



T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NARİNGİN VE BERBERİN İLE ENKAPSÜLE EDİLMİŞ POLİMERİK  
NANOPARTİKÜLLERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER  
HÜCRELERİNDE OLASI SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK  
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Ecz. Jülide SECERLİ

Farmasötik Toksikoloji  
Yüksek Lisans Programı

Yüksek Lisans Tezi

Aralık 2022



**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**  
**GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NARİNGİN VE BERBERİN İLE ENKAPSÜLE EDİLMİŞ POLİMERİK  
NANOPARTİKÜLLERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER  
HÜCRELERİNDE OLASI SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK  
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Ecz. Jülide SECERLİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Merve BACANLI**

**Farmasötik Toksikoloji**

**Yüksek Lisans Tezi**

**ANKARA**

**Aralık 2022**

## BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Jülide SECERLİ

06.12.2022

## ÖZET

**Amaç:** Bitkilerden elde edilen ve günümüzde birçok ilacın kaynağını oluşturan fitokimyasal bileşikler, sahip oldukları önemli terapötik etkileri nedeniyle uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde bu bileşiklerin kullanımı dikkat çekmekle birlikte çözünürlük problemleri ve terapötik etkilerini iyileştirmek için nanotaşıyıcı sistemlere odaklanılmaktadır. Bu tezin amacı, naringin ve berberin maddeleri ile naringin ve berberin ile enkapsüle edilmiş poli(metilmetakrilat) (PMMA) kaplı nanopartikül (NP)'lerin antioksidan özellikleri ile fare fibroblast (3T3) ve kolon kanseri (Caco-2) hücreleri üzerindeki olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** 25-2000  $\mu$ M konsantrasyon aralığında berberin, naringin, berberin yüklü PMMA NP ve naringin yüklü PMMA NP'lerin antioksidan kapasiteleri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali yöntemi ile belirlenmiştir. 2,5-100  $\mu$ M konsantrasyon aralığında berberin, berberin yüklü PMMA NP ve naringin yüklü PMMA NP'lerin ve 25-2000  $\mu$ M konsantrasyon aralığında naringinin 24, 48 ve 72 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-3,5-difenilformazan (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir. 2,5-100  $\mu$ M konsantrasyon aralığında berberin, berberin yüklü PMMA NP ve naringin yüklü PMMA NP'lerin ve 25-2000  $\mu$ M konsantrasyon aralığında naringinin genotoksik etkileri ise 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde tek hücre jel elektroforez yöntemi (COMET) belirlenmiştir.

**Bulgular:** 2000  $\mu$ M konsantrasyonunda berberin, naringin, berberin yüklü PMMA NP ve naringin yüklü PMMA NP'lerin DPPH inhibisyonunun sırasıyla %41,24, 64,08, 25,84, 34,11'e ulaştığı bulunmuştur. MTT testi sonucuna göre; 24,48,72 saat maruziyet sonra 3T3 hücresinde IC50 değerinin sırasıyla berberin için 79,20, 92,43, 60,97; naringin için 1891,20, 1955,34, 1931,37; berberin yüklü PMMA NP'lerin için 89,49, 91,77, 65,99; naringin yüklü PMMA NP'lerin 88,7977, 95,6684, 67,495 olduğu belirlenmiştir. 24,48,72 saat maruziyet sonra Caco-2 hücresinde ise IC50 değerinin sırasıyla berberin için 64,48, 66,39, 73,72; naringin için 1991,12, 1531,17, 1452,17; berberin yüklü PMMA NP'lerin için

93,24, 68,35, 78,82; naringin yüklü PMMA NP'lerin 76,04, 81,89, 82,24 olduğu belirlenmiştir. COMET yönteminde ise çalışılan bileşiklerin düşük konsantrasyonlarında genotoksik etkilerinin olmadığı saptanmıştır.

**Sonuç:** Araştırma verilerine dayanarak naringin ve berberin ile enkapsüle polimerik NP'lerin kanser için yeni tedavi yaklaşımlarına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Ancak daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** PMMA, Berberin, Naringin, Antioksidan Kapasite, MTT, COMET

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP – 2021/081) tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Purpose:** Phytochemical compounds obtained from plants have been used for many years due to their important therapeutic effects and today, they are still the source of many drugs. In this study, it was aimed to evaluate the antioxidant properties of naringin and berberine substances and poly(methylmethacrylate) (PMMA) coated naringin and berberine nanoparticles (NP) and their possible cytotoxic and genotoxic effects on mouse fibroblast (3T3) and colon cancer (Caco-2) cells.

**Methods:** The antioxidant capacities of berberine, naringin, berberine-loaded PMMA NP and naringin-loaded PMMA NPs in the concentration range of 25-2000  $\mu\text{M}$  were determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) radical method. The cytotoxic effects of berberine, berberine-loaded PMMA NP and naringin-loaded PMMA NPs in the concentration range of 2.5-100  $\mu\text{M}$ , and naringin in the concentration range of 25-2000  $\mu\text{M}$  were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazine (MTT) assay in 3T3 and Caco-2 cells after 24, 48 and 72 hours of exposure. The genotoxic effects of berberine, berberine-loaded PMMA NP and naringin-loaded PMMA NPs in the concentration range of 2.5-100  $\mu\text{M}$  and naringin in the concentration range of 25-2000  $\mu\text{M}$  were determined in 3T3 and Caco-2 cells by single cell gel electrophoresis method (COMET).

**Results:** It was found that DPPH inhibition of berberine, naringin, berberine-loaded PMMA NP and naringin-loaded PMMA NPs at 2000  $\mu\text{M}$  concentration reached 41.24%, 64.08%, 25.84%, 34.11%, respectively. As a result of the MTT assay; after 24, 48 and 72 hours of exposure, the determined IC<sub>50</sub> values in 3T3 cells were 79.20  $\mu\text{M}$ , 92.43  $\mu\text{M}$ , 60.97  $\mu\text{M}$  for berberine; 1891.20  $\mu\text{M}$ , 1955.34  $\mu\text{M}$ , 1931.37  $\mu\text{M}$  for naringin; 89.49  $\mu\text{M}$ , 91.77  $\mu\text{M}$ , 65.99  $\mu\text{M}$  for berberine-loaded PMMA NPs; 88.80  $\mu\text{M}$ , 95.67  $\mu\text{M}$ , 67.50  $\mu\text{M}$  for naringine-loaded PMMA NPs, respectively. After, 24, 48 and 72 hours of exposure, the determined IC<sub>50</sub> values in Caco-2 cells were 64.48  $\mu\text{M}$ , 66.39  $\mu\text{M}$ , 73.72  $\mu\text{M}$  for berberine, respectively; 1991.12  $\mu\text{M}$ , 1531.17  $\mu\text{M}$ , 1452.17  $\mu\text{M}$  for naringin; 93.24  $\mu\text{M}$ , 68.35  $\mu\text{M}$ , 78.82  $\mu\text{M}$  for berberine-loaded PMMA NPs; 76.04  $\mu\text{M}$ ,

81.89  $\mu\text{M}$ , 82.24  $\mu\text{M}$  for naringin loaded PMMA NPs, respectively. In the COMET method, it was determined that the studied compounds did not have genotoxic effects at low concentrations.

**Conclusion:** Based on research data, it is thought that polymeric nanoparticles encapsulated with naringin and berberine may contribute to new treatment approaches for cancer, but further *in vivo* and *in vitro* research is required.

**Keywords:** PMMA, Berberine, Naringin, Antioxidant Capacity, MTT, COMET

This study was supported by the University of Health Sciences Scientific Research Projects Unit (BAP – 2021/081).



## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında gerekli her türlü desteği sağlayan Gülhane Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN'a, tez çalışmamın her aşamasında desteğini aldığım ve yardımlarını esirgemeyen Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Onur ERDEM'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her aşamada yol gösteren, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmalarımın her aşamasını büyük bir titizlikle inceleyen, her zaman sonsuz sevgi ve desteğini hissettiren değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Merve BACANLI'ya,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her zaman danışma fırsatı veren ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Özgür EŞİM ve Doç. Dr. Hakan ERDOĞAN'a,

Yüksek lisans tez çalışmalarımda kullanılan nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Uzm. Ecz. Şeyma ADATEPE'ye,

Yüksek lisans tez çalışmalarımda bana yardımcı olan araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Ecz. Serdar ÇETİNKAYA, Uzm. Ecz. Burcu KARAYAVUZ, Uzm. Ecz. Yağmur OKÇAY ve Ecz. Sadi YUSUFBEYOĞLU'na,

Dostlukları ve her zaman verdikleri destek ve yardımlarından dolayı araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Ve beni bugünlere getiren, hayatım boyunca bana güvenen, başaracağıma inanarak beni cesaretlendiren, her zaman yanımda olan ve varlıkları ile bana güç veren, tüm başarılarımda emekleri olan çok sevgili anne ve babam Zeynep-Gürkan SECERLİ'ye, her zaman yanımda olan ve beni destekleyen kardeşim Nisa SECERLİ'ye,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP – 2021/081) tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	viii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELERİN LİSTESİ</b> .....	xii
<b>ŞEKİLLERİN LİSTESİ</b> .....	xv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	xviii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>2.1. BİTKİLERDE BULUNAN FİTOKİMYASAL BİLEŞİKLER</b> .....	3
2.1.1. Bitkisel Fitokimyasal Bileşiklerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi ve Kullanım Yerleri .....	6
<b>2.2. OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDANLAR</b> .....	7
2.2.1. Serbest Oksijen Türleri .....	7
2.2.2. Antioksidanlar .....	8
<b>2.3. BERBERİN</b> .....	9
2.3.1. Genel Bilgiler .....	9
2.3.2. Farmakokinetik Özellikleri .....	9
2.3.2. Farmakolojik Etkileri .....	10
<b>2.4. NARİNGİN</b> .....	11
2.4.1. Genel Bilgiler .....	11
2.4.2. Farmakokinetik Özellikleri .....	11
2.4.3. Farmakolojik Etkileri .....	12
<b>2.5. NANOPARTİKÜL BAZLI SİSTEMLER</b> .....	12
<b>2.6. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN YÖNTEMLER</b> .....	19

2.6.1. Antioksidan Kapasite Tayini.....	19
2.6.2. Sitotoksisite Tayini .....	21
2.6.3. Genotoksisite Tayini .....	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	25
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	25
3.2. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER .....	26
3.3. HAZIRLANAN ÇÖZELTİLER.....	27
3.3.1. Çalışılan Bitkisel Çözeltiler .....	27
3.3.2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Yöntemiyle Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler .....	29
3.3.3. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler.....	29
3.3.4. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler.....	29
3.4. YÖNTEMLER.....	31
3.4.1. Nanopartiküllerin Eldesi .....	31
3.4.2. 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi.....	32
3.4.3. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi.....	33
3.4.4. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi.....	35
3.4.5. İstatistiksel Yöntem.....	37
4. BULGULAR .....	38
4.1. BERBERİN İLE ELDE EDİLEN BULGULAR.....	38
4.1.1. Berberinin 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular .....	38
4.1.2. Berberinin Sitotoksisitesine İlişkin Bulgular .....	39
4.1.3. Berberinin Genotoksisitesine İlişkin Bulgular.....	46

