştırmalar, apoptozu düzenleyen yolları ortaya çıkarmış ve kanser tedavisinde yeni teşhis ve terapötik modalitelerin geliştirilmesine izin vermiş olsa da tümör hücresi otofajisi ve nekrozunun düzenlenmesi ve önemi ancak son zamanlarda araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (Amaravadi et al., (2007). Radyasyon tedavisi ile kombinasyon halinde saponinler, kanser hücrelerinde apoptozu ve hücre döngüsü durmasını indükler, böylece dirençli kanser hücrelerini radyasyon tedavisine duyarlı hale getirir (Elekofehinti et al., 2021).

Antioksidan kapasite, yaşlanma ve yaşa bağlı diğer hastalıklarda oksidatif stresin durumunu ve potansiyelini değerlendirmek için birincil ölçümdür (Maurya, 2020). Oksidatif stres, hücre ortamı bir oksidana doğru kaydırmaya doğru bir dengesizlik yaratan hücre antioksidan seviyelerine karşı hücre serbest radikal oluşumundaki artış olarak tanımlanır (Siddeeg et al., 2021). Oksidatif stres, doku hasarının önde gelen ana nedenidir ve kanser, karaciğer bozuklukları, nörolojik bozukluklar, diabetes mellitus (DM) ve kardiyovasküler bozukluklar dahil olmak üzere çok sayıda kronik bozuklukla ilişkili merkezi bir mekanizmadır (Siddeeg et al., 2021). Kontrol hücreler (hücre canlılığı %100) ve 1 mM H₂O₂ ile hasara uğratılmış hücreler (hücre canlılığı %30.1) ile karşılaştırıldığında, FA1'in uygulanan konsantrasyonlarında H₂O₂ hasarına karşı koruyucu etki göstermediği belirlenmiştir. FA2'nin tüm konsantrasyonlarda (25, 50, 75 ve 100 µg/mL, sırasıyla hücre canlılığı %37.5, 37.0, 41.5 ve 44.2), FA3'ün ise 75 ve 100 µg/mL'de (sırasıyla hücre canlılığı %32.2 ve 39.2) H₂O₂ hasarına karşı koruyucu antioksidan

etki gösterdiği belirlenmiştir. Saponinlerin antioksidan etki yoluyla hücrelerin serbest radikal hasarından korunmasına, prooksidan aktivite yoluyla apoptotik hücre ölümünün motive edilmesine ve tümör oluşumunun inhibe edilmesine yol açan oksidatif strese karşı koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir (Ashraf et al., 2013). Bu da FA2 ve FA3'ün bu bağlamda değerlendirilmesine yol açmıştır.

Triterpen saponinlerin genotoksik potansiyelini belirlemek amacıyla Ames testi gerçekleştirilmiştir. Bu test, bakterilerde mutajeniteyi kullanan kanserojenlerin tanımlanması için kullanılan kısa süreli bir testtir (Föllmann et al., 2013). Üç bileşiğin *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA102 suşlarına karşı genotoksik potansiyeli incelenmiştir. TA98 çerçeve kayması, TA102 baz değişim mutasyonu özelliklerini tespit etmekte kullanılır (Vijay et al., 2018). Bu bağlamda incelendiğinde madde tarafından oluşturulan kolonilerin sayısı spontan revertant aralığı aşarsa, madde genotoksik olarak kabul edilir (Vijay et al., 2018).. Fakat üç madde için de (FA1, FA2, FA3) literatürde belirtilen en yüksek konsantrasyon olan 5000 µg/mL'de çalışılmış ve mutasyona sebep olmadığı ortaya konmuştur. Klasik genotoksik maddeler karsinogenez ve doğurganlık kusurlarına neden olduğundan, genotoksik potansiyelin değerlendirilmesi farmasötik ve kimyasal güvenlik açısından çok önemlidir (Lin et al., 2021). Bu yüzden bu maddeler mutasyona sebep olmaması bakımından güvenli olarak değerlendirilmektedir.