4.2. NARİNGİN İLE ELDE EDİLEN BULGULAR .....	48
4.2.1. Naringinin 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Kapasitesin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular .....	48
4.2.2. Naringinin Sitotoksisitesine İlişkin Bulgular .....	49
4.2.3. Naringinin Genotoksisitesine İlişkin Bulgular.....	56
4.3. PMMA NANOPARTİKÜLLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR .	58
4.3.1. PMMA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	58
4.4. BERBERİN PMMA NANOPARTİKÜLLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR.....	59
4.4.1. Berberin PMMA Nanopartiküllerinin 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular .....	59
4.4.2. Berberin PMMA NP'lerin Sitotoksisitesine İlişkin Bulgular .....	60
4.4.3. Berberin PMMA NP'lerin Genotoksisitesine İlişkin Bulgular .....	67
4.5. NARİNGİN PMMA NANOPARTİKÜLLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR.....	69
4.5.1. Naringin PMMA Nanopartiküllerinin 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular .....	69
4.5.2. Naringin PMMA NP'lerin Sitotoksisitesine İlişkin Bulgular .....	70
4.5.3. Naringin PMMA NP'lerin Genotoksisitesine İlişkin Bulgular.....	77
5. TARTIŞMA.....	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	85
KAYNAKLAR.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Naringin ve berberinin nanomateryal tabanlı bazı <i>in vitro</i> çalışmaları. ....	18
<b>Çizelge 2.2.</b> Antioksidan aktivite tayin yöntemleri.....	20
<b>Çizelge 2.3.</b> Sitotoksisite tayin yöntemleri .....	22
<b>Çizelge 4.1.</b> DPPH yöntemine göre berberinin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi. ....	38
<b>Çizelge 4.2.</b> MTT yöntemine göre berberinin 3T3 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi .....	39
<b>Çizelge 4.3.</b> MTT yöntemine göre berberinin 3T3 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi .....	40
<b>Çizelge 4.4.</b> MTT yöntemine göre berberinin 3T3 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi .....	41
<b>Çizelge 4.5.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra berberinin sitotoksik etkisi .....	43
<b>Çizelge 4.6.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra berberinin sitotoksik etkisi .....	44
<b>Çizelge 4.7.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra berberinin sitotoksik etkisi .....	45
<b>Çizelge 4.8.</b> Berberinin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi .....	46
<b>Çizelge 4.9.</b> DPPH yöntemine göre naringinin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi .....	48
<b>Çizelge 4.10.</b> MTT yöntemine göre 3T3 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi .....	49
<b>Çizelge 4.11.</b> MTT yöntemine göre 3T3 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi .....	50
<b>Çizelge 4.12.</b> MTT yöntemine göre 3T3 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi .....	51
<b>Çizelge 4.13.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi.....	53
<b>Çizelge 4.14.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi.....	54

<b>Çizelge 4.15.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi.....	55
<b>Çizelge 4.16.</b> Naringinin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi. ....	56
<b>Çizelge 4.17.</b> PMMA NP'lerin ortalama çapı ve Pdl.....	58
<b>Çizelge 4.18.</b> DPPH yöntemine göre berberin PMMA NP'lerin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi .....	59
<b>Çizelge 4.19.</b> MTT yöntemine göre berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi.....	60
<b>Çizelge 4.20.</b> MTT yöntemine göre berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi.....	61
<b>Çizelge 4.21.</b> MTT yöntemine göre berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi.....	62
<b>Çizelge 4.22.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra berberin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi.....	64
<b>Çizelge 4.23.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra berberin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi.....	65
<b>Çizelge 4.24.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra berberin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi.....	66
<b>Çizelge 4.25.</b> Berberin PMMA NP'lerin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi. ....	67
<b>Çizelge 4.26.</b> DPPH yöntemine göre naringin PMMA NP'lerin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi .....	69
<b>Çizelge 4.27.</b> MTT yöntemine göre naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi.....	70
<b>Çizelge 4.28.</b> MTT yöntemine göre naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi.....	71
<b>Çizelge 4.29.</b> MTT yöntemine göre naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi.....	72
<b>Çizelge 4.30.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra naringin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi.....	74
<b>Çizelge 4.31.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra naringin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi.....	75
<b>Çizelge 4.32.</b> MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra naringin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi.....	76

<b>Çizelge 4.33.</b> Naringin PMMA NP'lerin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi .....	77
--	----



## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1. Flavonoidlerin temel yapısı (Fenilbenzopiran iskeleti). .....	4
Şekil 2.2. Başlıca fenolik bileşiklerin yapıları. ....	5
Şekil 2.3. Berberinin kimyasal yapısı. ....	9
Şekil 2.4. Naringin kimyasal yapısı. ....	11
Şekil 2.5. Naringenin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.6. Antioksidan-DPPH radikali reaksiyon mekanizması.....	20
Şekil 2.7. DPPH radikali ve kararlı formu .....	21
Şekil 2.8. Canlı hücrelerde MTT'nin formazan kristaline dönüşümü. ....	23
Şekil 4.1. Berberinin 24 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	40
Şekil 4.2. Berberinin 48 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	41
Şekil 4.3. Berberinin 72 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	42
Şekil 4.4. Berberinin 24 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	43
Şekil 4.5. Berberinin 48 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri .....	44
Şekil 4.6. Berberinin 72 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri .....	45
Şekil 4.7. Berberinin 3T3 hücrelerinde DNA hasarına etkisi .....	47
Şekil 4.8. Berberinin Caco-2 hücrelerinde DNA hasarına etkisi .....	47
Şekil 4.9. Naringinin 24 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	50
Şekil 4.10. Naringinin 48 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	51
Şekil 4.11. Naringinin 72 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri .....	52
Şekil 4.12. Naringinin 24 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri .....	53
Şekil 4.13. Naringinin 48 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri .....	54

<b>Şekil 4.14.</b> Naringinin 72 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	55
<b>Şekil 4.15.</b> Naringinin 3T3 hücrelerinde DNA hasarına etkisi. ....	57
<b>Şekil 4.16.</b> Naringinin Caco-2 hücrelerinde DNA hasarına etkisi.....	57
<b>Şekil 4.17.</b> PMMA Nanopartiküllerin TEM görüntüleri.....	58
<b>Şekil 4.18.</b> Berberin PMMA NP'lerin 24 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	61
<b>Şekil 4.19.</b> Berberin PMMA NP'lerin 48 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	62
<b>Şekil 4.20.</b> Berberin PMMA NP'lerin 72 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	63
<b>Şekil 4.21.</b> Berberin PMMA NP'lerin 24 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	64
<b>Şekil 4.22.</b> Berberin PMMA NP'lerin 48 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	65
<b>Şekil 4.23.</b> Berberin PMMA NP'lerin 72 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	66
<b>Şekil 4.24.</b> Berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde DNA hasarına etkisi.....	68
<b>Şekil 4.25.</b> Berberin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi.....	68
<b>Şekil 4.26.</b> Naringin PMMA NP'lerin 24 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	71
<b>Şekil 4.27.</b> Naringin PMMA NP'lerin 48 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	72
<b>Şekil 4.28.</b> Naringin PMMA NP'lerin 72 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	73
<b>Şekil 4.29.</b> Naringin PMMA NP'lerin 24 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	74
<b>Şekil 4.30.</b> Naringin PMMA NP'lerin 48 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	75
<b>Şekil 4.31.</b> Naringin PMMA NP'lerin 72 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	76
<b>Şekil 4.32.</b> Naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde DNA hasarına etkisi.....	78

<b>Şekil 4.33.</b> Naringin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde DNA hasarına etkisi .....	78
--	----



## SİMGELER VE KISALTMALAR

3T3	Fare Fibroblast Hücreleri
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
ATP	Adenosin-5-trifosfat
Caco-2	Kolon Kanseri Hücreleri
CNE-1	İnsan Nazofarengeal Karsinom Hücreleri
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
COMET	Tek Hücre Jel Elektroforez
CUPRAC	Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite
CYP	Sitokrom
DCF-DA	2,7-Diklorodihidrofloresein Diasetat
DMEM	Dulbecco's Modification Eagles Medium
DMSO	Dimetil Sulfoksit
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
ELISA	Enzimle İşaretlenmiş
ET	Tek Elektron Transferi
EtBr	Etidiyum Bromür
FBS	Fetal Sığır Serum
FRAP	Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon Sistemi
GSPx	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutasyon S-Transferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
HaCat	İnsan Keratinosit Hücreleri
HAT	Hidrojen Atomu Transferi
HeLa	İnsan Servikal Kanser Hücreleri
HepG2	İnsan Karaciğer Kanser Hücreleri
HL-7702	İnsan Sağlıklı Karaciğer Hücreleri

HT-29	İnsan Kolon Kanseri Hücreleri
i.v.	İntravenöz
Jurkat	İnsan T Lenfosit Hücreleri
KAT	Katalaz
L929	Fare Fibroblast Hücreleri
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LMA	Düşük Erime Noktalı Agar
MCF-7	İnsan Meme Kanseri Hücreleri
MDA-MB-231	İnsan Metastatik Meme Kanseri Hücreleri
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-3,5-difenilformazan
Na <sub>2</sub> EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit Disodyum
NaOH	Sodyum Hidroksit
NMA	Normal Erime Noktalı Agar
NP	Nanopartikül
O <sub>2</sub>	Süperoksit
OH	Hidroksil
ORAC	Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
PBS	Fosfat Tamponlu Serum Saline
PC12	Sıçan Feokromositoma Hücreleri
Pg-p	P-Glikoprotein
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik Asit)
PMMA	Poli (metilmetakrilat)
PdI	Polidispersite İndeksi
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TRAP	Toplam Radikal Yakalama Antioksidan Kapasite
Vero	Maymun Böbrek Epitel Hücreleri

## 1. GİRİŞ

Bitkilerden elde edilen fitokimyasal bileşikler, sahip oldukları önemli terapötik etkileri nedeniyle uzun yıllardan beri kullanılmakta olup günümüzde de çok sayıda ilacın kaynağıdır. Özellikle yüksek bitkilerden izole edilen, tanımlanmış birincil ve ikincil metabolitler olmak üzere çok sayıda bitkisel kaynaklı kimyasal bileşik bulunmaktadır. Bu metabolitler arasında ikincil metabolitler, bitki savunma sisteminde görev almalarının yanında çok sayıda kronik hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde tek başına veya diğer ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır. Bu bileşikler bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler, fenolik asitleri, flavonoidleri, kumarinleri, tanenleri ve stilbenleri içerir [1].

Meyve ve sebzelerde bulunan doğal polifenolik bileşiklerden biri olan flavonoidler, fenolik bileşikler arasında biyolojik etkileri nedeniyle en çok rapor edilendir. Flavonoidler; antiinflamatuvar, antiviral, antioksidan ve antikanser etkilere sahip olduklarından bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır [2].

Greyfurt, portakal gibi turunçgillerde bol miktarda bulunan naringin, flavonoid yapısında bulunan antioksidan, lipit düşürücü, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikanser gibi çeşitli etkiler gösteren fitokimyasallardan biridir [3,4]. Naringinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini farklı hücreyel yollar ile baskıladığı bildirilmiştir [4].

Berberin, *Berberis vulgaris* ve *Hydrastis canadensis* dahil olmak üzere birçok farklı bitkiden izole edilen antibakteriyel, antiinflamatuvar, antidiyareik, antiviral, antioksidan, antikanser ve antiprotozoal gibi birçok farmakolojik aktiviteye sahip olan izokinolin alkaloididir [5,6].

Bu tez çalışması kapsamında fitokimyasal bileşiklerden naringin ve berberin maddeleri ile PMMA kaplı naringin ve berberin nanopartiküllerinin antioksidan özellikleri ile fare fibroblast (3T3) ve kolon kanseri (Caco-2) hücreleri üzerindeki olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Antioksidan özelliklerinin tayini için 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi; sitotoksitenin saptanabilmesi için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-3,5-difenilformazan (MTT) testi; genetik materyalde

olası hasarın belirlenmesi amacıyla ise tek hücre jel elektroforez (COMET) yöntemi kullanılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. BİTKİLERDE BULUNAN FİTOKİMYASAL BİLEŞİKLER

Fitokimyasal terimi, Yunanca bitki anlamına gelen “phyto” kelimesinden gelmektedir. Bitkilerden elde edilen bu fitokimyasal bileşikler, bitkinin rengine ve aromasına katkıda bulunurken bitkiyi hastalık ve zararlardan korur. Ayrıca makro ve mikro besinler ile kıyaslandığında insanlara sağlık açısından daha fazla yarar sağlayan doğal olarak oluşan bileşiklerdir [7]. Bu fitokimyasal bileşikler, sahip oldukları önemli terapötik etkiler nedeniyle uzun yıllardan beri kullanılmakta olup günümüzde de çok sayıda ilacın kaynağını oluşturur [1].