Potansiyel bir anti-anjiyogenik ajanın belirlenmesinde kullanılan yöntem olan HET- CAM metodu, kolay uygulanabilirliği ve hızlı sonuçların elde edilmesi bakımından sıklıkla tercih edilmektedir (Sandhya vd., 2012; Ribatti, 2022). Bu amaçla izolasyonu yapılan üç triterpen saponinin anjiyogenez inhibisyonu üzerine etkileri, döllenmiş tavuk yumurtalarının koryoallantoik membran üzerinde araştırılmıştır. Koryoallantoik Membran, Kuş ve reptil yumurtalarında bulunan vasküler fetal membran türüdür. Mesodermden kökenlenen membran, allantois ve thechorion adı verilen iki yapıdan oluşmaktadır. Memelilerdeki formu ise plasentadır. Membran, embriyonik gelişimin kemik oluşum safhasında kalsiyum transportunda önemli rol oynamaktadır. Bu membran sinir içermediğinden işlem sırasında embriyoda herhangi bir stres faktörü oluşturmaz (Vargas vd., 2007). Anjiyogenez, yara iyileşmesi, doku büyümesi ve rejenerasyon gibi çeşitli süreçlerde yeni kan damarlarının oluşumunu sağlayan birçok molekülün rol aldığı karmaşık

bir mekanizmadır (Oguntade et al., 2021). Hızlı büyüme ile karakterize edilen kanser hücreleri, oksijen ve besin elde etmek ve metastaz yapmak için yeni kan damarlarına ihtiyaç duyar. Bu nedenle, anti-anjiyojenik ajanlar uzun yıllardır kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Al-Husein et al., 2012). Örneğin, bir dammarane saponin olan ginsenoside-Rb2, tümör kaynaklı anjiyogenezi inhibe ederek B16-BL6'nın tümör metastazını yavaşlatır (Elekofehinti ve diğerleri, 2021). Çalışmada negatif ve çözgen kontrol olarak kullanılan maddelerde herhangi bir etki saptanmazken, anti-anjiyogenik bir ajan olduğu bilinen suramine pozitif kontrol olarak gereken etkiyi göstermiştir. FA1'in 400 µg/mL, FA2 ve FA3'ün 200 µg/mL ve üzeri uygulamalarında HET-CAM testi ile düşük etkili anti-anjiyogenik etki gösterdiği izlenmiştir. Yapılan MTT testi sonuçlarına bakılarak dozlar belirlendiği için daha yüksek doz kullanımında etki artabilmesine rağmen bu fazla toksisiteye sebep olabilirdi. Bu sonuçlar incelendiğinde FA1'in düşük dozlarda anti-anjiyogenik etki göstermediği gözlemlenmiştir. FA2 ve FA3'te ise en düşük dozda etki görülmemiş fakat doz arttıkça anti-anjiyogenik etki de artmıştır. Gerekli araştırmalar yapıp daha yüksek dozlara çıkmak mümkün olursa daha yüksek dozlar denenmeli ve anti-anjiyogenik etki araştırılmalıdır.

5. SONUÇ

FA1'in uygulanan konsantrasyonlarında H₂O₂ hasarına karşı koruyucu etki göstermediği belirlenmiştir. FA2'nin tüm konsantrasyonlarda (25, 50, 75 ve 100 µg/mL) FA3'ün ise 75 ve 100 µg/mL'de H₂O₂ hasarına karşı koruyucu antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. Sitotoksisite testinde yalnızca FA1'de sitotoksik etki gözlenmiş ve CCD34-LU, U87-MG ve SHSY-5Y hücre hatları için IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. FA1'in IC₅₀ değeri kullanılarak gerçekleştirilen flow sitometri analizinde apoptoz ve nekroz izlenmiştir. Üç bileşiğin de +S9 ve -S9 ortamlarda *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA102 suşlarına karşı maksimum konsantrasyonda (5000 µg/mL) bile genotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. FA1'in 400 µg/mL, FA2 ve FA3'ün 200 µg/mL ve üzeri uygulamalarında HET-CAM testi ile anti-anjiyogenik etki gösterdiği izlenmiştir. Sonuç olarak bu 3 triterpen saponin bileşiğinin biyolojik aktivitesi ve toksisitesi moleküler seviyede ortaya konmuş ve bu bileşiklerin potansiyel antikanser ajanlar olabilecekleri gösterilmiştir.

Triterpen saponinlerin sadece neoplastik hücre dizilerinin yaşamını inhibe etmekle kalmayıp, aynı zamanda kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyerek vücudun normal hücrelerine tehdit oluşturmaktan ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca triterpenlerin aktivitesi seçicilik gösterdiği için kanser tedavisi ve önlenmesinde alternatif olarak sunulmaktadır. Bu nedenle, sitotoksik özelliklerinin ve altta yatan mekanizmaların değerlendirilmesi için bu tür bileşiklerin yeni türevlerinin izolasyonu yoluyla elde edilmesi esastır (Chudzik et al., 2015). Bazı *Astragalus* türlerinin Uzakdoğu geleneksel tıbbında kanser tedavisi için kullanıldığı bildirilmiştir. Bu nedenle bu çalışma kapsamında *Astragalus*'tan izole edilen triterpen saponinlerin antikanser özelliklerinin ortaya çıkarılması ve olası toksisitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Günümüze kadar birçok triterpen saponin bileşiği izole edilmiş olmakla birlikte bu bileşiklerin özellikle sinir sistemi tümörleri üzerinde sitotoksik, anti anjiyogenik aktivitesi ve toksisitesi üzerinde bu kadar ayrıntılı bir çalışma daha önce yapılmamış olup bu bağlamda önerilen proje özgünlük taşımaktadır. Daha ileri sonuçlar *in vivo* denemelerle desteklenmelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alam, F., Najum Us Saqib, Q., & Waheed, A.** (2017). Cytotoxic activity of extracts and crude saponins from *Zanthoxylum armatum* DC. against human breast (MCF-7, MDA-MB-468) and colorectal (Caco-2) cancer cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 368. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1882-1>
- Al-Husein, B., Abdalla, M., Trepte, M., Deremer, D. L., & Somanath, P. R.** (2012). Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Pharmacotherapy*, 32(12), 1095–1111. <https://doi.org/10.1002/phar.1147>
- Altun, A., Kaya Temiz, T., Balci, E., Akin Polat, Z., Turan, M.** 2013. Effects of tyrosine kinase inhibitor E7080 and eNOS inhibitor L-NIO on colorectal cancer alone and in combination. *Chin J Cancer Res*, 25, 572–584.
- Amaravadi, R. K., & Thompson, C. B.** (2007). The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(24), 7271–7279. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1595>
- Ashraf, M. F., Abd Aziz, M., Stanslas, J., Ismail, I., & Abdul Kadir, M.** (2013). Assessment of antioxidant and cytotoxicity activities of saponin and crude extracts of *Chlorophytum borivilianum*. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 216894. <https://doi.org/10.1155/2013/216894>
- Aslantürk, Ö. S.** (2018). *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. InTech. doi: 10.5772/intechopen.71923