Fitokimyasal bileşikler; pigmentler, fenolik bileşikler, alkaloidler, glikozitler, steroidler, saponinler ve terpenoidler gibi çok çeşitli biyoaktif bileşikler içerir [2]. Özellikle yüksek bitkilerden izole edilen ve tanımlanmış birincil ve ikincil metabolitler olmak üzere 200.000’den fazla kimyasal madde vardır. Birincil metabolitler (yağ asidi, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi) hücre bakımı için gerekliyken, birincil metabolitlere göre çok daha çeşitli olan ikincil metabolitler bitki savunmasından sorumludur [8]. Ayrıca ikincil metabolitler, antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etki, detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu, bağışıklık sisteminin uyarılması, trombosit agregasyonunun azalması ve hormon metabolizmasının modülasyonu gibi birçok terapötik etkiye sahiptir [7]. Bu bileşikler kronik hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır [1].

Fitokimyasal bileşiklerin en büyük grubunu fenolik bileşikler oluşturmaktadır [9]. Fenolik bileşikler; bitkinin meyve, tohum, yaprak, gövde, kök vb. gibi kısımları dahil olmak üzere çok sayıda bitki dokusunda yaygın bir şekilde bulunan şikimik asit ve fenilpropanoid yolları yoluyla sentezlenen ikincil metabolitlerdir [10]. Tüm fenolik bileşikler, yapılarında en az bir hidroksil grubu bulunan aromatik halkaya sahiptir ve çok çeşitli molekül grupları içerir. Bitkilerde bu yapısal değişikliklerle ortaya çıkan 8000’den fazla fenolik bileşik bulunmaktadır [11]. Bu fenolik bileşikler, molekül yapısındaki fenol sayısına göre basit fenoller ve polifenoller olarak sınıflandırılabilir [12].

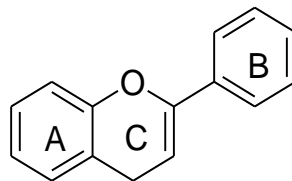
Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin miktarı, olgunluk derecesine, çeşide, iklime, toprak bileşimine, coğrafi konuma ve depolama koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir [13].

Fenolik bileşikler, hidrojen veya elektron veren bileşikler olarak indirgeme özelliklerine ve metal katalizli serbest radikal oluşumunu baskılayan metal şelasyon yeteneğine sahip olmaları nedeniyle antioksidan aktivite göstermektedir. Bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, yapılarında bulunan hidroksil gruplarının sayısı ve karboksil fonksiyonel gruplarının konumlarına göre değişiklik göstermektedir [8].

Fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklere sahip olmaları nedeniyle oksidatif stres kaynaklı metabolizma bozuklukları, obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalıkta etkinlikleri incelenmiştir [8]. Bu fitoterapötik bileşiklerin biyolojik etkilerinin reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından üretilen vücuttaki oksidatif stres üzerindeki etkileri nedeniyle kaynaklandığı bildirilmektedir [1].

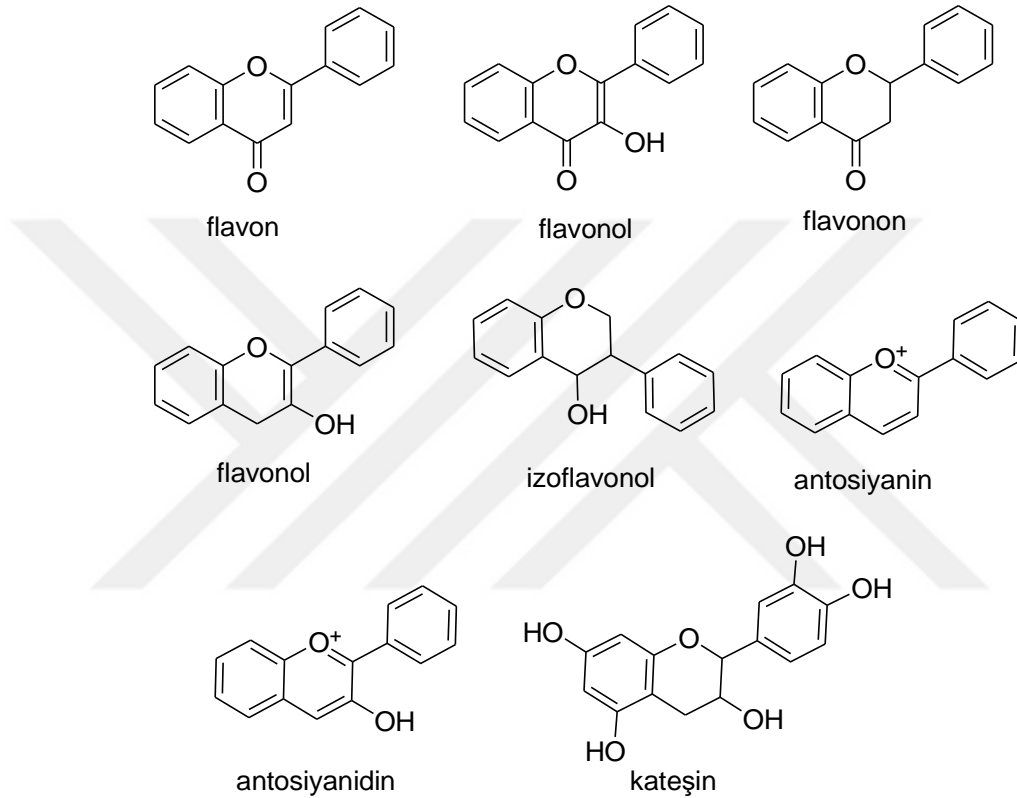
Bu fenolik bileşikler arasında, bitki dokularında yaygın olarak bulunan ve genellikle karotenoidler ve klorofillerle birlikte bitkilerde mavi, mor, sarı, turuncu, kırmızı renklerinden sorumlu olan ve en yaygın olarak rapor edilen polifenolik bileşik flavonoidlerdir [2,12]. Flavonoidler; antiinflamatuvar, antiviral, antioksidan ve antikanser etkilere sahip olması nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır [2].

Flavonoidler, heterosiklik bir piran halkası ile birleştirilmiş iki fenil halkasına (A ve B) sahip bir fenil benzopiran iskeleti (C) içermektedir (Şekil 2.1) [11]. Tüm flavonoidler aromatik amino asitler, fenilalanin ve tirozinden türetilmekte olup üç halkalı yapıya sahiptir [12]. Sahip oldukları fenil yapılarındaki hidroksilasyon ve metilasyon farklılıklarına dayanılarak sınıflandırılabilir [11].



**Şekil 2.1.** Flavonoidlerin temel yapısı (Fenilbenzopiran iskeleti).

Flavonoidler; flavonlar, flavonoller, izoflavonoller, antosiyaninler, antosiyanidinler, proantosiyanidinler ve kateşinleri içermektedir (Şekil 2.2) [12]. Flavonoidler, bir ya da daha fazla şeker molekülüne bağlı olduğunda flavonoid glikozitler; şeker molekülüne bağlı olmadıklarında ise aglikonlar olarak adlandırılmaktadır. Genellikle serbest bileşik halinden çok glikozit ve esterleri şeklinde bulunmaktadır [13].



**Şekil 2.2.** Başlıca fenolik bileşiklerin yapıları.

Alkaloidler, esas olarak yüksek bitkiler olmak üzere bitkiler aleminde geniş bir dağılıma sahip olan organik azot içeren ikincil metabolitlerden biridir [14]. Alkaloidler, bir azot atomu ve bir halka yapısı içeren bileşik grupları olup çoğunlukla nitrojen atomu heterosiklik halka yapısının içerisinde bulunur [15]. Alkaloidler kimyasal yapılarına göre; indoller, karbazoller, karbolinler, kinolinler, izokinolinler, piroller, piperidinler ve pürinler olmak üzere sınıflandırılabilir [16]. Alkaloidler, bitkilerden elde edilen bileşikler arasında en önemli aktif bileşenleri içeren bileşikler arasındadır. Bu bileşiklerden özellikle bilinen bir topoizomeras I inhibitörü olan kamptotesin ve tubulin ile etkileşime giren vinblastin gibi kemoterapötik ilaçlar bulunmaktadır. Antikanser

etkinliğinin yanında efedrinin astımda rahatlatıcı etkisi ve morfinin analjezik etkisi de alkaloidlerin önemli biyolojik aktivitelerindendir [15].

### **2.1.1. Bitkisel Fitokimyasal Bileşiklerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi ve Kullanım Yerleri**

Antik çağlardan beri insanların günlük ihtiyaçları ve gıda temini için bitkiler ana kaynağı oluşturmuştur. Kağıt yapımı, parfüm veya baharatların arıtılmasından altyapıya kadar çeşitli alanlarda kullanılmıştır [17]. Son yapılan çalışmalar, fitokimyasal bileşiklerin kanser, diyabet ve koroner kalp hastalığı gibi birçok kronik hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir [7].

Tıbbi bitkilerden elde edilen bileşikler önemli ilaç kaynaklarından biridir. Özellikle son yirmi yılda, bitkisel kaynaklı daha sık yeni terapötik ajanların kullanılması dikkat çekmektedir. Bitkisel bileşiklerin etkinliği ve güvenliği nedeniyle, son araştırmalar bitkisel kaynaklı biyoaktif bileşiklerin yararlı etkilerine, özellikle de antikanser etkinliklerine odaklanmıştır [4].

Bu fitokimyasallardan biri olan fenolik bileşikler, antioksidan aktiviteye sahip olmaları nedeniyle gıda endüstrisinde ve oksidatif stresten kaynaklanan hastalıkların önlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak çeşitli fenolik bileşiklerin yüksek dozlarda prooksidan özellikler gösterebileceği de öne sürülmektedir [18].

3000 yılı aşkın bir süredir kullanılan alkaloidler ise yılan sokması, ateş ve psikolojik rahatsızlıkların tedavisi gibi rahatsızlıklara karşı terapötik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca eski dönemlerde okları zehirlemek için kürar, akonitin ve tubokürarin gibi toksik alkaloidler kullanılmıştır. Günümüzde modern tıpta alkaloidler, çok çeşitli farmakolojik etkileri sebebiyle kullanılmaktadır. Bu amaçla 19. yüzyılda ilk keşfedilen alkaloid bileşiği morfin olup o zamandan beri kafein, koniin ve nikotin gibi birçok alkaloid keşfedilmiştir. Alkaloidlerin terapötik etkileri arasında; analjezik (morfin), antiastmatik (efedrin), antiaritmik (kinidin), antikanser (berberin), antihipertansif (reserpin), antipiretik (kinin),

antibakteriyel (siprofloksasin) ve antihiperglisemik (piperin) etkiler bulunur [14].

## 2.2. OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDANLAR

Oksijen, aerobik bir organizmanın hayatta kalması için hayati öneme sahip olmakla birlikte biyokimyasal süreçler sırasında serbest radikallerin oluşumuna da sebep olur [19]. Serbest radikaller, insan vücudunda doğal olarak oluşan bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkilerinin yanında istenmeyen olumsuz özellikleri bulunan eşlenmemiş elektron içeren (serbest elektron) reaktif bileşiklerdir [20,21]. Bu radikaller hücrelerde elektron kaybederek veya alarak oluşabildiğinden dolayı oksidan veya indirgeyici özellik gösterebilirler. Oksijen ve nitrojenin reaktif türevleri sırasıyla ROT ve reaktif nitrojen türleri (RNT) olarak adlandırılmaktadır [22].

Reaktif oksijen türleri (ROT); hücresel bileşenlere zarar veren, hücre nekrozuna neden olan ve nihayetinde biyokimyasal reaksiyon zincirlerini başlatarak hücre ölümüne yol açan serbest radikallerdir [19]. Eşlenmemiş elektronlar, bir serbest radikal üzerinde önemli derecede reaktivite sağlar [23]. Sahip oldukları reaktivite, oksijenin yüksek enerjili elektron transferine girerek oksidatif fosforilasyon ile büyük miktarlarda adenosin-5-trifosfat (ATP) oluşmasına sebep olur [24]. Bu durum ROT'un DNA, proteinler ve lipitler gibi makromoleküllerde "spesifik olmayan" hasara sebep olabilir [25]. Vücudumuzda oksidatif stresin sebep olduğu hasarı önlemek ve dengede tutmak amacıyla antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır [24]. Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki denge bozulması sonucunda oksidatif stres olarak bilinen durum ortaya çıkar [26,27].

### 2.2.1. Serbest Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT); ultraviyole (UV), X ve gama ışınları, metal kanalizli reaksiyonlar, inflamasyon sırasında nötrofiller ve makrofajlar tarafından üretililebilir veya mitokondriyal elektron taşıma reaksiyonlarında yan ürün olarak oluşabilir [23]. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit ( $\cdot O_2^-$ ) ve hidroksil (OH) gibi ROT, mitokondriyal

enerji üretimi veya hepatik detoksifikasyon gibi oksijen gerektiren temel metabolik süreçlerin yan ürünleridir [28].

Reaktif oksijen türleri (ROT), hem endojen hem de eksojen maddelerden üretilir. Potansiyel endojen kaynaklar arasında mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksisomlar ve inflamatuvar hücre aktivasyonu yer alır [23].

Oksidatif fosforilasyon sonucunda her zaman ROT oluşumu gözlenir. Birincil ROT, hem kompleks I hem de kompleks III tarafından oluşan  $\cdot\text{O}_2^-$  anyonudur. Çoğu  $\cdot\text{O}_2^-$  anyon, süperoksit dismutaz (SOD) tarafından  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye dönüştürüldükten sonra katalaz (KAT) veya peroksidaz enzimleri tarafından suya dönüştürülür [29]. Tüketilen oksijenin %10'dan çok daha azı, moleküler oksijen tek elektronlu ardışık yollarla indirgenerek  $\cdot\text{O}_2^-$  anyonuna dönüştürülür. Ardından iki protonun eşzamanlı olarak alınması ile bir elektronlu indirgeme gerçekleşir ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşur [30]. Mitokondrinin önemli miktarlarda  $\text{H}_2\text{O}_2$  ürettiği uzun zamandır bilinmektedir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  molekülü eşleşmemiş bir elektron içermez ve bu nedenle radikal bir tür değildir [23]. Ancak moleküler oksijenden kimyasal olarak daha aktif olduğu için ROT arasında kabul edilir [30]. Fizyolojik koşullar altında,  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretiminin organizma tarafından toplam oksijen alımının yaklaşık %2'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir [23].  $\text{H}_2\text{O}_2$  molekülü bir elektron daha alarak OH radikali ve anyonuna dönüşür. Son olarak OH radikali, bir elektron ve proton ile etkileşime girerek su molekülünün oluşumuna neden olur [30].

Reaktif oksijen türleri (ROT)'nin oluşturduğu zararlı etkilere karşı antioksidan sistemler savunma görevi görmektedir. Bu antioksidan sistemleri; ROT oluşumunu azaltarak, oluşmaları temizleyerek ve neden oldukları hasarı onararak etki göstermektedir [31].

### 2.2.2. Antioksidanlar

Antioksidan sistem, endojen ve eksojen moleküller içerir ve biyolojik sistemleri serbest radikal bileşiklerin toksisitesinden korur. Endojen antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Enzimatik antioksidanlar arasında SOD, KAT ve glutatyon sistemi

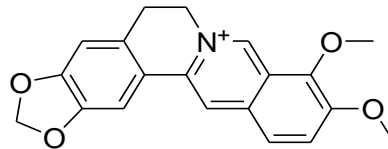
(GSH) bulunmaktadır [22]. GSH sistemi ise glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidazlar (GSPx) ve glutatyon S-transferazları (GST) içerir [25].

Enzimatik antioksidanlar, spesifik serbest radikalleri detoksifiye ederken enzimatik olmayan antioksidanlar veya besin kaynaklı antioksidanlar (örneğin, askorbik asit, E vitamini, karotenoidler, glutatyon vb.) spesifik değildir. Ancak enzimatik olmayan sistemler, serbest radikallere/ROT'a karşı ilk savunma mekanizmasını oluştururlar [19]. Bunun yanında, enzimatik antioksidanlar tüm ROT'u inaktive edemezler. Yüksek miktarda  $O_2^-$  anyonu, diğer moleküller ile etkileşime girerek RNT ve lipid radikalleri dahil olmak üzere ikincil radikallerin oluşmasına sebep olabilir [29].

## 2.3. BERBERİN

### 2.3.1. Genel Bilgiler

Alkaloidler, geleneksel ve modern tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bileşiklerden biri olan berberin (Şekil 2.3), *Berberis vulgaris*, *Hydrastis canadensis*, *Berberis aristata*, *Coptis chinensis*, *Coptis japonica*, *Phellondendron amurense* ve *Phellondendron chinense* Schneid gibi bitki türlerinin kökünden, rizomlarından, gövdesinden ve kabuğundan izole edilen bir izokinolin alkaloididir [32,33].



Şekil 2.3. Berberinin kimyasal yapısı.

### 2.3.2. Farmakokinetik Özellikleri

Oral berberin alımından sonra yüksek oranda metabolizma edilmesi ve düşük plazma konsantrasyonuna sahip olması nedeniyle berberin metabolitlerinin de farmakolojik etkilerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir [34]. Karaciğerde berberin birikimi ve P-glikoprotein (Pg-p) pompaları ile etkileşim, berberinin zayıf oral biyoyararlanım ve bağırsak absorpsiyonuna sahip olmasına neden olmaktadır [35]. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda,

berberinin oral biyoyararlanımının yaklaşık %0,36 olduğu bildirilmiştir [33,36,37].

Umut verici olumlu etkilerine rağmen zayıf farmakokinetik profili, zayıf suda çözünürlüğü ve fizyolojik ortamda uyumsuzluk gibi dezavantajlara sahiptir ve bu durum berberinin potansiyel bir ilaç olarak kullanımını sınırlamaktadır [6,35]. Berberinin biyoyararlanımının düşük olmasının nedeni, plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanması ve ilk geçiş eliminasyonuna uğramasıdır [38]. Berberinin intravenöz (i.v.) uygulaması, düşük ve homojen olmayan bir dağılıma ve hücre alımını sınırlandırarak hızlı ilaç klirensine, düşük tümör özgülüğüne ve yetersiz biyoyararlanıma yol açar [35]. Ayrıca paranteral uygulamaların potansiyel istenmeyen etkileri bulunmaktadır [39].

Berberinin düşük biyoyararlanımını artırmak ve istenmeyen etkilerini azaltmak amacıyla NP tabanlı yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir [38]. Yeni ilaç taşıyıcı sistemlerinin tasarımı sadece çözünürlük özelliklerinin iyileştirmekle kalmayıp, aynı zamanda tümörlerde etkili ilaç konsantrasyonunu artırmalı ve istenmeyen yan etkileri önlemek için normal dokularda ilaç birikimini azaltmalıdır [35]. Berberinin farmakokinetik özellikleri hakkında *in vivo* çalışmalar bulunmasına rağmen NP tabanlı berberin bileşiklerinin farmakokinetik özellikleri hakkında daha az çalışma mevcuttur [6].

Berberinin oral biyoyararlanımını artırmak için yapılan bir çalışmada, kitosan kaplı nano-lipozomal taşıyıcı sistemler tasarlanmıştır. Tasarlanan bu NP'ler serbest berberin ile karşılaştırıldığında, gastrointestinal sistemde daha iyi stabilite ve daha yavaş salınım göstermiştir. Ayrıca NP'nin tüm farmakokinetik analiz değerleri daha yüksek çıkmıştır. Bu bulgular, berberinin oral kullanımı için kitosan kaplı nano-lipozomların serbest berberinden daha verimli olduğunu ve berberinin biyoyararlanımını artıran umut verici sistemler olduğunu göstermiştir [39].

### **2.3.2. Farmakolojik Etkileri**

Berberin, antimikrobiyal, antidiyabetik, antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar, antidiyareik ve antiprotozoal etkiler gibi birçok terapötik etkiye sahiptir [5]. Berberin kanser tedavisinde kanser hücrelerinin çoğalmasını

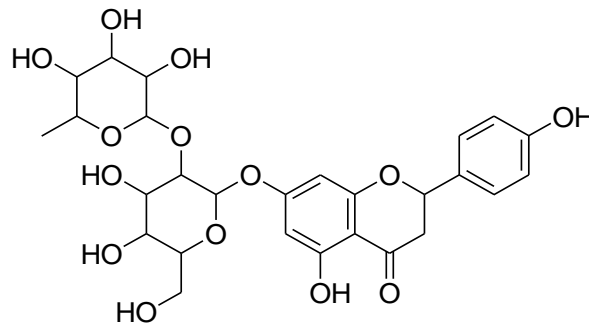
inhibe eden ve apoptozu indükleyen bir ajan olarak kullanılmaktadır [35]. Yapılan çalışmalarda berberinin antikanser aktivitesinin; aktivatör protein-1'in aktivitesini azaltmak, kaspaz bağımlı apoptotik yolu aktive etmek ve apoptoza yol açan veya hücre büyümesini inhibe eden proteolizi arttırmak gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir [5,40–42].

## 2.4. NARİNGİN

### 2.4.1. Genel Bilgiler

Naringin (4',5,7-trihidroksiflavanon 7-ramnoglukozid) (Şekil 2.4), greyfurt (*Citrus paradisi*) gibi *Citrus* türlerinde bol miktarda bulunan bir flavanon glikozittir [43,44]. Gıda endüstrisinde yiyecek ve içeceklerde doğal pigmentler ve acılaştırıcı maddeler olarak bulunmanın yanında yüksek tatlılığa sahip olması nedeniyle tatlandırıcıların sentezi için bir öncü malzeme olarak da kullanımı da bulunmaktadır [45].

Naringini biyosentezleyebilmek için en temel yol, yedi enzim katalizli fenilpropanoid yoludur. Fenilpropanoid yolu, şikimik asit yolunun son ürünü aromatik bir aminoasit olan fenilalanindir [46]. Ayrıca bu yol; flavonoidler, tanenler ve ligninler için değişen çeşitli son ürünlere yol açmaktadır [47].

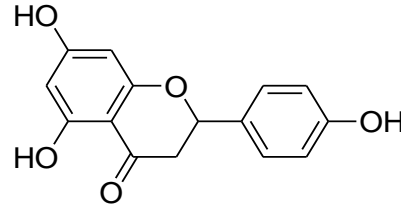


Şekil 2.4. Naringin kimyasal yapısı.

### 2.4.2. Farmakokinetik Özellikleri

Naringin oral yolla alındığı zaman başlıca metaboliti olan naringenine (Şekil 2.5) hidroliz olur [18]. Naringenin kısmen absorbe olarak faz I ve faz II reaksiyonları ile glukuronit ve sülfat metabolitlerine metabolize olur. Yapılan

bir çalışmada, naringenin narenciye suyu alımını takiben insan plazmasında yetersiz konsantrasyonlarda tespit edilirken, alınan miktarla bağlantılı olarak insan idrarında farklı konsantrasyonlarda birincil metabolitleri tespit edilmiştir [48]. Naringin ve naringenin sitokrom (CYP) enzimlerini inhibe ettiği öne sürülmektedir [18].