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., & Bak, S.** (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), 435–457. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>
- Bartnik, M., & Facey, P. C.** (2017). *Glycosides. Pharmacognosy*, 101–161. doi:10.1016/b978-0-12-802104-0.00008-1
- Başbağ, M., Çağan, E. , Sayar, M. S., Fırat, M.** 2019. Güneydoğu Anadolu Bölgesinin Farklı Lokasyonlarından Toplanan Boynuzlu Geven (*Astragalus hamosus* L.) Otunun Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi, 5 (2), 346-354. doi: 10.24180/ijaws.594960
- Cancer Research UK**, 2016. Worldwide Cancer Statistics (accessed on 24/10/2016). <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>
- Chhikara, B. S., & Parang, K.** (2022). Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451. Retrieved from <https://pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/451>
- Chudzik, M., Korzonek-Szlacheta, I., Król, W.** 2015. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(1), 1610–1625. <https://doi.org/10.3390/molecules20011610>
- DeMarini, D.M.** (2019). The role of genotoxicity in carcinogenesis. In: Baan RA, Stewart BW, Straif K, editors. Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2019. (IARC Scientific Publications, No. 165.) Chapter 12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570347/>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Elekofehinti, O.O., Iwaloye, O., Olawale, F., Ariyo, E.O.** 2021. Saponins in Cancer Treatment: Current Progress and Future Prospects. *Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology*, 28(2), 250-272. <https://doi.org/10.3390/pathophysiology28020017>
- Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., & Barón, M. G.** (2003). Classification of anticancer drugs—a new system based on therapeutic targets. *Cancer treatment reviews*, 29(6), 515-523.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M.F., Allen, C. et al.** 2015. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.*1(4):505-27. 2.
- Föllmann, Wolfram & Degen, Gisela & Oesch, Franz & Hengstler, J.G..** (2013). Ames Test. 10.1016/B978-0-12-374984-0.00048-6.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I.** (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Ioele, Giuseppina, Martina Chieffallo, Maria Antonietta Occhiuzzi, Michele De Luca, Antonio Garofalo, Gaetano Ragno, and Fedora Grande.** 2022. "Anticancer Drugs: Recent Strategies to Improve Stability Profile, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties" *Molecules* 27, no. 17: 5436. <https://doi.org/10.3390/molecules27175436>
- Jantamat, P., Weerapreeyakul, N., & Puthongking, P.** (2019). Cytotoxicity and Apoptosis Induction of Coumarins and Carbazole Alkaloids from *Clausena harmandiana*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(18), 3385. <https://doi.org/10.3390/molecules24183385>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman D.** 2011. Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 61, pp. 69-90.
- Kadioğlu, B., Kadioğlu, S., Turan, Y.** 2012. Gevenlerin (*Astragalus* Sp.) Farklı Kullanım Alanları ve Önemi. *Alinteri J Agriculture Science*, 14 (1): 17-26. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/alinterizbd/issue/2379/30447>
- Kocabaş, Y.Z., İlçim, A., Çömlekçioğlu, N.** 2014. Kahramanmaraş Başkonuş Dağı givenleri (*Astragalus* spp.) ve önemi. III. Uluslararası Odun Dışı Orman Ürünleri Sempozyumu, 8-10 Mayıs 2014, Kahramanmaraş
- Koczurkiewicz, P., Czyż, J., Podolak, I., Wójcik, K., Galanty, A., Janeczko, Z., & Michalik, M.** (2015). Multidirectional effects of triterpene saponins on cancer cells - mini-review of *in vitro* studies. *Acta biochimica Polonica*, 62(3), 383–393. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1089
- Küçük Kurt, İ. Fidan, A.F.** 2008. Saponinler ve Bazı Biyolojik Etkileri. *Kocatepe Veteriner Dergisi*. 89: 96
- Lin, B., Qi, X., Fang, L., Zhao, L., Zhang, R., Jing, J., Zhang, S., Yang, X., Hou, Z., & Xue, P.** (2021). *In vivo* acute toxicity and mutagenic analysis of crude saponins from *Chenopodium quinoa* Willd husks. *RSC advances*, 11(8), 4829–4841. <https://doi.org/10.1039/d0ra10170b>
- Maron, D.M., Ames B.N.** 1983. “Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test”, *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- Mathur, Garima.** (2015). cancer: an overview. *Academic Journal of Cancer Research*. 8. 01-09. 10.5829/idosi.ajcr.2015.8.1.9336.
- Maurya, Pawan.** (2020). Animal biotechnology as a tool to understand and fight aging. 10.1016/B978-0-12-811710-1.00010-0.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- McGuire, S.** 2014. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. Adv Nutr. 2016 Mar 15;7(2):418-9. doi: 10.3945/an.116.012211.
- Modi, A., Noor Al-Dousari.** 2020. The environmental and economic importance of *Astragalus Spinosus* in land restoration, Journal of Taibah University for Science, 14:1, 1489-1495, doi: [10.1080/16583655.2020.1834758](https://doi.org/10.1080/16583655.2020.1834758)