Şekil 2.5. Naringenin kimyasal yapısı.

### 2.4.3. Farmakolojik Etkileri

Yapılan çalışmalarda naringenin birçok sinyal yolunu modüle ettiği ve bu sebepten dolayı çeşitli terapötik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [49]. Antioksidan, lipit düşürücü, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikanser gibi terapötik etkileri nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [3]. Naringenin birçok patolojik bozukluğa karşı koruyucu olmasının antioksidan özellik göstermesinden kaynaklandığı iddia edilmektedir [18]. Naringenin etkili olduğu hastalıklar arasında karaciğer hasarı, nörolojik bozukluklar, bilişsel işlev bozukluğu, kemik bozuklukları, metabolik sendrom, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve solunum yolu hastalıkları sayılabilir [43].

Naringenin *in vitro* olarak serbest radikaller üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir [50]. Birçok çalışma, naringenin hem *in vitro* hem de *in vivo* testlerde farklı hücresel yollarla çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini bastırdığı ve ayrıca farklı kanser hücrelerinde çeşitli apoptotik ve proapoptotik yolları aktive ettiğini ortaya koymuştur [4].

## 2.5. NANOPARTİKÜL BAZLI SİSTEMLER

Kanser, yılda 10 milyondan fazla ölüm prevalansı ile dünyada önemli ölüm nedenlerinden biridir. Kanser tedavisinde yararlanılan tedaviler (cerrahi, radyasyon ve kemoterapötik ilaçlar) genellikle sağlıklı hücreleri öldüren ve hastalarda toksisite ile sonuçlanan tedavilerdir [51]. İstenmeyen etkiler ve

tedaviye direnç geliştirme olasılığı yeni tedavi seçenekleri geliştirmesini önemli kılar [52].

Nanopartikül (NP) bazlı sistemler, kanser veya kanser aracılı hastalıkların etkili tedavisi için potansiyel ilaç taşıyıcıları olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Geleneksel kemoterapi ile karşılaştırıldığında NP bazlı kemoterapi, stabilite, özgüllük, ilaç yükleme yeteneğinde artma, kontrollü ilaç salınımlarında gelişme, hidrofobik ve hidrofilik biyoaktif bileşikler verme olanağı gibi önemli avantajlara sahiptir [53]. Terapötik uygulamalar dışında biyobelirteç tespiti ve kanser teşhisi için de kullanılmaktadır [53–55].

Nanopartikül (NP) bazlı sistemler ilaç çözünürlüğünü, stabilitesini, ilaç salımını ve spesifik taşınmayı artırmak ve ilaç toksisitesini azaltmak amacıyla tercih edilmektedir. Polimer seçimi, NP performansında ve biyolojik aktivitede önemli bir rol oynar. İleri farmasötik teknoloji ile üretilen NP'ler, ilacın yarı ömrünü artırabilmektedir [56]. NP'ler, hem pasif hem de aktif hedefleme mekanizmaları ile tümör bölgelerinde özel olarak birikim sağlayarak kullanılan ilaç dozunu düşürür ve sistemik toksik etkileri azaltır [35].

Nanopartiküllerle (NP'lerle) yapılan *in vitro* çalışmalar, genellikle mekanizmaları araştırmak ve hücresel etkilerin altında yatan moleküler olayları daha iyi anlamak için kullanılan partikül toksikolojisinin önemli bir unsurudur [57]. Partikül toksikolojisinin yeni bir alt dalı olan nanotoksikolojide *in vitro* çalışmalar, *in vivo* hayvan çalışmalarına göre maliyeti daha uygun, tekrarlanabilir ve basittir [58]. Bu nedenle, son yıllarda yapılan çalışmalarda *in vitro* yaklaşımlar tercih edilmektedir.

Polimerik NP'ler, doğal veya sentetik yapıda olsa dahi organizma tarafından alınımının iyi olması ilaç taşıyıcı sistemler için umut vericidir [59]. Polimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemleri, diğer NP taşıyıcı sistemlerden daha kararludur ve uygun salım profilleri ve yüzey işlevselleştirme gibi istenen özellikleri elde etmek için kolayca düzenlenebilir ve ayarlanabilir. Son çalışmalar polimerik NP'lerin yüzey işlevselleştirmesinin hedeflenen ilaç dağıtımını iyileştirebileceğini, hücresel alımı artırabileceğini, daha yüksek terapötik aktiviteyi sağlayabileceğini ve antikanser ilaçların istenmeyen etkilerini azaltabileceğini ortaya koymaktadır [60–62]. Bu nedenle 100 ile 1000

nm arasında değişen boyutlardaki polimerlere dayalı olarak nanoparçacıklar geliştirilmektedir.

Poli-metil metakrilat (PMMA), ilaç dağıtım uygulamalarında yaygın olarak kullanılan biyouyumlu bir polimerdir. Bu polimerik malzeme, kimyasal hidrolize direnç, birçok ilaç için yüksek geçirgenlik, düşük toksisite gibi birçok önemli özelliğe sahiptir [63]. PMMA'nın partikül boyutları 1 µm'nin altında olduğundan dolayı güvenlik değerlendirmeleri nano-güvenlik yaklaşımlarını içermeli ve toksikolojik verileri yorumlarken temel fizikokimyasal özellikler dikkate alınmalıdır.

Poli-metil metakrilat (PMMA) NP'lerinin maddeler ile yüklenmesi sonucu oluşan bileşimindeki değişikliklerin spesifik yüzey özelliklerini etkileyebileceği; bu nedenle öngörülemeyen biyolojik etkileşim ve etkileri de tetikleyebileceği kabul edilmiştir. Örneğin, NP'ler üzerindeki pozitif bir yüzey yükü, nötr veya negatif yüklü olanlara kıyasla sitotoksisiteyi ve genotoksisiteyi arttırabilmektedir. Yükün yanında, yüzey hidrofobikliği de sitotoksik ve genotoksik radikaller olarak bilinen ROT oluşumu gibi faktörleri etkileyebileceğinden NP'lerin toksisitesi için bir risk faktörü olarak belirtilir [64]. PMMA NP'leri, çoğunlukla hidrofobik olan antikanser ilaçları kaplayabilmesi nedeniyle kanser tedavisinde ilaç dağılımı için toksik olmayan nanotaşıyıcılar olarak literatürde geniş bir yer kaplamaktadır [65].

Bazı *in vitro* çalışmalarda PMMA NP'lerinin önemli toksik etkisi bildirilmemiştir [58,66–68]. Ayrıca insan T lenfosit hücreleri (Jurkat) ve fare fibroblast (L929) hücrelerinde COMET yöntemi ile PMMA NP'lerinin genotoksik etkisi bulunmamıştır [64,69]. NP'lerin toksisitesinin birincil mekanizması, çeşitli hücresele bileşenlerin işlevini bozabilen ve hücrede oksidatif strese neden olan ROT oluşumudur [64]. PMMA NP'lerine kısa süre (1 ve 2 saat) maruziyetten sonra ROT oluşumunu 2,7-diklorodihidrofloresein diasetat (DCF-DA) yöntemi ile analiz edilmiş ve hücre içi ROT oluşumunda herhangi bir artış tespit etmemiştir. Hali hazırda biyomedikal uygulamalarda iyi bir toksikolojik güvenlik kaydına sahip olduğuna için PMMA'nın toksik olmayan bir polimer olduğuna genel olarak kabul edilmektedir. Ancak bu polimerik taşıyıcının başarılı bir ilaç dağıtım sistemi tam anlamıyla kliniğe ulaşmamıştır [63]. Bu

bakımdan antikanser etkinliğe sahip bitkisel etken maddeler ile yüklü PMMA nanotaşıyıcıların olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin irdelenmesi gerekmektedir.

Nanosistemler, geleneksel kemoterapi ilaçlarının yanında berberin ve naringin gibi bitkisel kaynaklı antikanser özellikli bileşiklerin kullanılmasını da sağlamaktadır. Antikanser etkileri dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkiye sahip olan berberin ve naringin, düşük oral biyoyararlanıma sahip olması ve parenteral yan etkiler gibi birçok dezavantaja sahiptir [70].

Nanotaşıyıcı sistemler ilaçların çözünürlük problemlerini iyileştirmekle kalmayıp, aynı zamanda tümörlerde etkili ilaç konsantrasyonunu artırmalı ve istenmeyen yan etkileri önlemek için normal dokularda ilaç birikimini azaltmalıdır. Bu amaçla, antikanser bileşiklerden olan berberin ve naringinin terapötik etkilerini iyileştirmek için NP tabanlı ilaç uygulama sistemleri tasarlanabilir [35].

Nanotaşıyıcıların sitotoksitesinin incelendiği bir çalışmada naringin yüklü lipozomların sitotoksitesi sağlıklı 3T3 hücrelerinde incelenmiştir. Yöntem sonunda hücre canlılığının kontrol grubuna oranla benzer olduğu ve düşük toksisite gösterdiği bulunmuştur [71].

Üç farklı flavonoidin (hesperidin, naringin ve diosmin) kullanıldığı bir çalışmada ise yüklü gümüş NP'lerin sitotoksitesi, insan promiyelositik lösemik (HL-60) hücreleri üzerinde incelenmiştir. Naringin kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin daha yüksek stabilite ve sitotoksik aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Böylece naringin yüklü NP'lerin, lösemik hücrelerinde seçici sitotoksitesi nedeniyle kanser tedavisinde potansiyel ilaç olarak kullanılabilmesinin önemli olduğu belirtilmiştir [72]. Yine kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada naringenin ve naringin yüklü lipozomların sitotoksitesi insan kolon kanseri (HT-29) hücrelerinde incelenmiştir. Ayrıca Annexin V yöntemi ile apoptoz üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlar hem naringenin hem de naringinin lipozomlarının sitotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir. Ayrıca naringenin NP'lerin apoptotik hücre popülasyonunu önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur [73].

Nanopartikül (NP) bazlı güneş koruyucu kremlerin sitotoksitesinin araştırıldığı bir çalışmada naringin yüklü etozomal güneş koruyucu kremlerinin sitotoksik etkileri insan keratinosit hücrelerinde (HaCaT) değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre hem naringin hem de naringin etozomlarının uygulandığı hücrelerde 48 saatlik maruziyet sonucunda hücre canlılığının yaklaşık %87 olduğu saptanmıştır. Bu durum hem naringin hem de etozomların HaCaT hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir [3].

Berberin NP'lerin sitotoksitesinin araştırıldığı bir çalışmada, berberin ve berberin yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) NP'lerin etkileri insan servikal kanser (HeLa) ve insan meme kanseri (MCF-7) kanser hücrelerinde incelenmiş ve kanser hücrelerinde yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir [74]. Berberin yüklü kitosan NP'lerinin kullanıldığı bir çalışmada NP'lerin insan nazofarengeal karsinom (CNE-1) hücrelerinde sitotoksitesi ve apoptoz etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda NP'lerin CNE-1 hücrelerinin çoğalmasını ve canlılığını önemli ölçüde engellediği; hücre apoptozunu ve nekrozunu indüklediği bulunmuştur [75]. Başka bir çalışmada ise berberin yüklü altın NP'lerin sitotoksitesi maymun böbrek epitel hücreleri (Vero) ve HeLa hücrelerinde incelenmiş ve çalışma sonucunda NP'lerin sağlıklı Vero hücrelerine karşı sitotoksitesi, HeLa hücrelerine göre daha düşük bulunmuştur. Ayrıca NP'ler serbest berberin ile karşılaştığında toksitesi Vero hücrelerinde daha az, HeLa hücrelerinde ise neredeyse aynı olduğu bulunmuştur [76]. Bu durum, NP yapılarının biyouyumluluğunu göstermektedir.