- Morrone, S.** 2007. Annexin V. Purdue Cytometry. CD-ROM Series, volume 4. <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/chap16.htm>
- Mosmann, T.** 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J Immunological Methods, 65, 55-63.
- National Center for Biotechnology Information** (2023). PubChem Compound Summary for CID 451674, Triterpenoid. Retrieved July 24, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triterpenoid>.
- OECD Guideline for the testing of chemicals No.471:** 1997. Bacterial reverse mutation test, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Oguntade, A.S., Al-Amodi, F., Alrumayh, A. et al.** (2021). Anti-angiogenesis in cancer therapeutics: the magic bullet. *J Egypt Natl Canc Inst* **33**, 15. <https://doi.org/10.1186/s43046-021-00072-6>
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D.A., Michalopoulos, I.** 2015. Human cancer databases (review). *Oncol Rep.* 33(1):3-18.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Podolak, I., Galanty, A., & Sobolewska, D.** 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 9(3), 425–474. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9183-z>
- Podolak, I., Grabowska, K., Sobolewska, D. et al.** 2023. Saponins as cytotoxic agents: an update (2010–2021). Part II—Triterpene saponins. *Phytochem Rev* **22**, 113–167. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09830-3>
- Ramachandran, M. et al.** 2017. Safe and Effective Treatment of Experimental Neuroblastoma and Glioblastoma Using Systemically Delivered Triple MicroRNADetargeted Oncolytic Semliki Forest Virus. *Clin Cancer Res*; 23(6).
- Rehman, Sakina., Abbas, Zaigham.** (2018). An Overview of Cancer Treatment Modalities. 10.5772/intechopen.76558.
- Ribatti D.** (2022). Two new applications in the study of angiogenesis the CAM assay: Acellular scaffolds and organoids. *Microvascular research*, 140, 104304. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104304>
- Saeidnia, S., Manayi, A., & Abdollahi, M.** (2015). From *in vitro* Experiments to *in vivo* and Clinical Studies; Pros and Cons. *Current drug discovery technologies*, 12(4), 218–224. <https://doi.org/10.2174/1570163813666160114093140>
- Sandhya, S., Sai Kumar, P., Vinod, K.R., Banji, D., Kumar, K. and Rajeshwar, T.** 2012. In ova angiogenesis analgesic and anti inflammatory potency of *Aerva monsoniae* (Amaranthaceae), *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 385-389 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & Al-Farga, A. M.** (2021). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi journal of biological sciences*, 28(3), 1633–1644. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A.** 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 65(1):5-29.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F.** (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tilaoui, M., Ait Mouse, H., & Ziad, A.** (2021). Update and New Insights on Future Cancer Drug Candidates From Plant-Based Alkaloids. *Frontiers in pharmacology*, 12, 719694. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.719694>
- Ulus, G., Koparal, A.T., Baysal, K., Yetik Anacak, G., Karabay Yavaşoğlu, N.Ü.** 2018. The anti-angiogenic potential of ($\pm$) gossypol in comparison to suramin. *Cytotechnology*. 70(6):1537-1550. doi:10.1007/s10616-018-0247-Z.
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., & Capella, G.** (2010). *Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. Current Pharmaceutical Design*, 16(1), 3–10. doi:10.2174/138161210789941847
- Vargas, A., Zeisser-Labouèbe, M., Lange, N., Gurny, R. and Delie, F.** 2007. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1162-1176 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Vijay, U., Gupta, S., Mathur, P., Suravajhala, P. and Bhatnagar, P.** (2018). Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Bio-protocol* 8(6): e2763. DOI: [10.21769/BioProtoc.2763](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2763).
- Vural, C., Şapçı, H.** (2012) A single locality, endemic species, *Astragalus argaeus* (Fabaceae Kew Bull 67, 89–92 <https://doi.org/10.1007/s12225-012-9335-y>
- Yesilada, E., Bedir, E., Çalış, İ. et al.** 2005 Effects of triterpene saponins from *Astragalus* species on *in vitro* cytokine release. *J Ethnopharmacol* 96: 71–77, 2005. 4.
- Yoshida, Y., Wang, Q., Liu, J., Shan, B., Yamashita, U.,** 1997. Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *Oleandrina diffusa* in particular. *International Journal of Immunopharmacology* 19, 359–370.
- Zhang, R. et al.** 2013. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. *Food Chemistry*. 136, 3–4, 1169–1176
- Zhang, Y., Zhao, L., Huang, S. W., Wang, W., & Song, S. J.** (2018). Triterpene saponins with neuroprotective effects from the leaves of *Diospyros kaki* Thunb. *Fitoterapia*, 129, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.06.023>