Berberin yüklü grafen NP'lerin toksitesinin sağlıklı ve kanser hücrelerinde incelendiği farklı bir çalışmada, berberin NP'lerinin HeLa ve insan metastatik meme kanser (MDA-MB-231) hücrelerine karşı sitotoksik etkiler sergilediği, ancak L929 sağlıklı hücrelere karşı sitotoksik olmadığı gösterilmiştir [77]. Berberin yüklü silika NP'lerin insan karaciğer kanseri (HepG2) ile insan sağlıklı karaciğer hücrelerine (HL-7702) karşı sitotoksitesinin değerlendirildiği çalışmada serbest berberin ve NP'lerinin her iki hücre hattında da hücre inhibisyonunun doza bağlı davranışlar sergilediği gösterilmiştir. NP'ler, serbest berberin ile kıyaslandığında daha fazla HepG2 hücrelerinin ölümüne neden olurken, sağlıklı HL-7702 hücrelerinde aynı konsantrasyonlarda daha az hücre ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir [78]. Yine yapılan benzer bir

çalışmada berberin yüklü karbon NP'lerin sağlıklı HL-7702 hücreleri ile insan karaciğeri, akciğer ve göğüs kanseri hücrelerinde sitotoksitesisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda berberin NP'lerinin doza bağlı olarak sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücrelerine daha sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [79]. Yapılan her iki çalışmada da NP'lerin kanser hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir.

Hem berberin ve hem naringin yüklü kitosan NP'lerin sitotoksitesisinin araştırıldığı bir çalışmada ise sitotoksikite sıçan feokromositoma hücreleri (PC12) kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonunda hem berberin hem de naringin yüklü NP'lerin sitotoksik etkisinin olmadığını belirtilmiştir [80].

Naringin ve berberin NP'leri ile yapılan çalışmalara ait sonuçların özeti Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Naringin ve berberinin nanomateryal tabanlı bazı *in vitro* çalışmaları.

Bileşik	Nanopartikül tipi	Hücre hattı	Çalışma sonucu
Naringin	Lipozom	3T3	NP'lerin düşük toksisiteye sahip olduğu görülmüştür [71].
	Gümüş NP'ler	HL-60	NP'ler kanser hücrelerinde seçici sitotoksikite göstermiştir [81].
	Etozom	HaCaT	NP'lerin sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığını bulunmuştur [3].
	Lipozom	HT-29	NP'lerin sitotoksik etkisinin olmadığını bulunmuştur [73].
	Kitosan	PC12	NP'lerin sitotoksik etki göstermediği görülmüştür [80].
Berberin	Gümüş	MDA-MB-231	NP'lerin kanser hücrelerinde sağlıklı hücreler ile kıyaslandığında daha sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [82].
	PLGA	HeLa, MCF-7	NP'lerin kanser hücrelerinde yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu bulunmuştur [74].
	Karbon noktalar	HepG2, HL-7702	NP'lerin kanser hücrelerinde sağlıklı hücreler ile kıyaslandığında daha sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [79].
	Grafen	HeLa, MDA-MB-231, L929	NP'lerinin kanser hücrelerine karşı sitotoksik, sağlıklı hücrelere karşı

			sitotoksik olmadığı gösterilmiştir [77].
	Altın	Vero, HeLa	NP'ler, serbest bileşiğe göre sağlıklı hücrelerde daha az sitotoksik etki göstermiştir [76].
	Gözenekli silika	HepG2	NP'lerin kanser hücrelerinde sağlıklı hücreler ile kıyaslandığında daha sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [78].
	Kitosan	CNE-1	NP'lerin kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [75].

## 2.6. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN YÖNTEMLER

### 2.6.1. Antioksidan Kapasite Tayini

Antioksidan bileşiklerin etkinliği, yapısal özellikler, konsantrasyon, sıcaklık, oksidasyon substratının tipi, sistemin fiziksel durumu, pro-oksidanların ve sinerjistlerin varlığı gibi birçok faktöre bağlıdır. Ayrıca bir antioksidanın kimyasal yapısı, onun serbest radikallere ve diğer ROT'a karşı içsel reaktivitesini etkileyerek antioksidan aktivitesinin belirlenmesini sağlar [83].

Günümüzde antioksidan aktivite tayini yapabilmek amacıyla birçok *in vitro* yöntem kullanılmaktadır (Çizelge 2.2). Bu yöntemler, temelde hidrojen atomu transferi (HAT) ve tek elektron transferi (ET) reaksiyonlarına dayanmaktadır. HAT ve ET tabanlı testler, bir numunenin radikal (veya oksidan) temizleme kapasitesini ölçmeyi amaçlar [84]. Bu testler arasında bulunan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü tayin yöntemi, stabilitesi ve uygulama kolaylığı nedeniyle bitki ekstraktları, gıdalar gibi birçok bileşiğin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir [85].

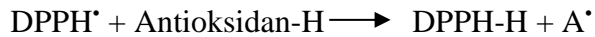
**Çizelge 2.2.** Antioksidan aktivite tayin yöntemleri.

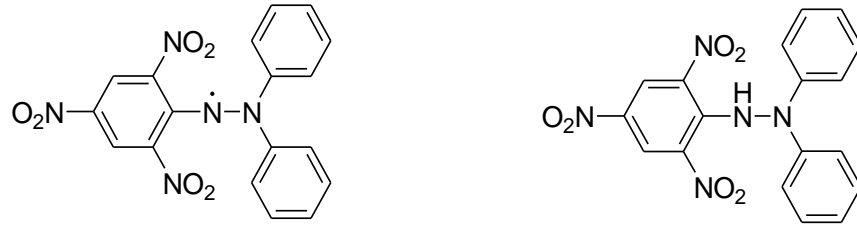
<b>Hidrojen atomu transferi (HAT) esaslı analiz yöntemleri</b>	<b>Tek elektron transferi (ET) esaslı analiz yöntemleri</b>
Oksijen radikal absorbands kapasitesi (ORAC) yöntemi	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivite yöntemi
Toplam radikal yakalama antioksidan kapasite (TRAP) tayin yöntemi	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) tayin yöntemi
	Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi
	Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) tayini

### **1. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi:**

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi, bir antioksidan molekülün serbest radikal süpürme potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan standart ve uygulaması kolay kolorimetrik bir yöntemdir [86]. Gıdalar, içecekler, substratlar gibi birçok bileşiğin radikal temizleme aktivitesinin belirlenmesi için çok çeşitli DPPH radikal süpürme kapasitesi yöntemleri geliştirilmiştir [87]. Bu DPPH yöntemlerin temeli, Blois (1958) ve Brand-Williams vd. (1995) tarafından geliştirilen yöntemlere dayanmaktadır [87–89].

Bu yöntem, kararlı ve sentetik bir radikal olan mor renkli DPPH'ın antioksidan bileşiklerden bir hidrojen atomu alıp DPPH<sub>2</sub>'ye indirgenerek renginin solması esasına dayanır (Şekil 2.6 ve 2.7) [86]. Bu renk değişimi, 515-520 nm'de spektrofotometrik olarak izlenerek antioksidan molekülün serbest radikal süpürme kapasitesinin tayin edilmesine olanak tanır [90].

**Şekil 2.6.** Antioksidan-DPPH radikali reaksiyon mekanizması.



Şekil 2.7. DPPH radikali ve kararlı formu.

### 2.6.2. Sitotoksosite Tayini

Sitotoksosite, kimyasal bir maddenin hücresel aktivitede veya ölümlerle sonuçlanan süreçlerde değişikliklere neden olma potansiyelidir [91]. İlk *in vitro* biyoanaliz yöntemlerinden biri olan sitotoksosite testleri, maddelerin çeşitli dokulara toksisitesini tahmin etmek ve güvenlik değerlendirmesi amacıyla kullanılan testlerdir [92].

Hücre kültüründe hücre canlılığı ve proliferasyonunu incelemek amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir [93]. Bu yöntemler genel olarak membran geçirgenlik, kolorimetrik, florometrik ve luminometrik analizler olarak sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.3) [94]. Bunlar arasında 96 kuyucuklu mikropalakaların kullanıldığı testler, birçok numunenin hızlı ve aynı anda analiz edilmesine olanak sağlar. Kolorimetrik ve luminometrik analizler, numunelerin bir mikropalaka okuyucu veya enzimle işaretlenmiş (ELISA) plaka okuyucusu kullanılarak plakada doğrudan ölçülerek sağlanmaktadır [95]. Bu yöntemlere tetrazolyum tuzlarının kullanıldığı testler, alamar mavisi yöntemi, proteaz aktivite testi ve ATP testi örnek olarak verilebilir. Bu yöntemler, canlı hücrelerde bir substratın bir reaktif ile renkli veya floresan özellikli bir ürüne dönüşmesi ve bu ürünlerin bir mikropalaka okuyucu ile tespit edilmesine dayanır. Yöntemler, standart hücre kültürü koşulları altında, oluşan ürün mevcut canlı hücrelerin sayısı ile orantılı bir sinyal üretilmesiyle sonuçlanır [96].

Sitotoksosite veya hücre canlılığının saptanması için laktat dehidrogenaz (LDH) testi, nötral kırmızı alım testi ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) testleri en yaygın kullanılan testlerdir [97].

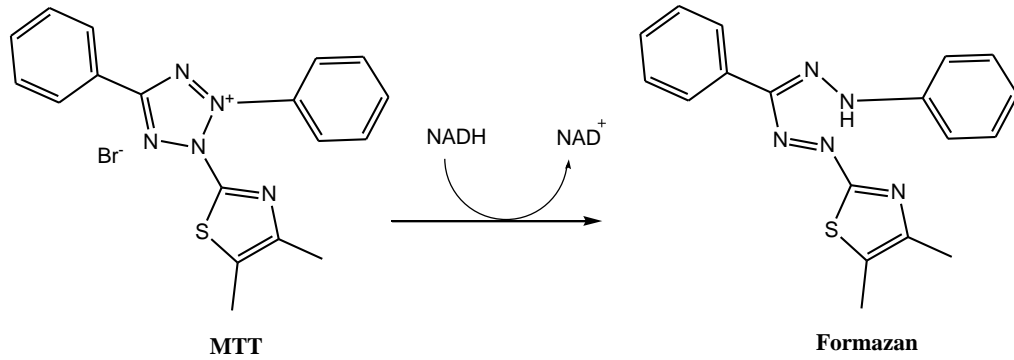
**Çizelge 2.3.** Sitotoksosite tayin yöntemleri [94].

<b>Membran geçirgenlik analizleri</b>	<b>Kolorimetrik analizler</b>	<b>Florometrik analizler</b>	<b>Luminometrik analizler</b>
Tripan mavisi testi	Nötral kırmızısı	Alamar mavisi testi	ATP testi
Eozin testi	alımı testi		Gerçek zamanlı
Kongo kırmızısı testi	Kristal viyole testi	CFDAAM testi	canlılık
Eritrosin B testi	MTT testi		belirleme
	MTS testi		yöntemleri
	XTT testi		
	LDH testi		
	WST 1/WST 8 testi		

### **1. 3-(4,5-dimetil-tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) testi:**

3-(4,5-dimetil-tiyazolil-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi, hücre canlılığını ölçmek ve sitotoksositeyi belirlemek amacıyla kullanılan kolorimetrik yöntemlerden biridir [98]. İlk olarak memeli hücre hatlarının sitotoksik bileşiklere olan maruziyetini değerlendirmek amacıyla Mosmann (1983) tarafından yapılmıştır [99]. Daha sonra yöntemdeki teknik sorunları çözebilmek, testin tekrarlanabilirliğini ve duyarlılığını geliştirmek amacıyla ilk protokol geliştirilmiştir [100,101].

Kolorimetrik yöntemlerde, canlı hücre aktivitesi önemli bir parametredir. MTT gibi yöntemlerde kullanılan tetrazolyum tuzları metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenir (Şekil 2.8) [95]. MTT yönteminde, canlı hücreler tarafından kolayca alınan ve mitokondriyal dehidrogenazların etkisiyle indirgenen suda çözünür sarı MTT boyası kullanılır [102]. Yöntem, canlı hücrelerde MTT boyasının enzimatik olarak indirgenmesi ile oluşan mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmesine dayanır [103]. Oluşan formazan ürünleri dimetil sülfoksit (DMSO) veya izopropanol gibi organik bir çözücü içinde çözüldükten sonra kolorimetrik analiz yapılır [104].