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin boyunca daha iyisini yapabilmemiz için çabalayan, akademik bilgisini ve emeklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana her konuda destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU'na,

Tezimde kullandığım maddelerin sentezini sağlayan Prof. Dr. Tamer KARAYILDIRIM ve Araş. Gör. Dr. Rabia Nur ÜN'e

Bilgi ve deneyiminden her zaman faydalandığım, her konuda katkı ve yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Dr. Çinel KÖKSAL KARAYILDIRIM'a,

Tezimin çeşitli aşamalarının tamamlanmasında bana laboratuvarını açan ve destek olan Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a ve yardımcıları için Göksel GÖKTAŞ, Sevda ZEİNALİ başta olmak üzere tüm İmmunobiyoteknoloji ve Biyoaktivite Tarama Laboratuvarı üyelerine,

Çalışmalarım boyunca yaptığı katkı ve yardımlardan dolayı Araş. Gör. Dr. Didem AKSU'ya,

Yüksek lisansım süresince çalışmama verdikleri emekler ve yardımlar için Cem GÜLER, Ceyda ALDAĞ ve Ebru ŞANCI'ya,

Aramızda mesafeler olsa da sevgilerini hissettiğim, beni her zaman destekleyen arkadaşlarım Merve SÖNMEYEN, Suğde KAMBUR, Huriye TEKİN ve Cansu TEKİN'e

Hayatım boyunca yaptığım her işte bana güvenerek yanımda olan, her zaman destekleyen, sevgisini her zaman hissettiğim annem Sibel DURMAZ, babam Ali Faik DURMAZ ve kardeşim Hilal DURMAZ'a sonsuz teşekkürler.

ÖZGEÇMİŞ

MERYEM SİLA DURMAZ

EĞİTİM

Yüksek Lisans

2021-2023

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Genel Biyoloji (YL) (Tezli)

Lisans

2017-2021

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ağırlıklı Biyoloji

Ortaokul-Lise

2010-2017

Türk Maarif Koleji (Lefkoşa, KKTC)

STAJ

2020 Temmuz

Lefkoşa Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı

2022 Ağustos

Biobank.cy, Kıbrıs
Erasmus+ Staj Hareketliliği

SERTİFİKALAR ve KATILIM BELGESİ

2022 Haziran

Deney Hayvanları Kullanım Kursu (Kategori A)

2022 Haziran

ISO 17025: 2017 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının
Yeterliliği

2022 Haziran

ISO 9001: 2015 Kalite Yönetim Sistemi

2022 Haziran

ISO 9001: 2015 Kalite Yönetim Sistemi İç Denetçi

2022 Haziran

ISO 45001: 2018 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi

2022 Haziran

GLP İyi Laboratuvar Uygulamaları

BECERİLER

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce

Okuma: B2 Yazma: B2 Konuşma: B2

Bilgisayar Bilgisi

Word, Excel, Powerpoint

Laboratuvar Bilgisi

PCR, Jel Elektrophorez, Sanger Dizileme, RNA İzolasyonu,
Ames Testi, ELISA, HET-CAM Testi, MTT Testi, Hücre
Kültürü Teknikleri, NGS için kütüphane hazırlama