**Şekil 2.8.** Canlı hücrelerde MTT'nin formazan kristaline dönüşümü [96].

### 2.6.3. Genotoksisite Tayini

#### 1. Tek hücre jel elektroforez (COMET) yöntemi:

Tek hücre jel elektroforez (COMET) yöntemi; kimyasal maddeler, radyasyon, nanomateryaller gibi birçok eksojen ve endojen ajanların neden olduğu DNA hasarını hücre düzeyinde ölçmek için kullanılan hem *in vivo* hem de *in vitro* uygulanan bir yöntemdir [105]. COMET yöntemi; DNA hasarı ve onarımı araştırmaları, yeni kimyasalların ve farmasötiklerin genotoksisite testleri, çevresel biyolojik ve insan popülasyonunun izlenmesi gibi çok sayıda alanda kullanılmaktadır [106,107]. Bu yöntem, diğer genotoksisite yöntemlerinin aksine hücre bölünmesine gerek kalmadan DNA hasarını basit ve kantitatif olarak analiz edebilir [108]. Ayrıca düşük düzeyde DNA hasarını bile hassas bir şekilde tespit edebilme, numune başına az sayıda hücre kullanılması, uygulama kolaylığı, düşük maliyet ve kısa sürede deneyin tamamlanması gibi birçok avantaja sahiptir [109].

Tek hücre jel elektroforez (COMET) yöntemi, nötr ve alkali tek hücre jel elektroforez olmak üzere iki farklı şekilde yapılabilir. Nötr yöntemde sadece DNA'daki çift sarmal kırıklarının saptanabilirken alkali yöntemde ise hem tek hem çift sarmal kırıklarının tespit edilebilir [110].

DNA hasarını değerlendirmek amacıyla yöntem ilk kez Östling ve Johanson (1984) tarafından geliştirildi [111]. Bir mikroskop lamı üzerinde agaroz jel içinde gömülü ve parçalanmış hücrelerin elektroforezine

dayanmaktadır. Bu yöntemde lizis ve elektroforez işlemi pH 9,5'te gerçekleştirildiğinden dolayı DNA ipliklerinin ayrılmadığı gözlenmiştir [112].

Alkali kuyruklu yıldız yöntemi, elektroforez ile bir mikroskop lamı üzerinde ince bir agaroz jel içinde süspende edilen az sayıda hücre içerisindeki parçalanmış DNA'nın sağlam DNA'ya kıyasla daha hızlı göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü oluşturması esasına dayanır [113]. Yöntem temel olarak şu aşamalardan oluşmaktadır [114]:

- Hücre materyalinin hazırlanması
- Mikroskop lamlarının hazırlanması
- Lizis
- Alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması
- Elektroforez
- Nötralizasyon
- DNA'nın boyanması ve floresan mikroskop altında görüntülenmesi
- Comet sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi

Son yıllarda nano boyutlu malzemelerin üretimi ve kullanımının artması dolayısı ile insanların bu malzemelere maruziyeti artış göstermiştir. Nanomalzemelerin genotoksitesisi; kimyasal bileşimi, şekil, spesifik yüzey alanı, boyut, boyut dağılımı ve zeta potansiyeli gibi birçok faktörden etkilenebilir. Tek hücre jel elektroforez testi sağlamlığı, çok yönlülüğü ve güvenilirliği gibi birçok avantaja sahip olması nedeniyle nanogenotoksikoloji alanında en çok kullanılan yöntemlerden biridir [115].

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT)	Biomatik
Dimetil sulfoksit (DMSO)	İsolab Chemicals
Fosfat Tamponlu Serum Saline (PBS)	Multicell
Düşük Erime Noktalı Agar (LMA)	Sigma-Aldrich
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Aldrich Chemistry
Dulbecco's Modification Eagles Medium (DMEM)	Multicell
Etidiyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
Etil Alkol (Etanol)	Isolab
Etilendiamin Tetraasetik Asit Disodyum (Na <sub>2</sub> EDTA)	Sigma-Aldrich
Fetal Sığır Serum (FBS)	Capricorn Scientific
Hidrojen Peroksit (%30)	Sigma-Aldrich
Metil Alkol (Metanol)	Sigma-Aldrich
Naringin	Sigma-Aldrich
N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu	Sigma-Aldrich
Normal Erime Noktalı Agar (NMA)	Sigma-Aldrich
Penisilin/Streptomisin	Capricorn Scientific
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Tripan Mavisi	Biological Industries
Tripsin-EDTA	Biological Industries
Tris-BASE	ChemCruz
Triton X-100	Ambresco

### 3.2. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

24 ve 96 Kuyucuklu Plaklar	Costar
Buzdolabı	Bosch
Cam pastör pipet	Isolab
Comet Bilgisayar Yazılımı 4.0	Leica
Derin Dondurucu (-80°C)	Haier Biomedical
Derin Dondurucu (-20°C)	Bosch
Distile Su Cihazı	Purelab
Elektroforez	Cleaver Scientific
Elektroforez Güç Kaynağı	Cleaver Scientific nanoPac-300P
ELISA Okuyucu	Biotek Instruments, Inc- EPOCH
Hassas Terazı	Uni Bloc ATX224R
Mikroskop	Leica
Karbondioksit (CO <sub>2</sub> ) İnkübatörü	Sanyo
Lam (26x76 mm)	Marienfeld
Lamel (24x60 mm)	Marienfeld
Laminar Kabin	Bilser
Mikropipetler	Acura 825
pH Metre	InoLab pH7310
Santrifüj cihazı	Nuve NF 1200R
Sayım Lamı (Neubauer Improved)	Marienfeld
Sekiz Kanallı Mikropipet (50-300 µl)	Isolab
Steril Pipetler (5 ve 10 ml'lik)	Abdos
Steril Santrifüj Tüpleri	Fischerbrand
Su Banyosu	Microtest WB-15
Terazi	Mettler AT201
Ultrasonik Banyo	Alex Machine
Vorteks	Velp Scientifica
Yatay Hücre Kültürü Şişesi	SPL Life Sciences

### 3.3. HAZIRLANAN ÇÖZELTİLER

#### 3.3.1. Çalışılan Bitkisel Çözeltiler

##### 1. Berberin Çözeltileri:

29,025 mg berberin 5 mL %70'lik metanol çözeltisinde çözülerek 10 mM berberin stok çözeltisi DPPH yönteminde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti metanol ile seyreltilerek 25, 50, 200, 500, 1000 ve 2000  $\mu$ M konsantrasyonda berberin çözeltileri taze olarak hazırlandı.

580,5 mg berberin 5 mL besiyerinde çözülerek 200 mM berberin stok çözeltisi MTT yöntemlerinde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100  $\mu$ M konsantrasyonda berberin çözeltileri taze olarak hazırlandı.

116,1 mg berberin 1 mL besiyerinde çözülerek 200 mM berberin stok çözeltisi COMET yönteminde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 5, 10, 25 ve 50  $\mu$ M konsantrasyonda berberin çözeltileri taze olarak hazırlandı.

##### 2. Naringin Çözeltileri:

29,025 mg naringin, 5 mL metanolde çözülerek 10 mM naringin stok çözeltisi DPPH yönteminde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti metanol ile seyreltilerek 25, 50, 200, 500, 1000 ve 2000  $\mu$ M konsantrasyonda naringin çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler taze hazırlandı.

580,5 mg naringin, 500  $\mu$ L DMSO ve 4500  $\mu$ L su karışımında (%1 DMSO) çözülerek 200 mM naringin stok çözeltisi MTT yöntemlerinde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000  $\mu$ M konsantrasyonda naringin çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler taze hazırlandı.

580,5 mg naringin, 500  $\mu$ L DMSO ve 4500  $\mu$ L su karışımında (%1 DMSO) çözülerek 200 mM naringin stok çözeltisi COMET yönteminde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti besiyeri ile seyreltilerek 50, 100, 250 ve 500  $\mu$ M konsantrasyonda naringin çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler taze hazırlandı.

### **3. Berberin PMMA Nanopartikül Çözeltileri:**

0,3728 mg berberin PMMA nanopartikülleri, 56 mL besiyerinde süspande edilerek 100 µM stok çözeltisi DPPH yönteminde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonda çözeltileri taze olarak hazırlandı.

0,3728 mg berberin PMMA nanopartikülleri, 56 mL besiyerinde süspande edilerek 100 µM stok çözeltisi MTT yöntemlerinde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonda çözeltileri taze olarak hazırlandı.

0,3728 mg berberin PMMA nanopartikülleri, 56 mL besiyerinde süspande edilerek 100 µM stok çözeltisi COMET yönteminde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti PBS ile seyreltilerek 5, 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonda çözeltileri taze olarak hazırlandı.

### **4. Naringin PMMA Nanopartikül Çözeltileri:**

0,5805 mg naringin PMMA nanopartikülleri 31 mL besiyerinde süspande edilerek 100 µM stok çözeltisi DPPH yönteminde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonda çözeltiler taze olarak hazırlandı.

0,5805 mg naringin PMMA nanopartikülleri 31 mL besiyerinde süspande edilerek 100 µM stok çözeltisi MTT yöntemlerinde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonda çözeltiler taze olarak hazırlandı.

0,5805 mg naringin PMMA nanopartikülleri 31 mL besiyerinde süspande edilerek 100 µM stok çözeltisi COMET yönteminde kullanılmak amacıyla hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 5, 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonda çözeltiler taze olarak hazırlandı.

### **3.3.2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Yöntemiyle Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **1. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) çözeltisi (0.2 mM):**

39,4 mg DPPH, mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarılıp üzerine 1 mL %70'lik metanol eklendi. Mikrosantrifüj tüpünün kapağı kapatılarak DPPH tamamen çözülene kadar vortekslendi. Hazırlanan çözelti, balon jojeye aktarıldı; çözeltinin son hacmi %70'lik metanol ile 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan DPPH çözeltisi ışıktan korunarak taze olarak hazırlandı.

### **3.3.3. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler**

#### **1. Besi ortamı:**

50 mL (% 10) FBS ve 5 mL (% 1) penisilin/streptomisin 500 mL DMEM üzerine eklendi. Buzdolabında +4°C'de saklandı.

#### **2. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)**

#### **çözeltisi:**

50 mg MTT, 10 ml Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti 0,22 µm membran filtreden süzülerek steril, ışık geçirmeyen bir tüpe aktarıldı. Hazırlanan MTT çözeltisi (5 mg/mL) ışıktan korunarak, 4°C'de saklandı. Kullanılacağı zaman hazırlanan MTT çözeltisinden 2 mL alınarak 20 mL'ye besiyeri ile tamamlanarak 0,5 mg/mL çözelti hazırlandı. Çözelti deney günü taze hazırlandı.

### **3.3.4. Tek Hücre Jel Elektroferez (COMET) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler**

#### **1. Besi Ortamı:**

50 mL (% 10) FBS ve 5 mL (% 1) penisilin/streptomisin 500 mL DMEM üzerine eklendi. Buzdolabında +4°C'de saklandı.

**2. 200 mM Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (Na<sub>2</sub>EDTA)****Çözeltisi:**

29,78 g Na<sub>2</sub>EDTA, 400 mL distile suda çözülerek pH 10'a ayarlandı. Oda sıcaklığında +25°C'de saklandı.

**3. 10 N Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi:**

40 g NaOH, 100 mL distile suda çözüldü. Oda sıcaklığında +25°C'de saklandı.

**4. Düşük Erime Noktalı Agar (LMA) Çözeltisi:**

250 mg LMA mikrodalga fırın kullanılarak 25 mL PBS çözeltisi içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde buzdolabında +4°C'de saklandı.

**5. Normal Erime Noktalı Agar (NMA) Çözeltisi:**

1 g NMA mikrodalga fırın kullanılarak 100 mL distile su içerisinde çözüldü. Buzdolabında +4°C'de saklandı.

**6. Elektroforez Tampon Çözeltisi:**

1447,7 mL soğuk distile su, 7,5 mL 200 mM EDTA ve 44.8 mL 10 N NaOH çözeltisi karıştırılarak taze olarak hazırlandı.

**7. Etanol Çözeltisi (%50):**

Mutlak etanol (%99,8) çözeltisinden 250.5 ml alınarak çözelti hacmi distile suyla 500 mL'ye tamamlandı.

**8. Etanol Çözeltisi (%75):**

Mutlak etanol (%99,8) çözeltisinden 375.7 ml alınarak çözelti hacmi distile suyla 500 mL'ye tamamlandı.

**9. Etanol Çözeltisi (%95):**

Mutlak etanol (%99,8) çözeltisinden 475.9 ml alınarak çözelti hacmi distile suyla 500 mL'ye tamamlandı.

**10. Etidiyum Bromür (EtBr) Çözeltisi:**

5 mg EtBr 25 mL distile suda çözülerek 200 µg/ mL'lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Boyama sırasında bu stok çözülden 1 mL alındı ve 10 mL'ye distile suyla tamamlanarak 20 µg/mL'lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Oda sıcaklığında +25°C'de saklandı.

**11. Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS):**

2 PBS tablet, 200 mL distile suda çözüldü. Buzdolabında 4°C'de saklandı.

**12. Stok Lizis Çözeltisi:**

146,1 g NaCl, 37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA ve 1,2 g Tris-base 500 ml distile suda çözülerek üzerine 10 g NaOH eklendi ve pH 10'a ayarlandı. Hazırlanan çözelti üzerine 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklenerek distile su ile 890 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında +25°C'de saklandı.

**13. Lizis Çözeltisi:**

178 mL stok lizis çözeltisi, 20 mL DMSO ve 2 mL Triton X-100 ile karıştırıldı. Çözelti deney günü taze hazırlandı ve deney sırasında soğuk çözelti kullanılabilmesi için +4°C'de saklandı.

**3.4. YÖNTEMLER****3.4.1. Nanopartiküllerin Eldesi**

Boyutları 160-230 nm arasında değişen naringin PMMA NP ve berberin PMMA NP'leri Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında elde edilmiştir.

### 3.4.2. 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi

#### Yöntemi

- 0,2 M DPPH çözeltisi deney günü taze olarak hazırlandı.
- 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 µM konsantrasyonlarda %70'lik metanol içinde berberin, naringin, berberin PMMA NP'leri ve naringin PMMA NP'leri çözeltileri hazırlandı.
- 96 kuyucuklu plakaların tüm kuyucuklara hazırlanan DPPH çözeltisi eklendi. 1. kuyucuk hariç diğer kuyucuklara hazırlanan berberin, naringin, berberin PMMA NP'leri ve naringin PMMA NP çözeltilerinin her bir konsantrasyonu 3 tekrar olacak şekilde eklendi.
- 96 kuyucuklu plakalar, 30 saniye çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi.
- Süre sonunda UV spektrofotometresinde 517 nm'de çözeltilerin absorbansı okundu. Kullanılan bileşiklerin radikal süpürücü etkileri kontrol olarak kullanılan DPPH çözeltisine oranla okunan absorbans değerlerine göre aşağıdaki eşitlikten hesaplandı;

$$\% \text{ Radikal Süpürücü Etki} = \frac{(\text{Kontrol Absorbans} - \text{Bileşiklerin Absorbans Değerleri}) \times \text{Kontrol Absorbans}}{\text{Kontrol Absorbans}} \times 100$$

- Çalışmalar üçer kez tekrarlandı.

### 3.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

#### 1. Dondurulan hücrelerin çözülmesi:

- Daha önce -80°C' de saklanan 3T3 ve Caco-2 hücrelerinin bulunduğu kriyovialler 37°C'lik su banyosunda tamamen çözülene kadar bekletildi.
- Steril çalışma kabini altında, kriyoviallerdeki hücre süspansiyonu (1,5 mL) konik tüplere aktarıldı ve 4,5 mL PBS ile karıştırılarak 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve kalan hücreler 7 mL besi yeri ile karıştırılarak 25 cm<sup>2</sup>'lik yatay hücre kültürü şişelerine ekildi.
- 37°C, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde hücreler inkübasyona bırakıldı.

- Çözünme işleminden 24 sa sonra ortamda kalabilecek DMSO kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla PBS ile birer yıkama daha yapıldı.

## **2. Hücrelerin pasajlaması işlemi:**

- Hücrelerin durumu her gün kontrol edildi.
- 37°C, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 3T3 hücreleri 1 gün süre ile Caco-2 hücreleri 2 gün süre ile inkübe edildi.
- İnkübasyon süresinin sonunda hücreler, ışık mikroskobu altında incelendi ve 2 yatay hücre kültürü şişesine bölünebilecek duruma geldiği görüldü.
- Hücreler, steril pipet ile PBS kullanılarak yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından hücreler, 2 ml tripsin-EDTA ile muamele edildi ve hücrelerin yüzeyden kalkmaları için 5 dakika inkübatörde bekletildi.
- İnkübasyon süresinin sonunda yatay hücre kültürü şişesi inkübatörden alınarak hücrelerin üzerine tripsinin aktivitesini durdurmak için 4 ml PBS eklendi.
- Yatay hücre kültürü şişesinde bulunan çekilen hücre süspansiyonu 15'lik santrifüj tüpüne aktarılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra, tüpün dibinde oluşan pellete dokunmadan üst faz pastör pipet ile atıldı.
- Daha sonra hücre pelleti, besiyeri ile karıştırılarak yatay hücre kültürü şişelerine ekildi.
- Yatay hücre kültürü şişelerinin üzerine hücre tipi, tarih, besiyeri ve pasaj sayısı yazılarak inkübatöre konuldu.

### **3.4.3. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür**

#### **(MTT) Yöntemi**

- Hücre kültürü başlığında anlatıldığı gibi; 37°C, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 3T3 hücreleri 1 gün süre ile Caco-2 hücreleri 2 gün inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyonun ardından yatay hücre kültürü şişeleri mikroskop altında incelenerek hücrelerin canlılığı ve doyumluğu kontrol edildi. Hücre miktarı yatay hücre kültürü şişesinin %80'inin kapladığında hücrelerin 96 kuyucuklu plakalara alınması işlemine başlandı.
- Hücre kültür süspansiyonları, steril çalışma kabini altında yatay hücre kültürü şişesinden cam pastör pipet ve vakum kullanılarak dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Hücreler, steril pipet ile 2 mL PBS kullanılarak yıkandı. Yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırılarak şişeye 2 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi.
- Yatay hücre kültürü şişeleri, inkübatörde 5 dakika süre ile bekletildi. İnkübasyon süresinin ardından yatay hücre kültürü şişelerine 4 mL PBS bekletilmeden eklendi.
- Yatay hücre kültürü şişesindeki hücre süspansiyonu, hücrelerin çökmesini sağlamak amacıyla santrifüj tüpüne aktararak 25°C'de, 1000 devir/dakika ve beş dakika boyunca santrifüj edildi.
- Santrifüj tüpünün üstünde toplanan sıvı dipte bulunan pellete dokunmadan cam pastör pipet ve vakum ile uzaklaştırıldı. Santrifüj tüpünün altında bulunan hücre pelleti üzerine, steril pipet ile 5 ml besi yeri eklendi ve çek-bırak yapılarak karıştırıldı.
- Santrifüj tüpünde bulunan hücre süspansiyonundan bir ependorf tüpe 10 µL alındı ve üzerine 90 µL tripan mavisi çözeltisi eklendi (Dilüsyon faktörü:10).
- Yaklaşık 20 µL hücre süspansiyonu-tripan mavisi karışımı Neubauer sayım lamına uygulandı.
- Işık mikroskobu altında, Neubauer sayım lamı kullanılarak hücreler sayıldı. Hücre sayımının doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesi için ideal olarak her işlemde 100 ve üzeri hücre sayıldı.
- Yaşayan hücrelerin sayısını hesaplamak amacıyla aşağıda verilen formül kullanıldı:

$$\text{mL'deki Yaşayan Hücre Sayısı} = (\text{Toplam Hücre Sayısı}/4) \times 10^4 \times 10$$

- Yaşayan hücre sayısı hesaplandıktan sonra hücreler, besi yeri ile seyreltilerek hücre süspansiyonu hazırlandı.
- 96 kuyucuklu plağa, her bir kuyucukta 200  $\mu\text{L}$  (10000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde ekim yapılarak 37°C, %95 nem ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde 1 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.
- 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kuyucuklarda bulunan besi yeri cam pastör pipet ve vakum ile uzaklaştırıldı.
- 96 kuyucuklu plak üzerinde berberin (2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ ) ve naringin (50, 100, 250, 500 ve 1000  $\mu\text{M}$ ) maddeleri ile berberin PMMA NP'leri (2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ ) ve naringin PMMA NP'leri (2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ ) her bir kuyucuklara son hacim 100  $\mu\text{L}$  olacak şekilde ikişer tekrar olacak şekilde eklendi.
- Hücreler, 37°C, %95 nem ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda madde çözeltileri cam pastör pipet ve vakum yardımıyla atılarak her bir kuyucuğa 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki MTT çözeltilisinden 100  $\mu\text{L}$  eklendi.
- Hücreler 37°C, %95 nem ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde 3 saat daha inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresinin ardından MTT çözeltisi uzaklaştırılarak kuyucukların üzerine 100  $\mu\text{L}$  DMSO çözeltisi oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla eklendi ve yatay çalkalayıcıda 10 dakika süreyle çalkalandı.
- Çalkalama işleminin ardından oluşan renk şiddeti ELISA okuyucuda (BioTek) 570 nm'de ölçüldü.
- Elde edilen absorbans değerlerinin kontrol absorbans değerine oranının 100 ile çarpılması sonucu her bir maddenin konsantrasyonu için % hücre canlılığı ve  $\text{IC}_{50}$  değerleri bulundu.
- Çalışmalar üçer kez tekrarlandı.

#### **3.4.4. Tek Hücre Jel Elektrofrez (COMET) Yöntemi**

- Hücre kültürü yöntemi başlığı altında anlatıldığı gibi 3T3 ve Caco-2 hücrelerinin kültürü yapıldı ve Neubauer sayım lamında hücreler sayıldı.

- Her bir ependorf tüpe 50 mL (10000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde hücreler besi yeri içerisinde süspansiyon edildi.
- Hücre süspansiyonu bulunan her bir ependorf tüpün üzerine stok çözeltilerinden hareketle belirli hacimlerde alınarak son hacim 100 mL olacak şekilde ependorflara aktarılarak berberin (5, 10, 25 ve 50  $\mu$ M), naringin (50, 100, 250 ve 500  $\mu$ M) berberin PMMA NP'leri (5, 10, 25 ve 50  $\mu$ M) ve naringin PMMA NP'lerinin (5, 10, 25 ve 50  $\mu$ M) istenilen konsantrasyonları hazırlandı.
- Çözeltilere maruz bırakılan hücreler, 37°C, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 3 sa olacak şekilde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresinin ardından çıkarılan hücreler, buzun üzerinde bekletildi.
- Hücre süspansiyonlarından 75  $\mu$ L bir mikrosantrifüj tüplerine alınarak üzerine 150  $\mu$ L %1'lik LMA (37°C  $\pm$  0,5°C'de eritilmiş) çözeltisi eklenerek karıştırıldı.
- Daha önceden %1'lik NMA çözeltisine daldırılarak hazırlanan agar ile kaplanmış lamaların üzerine yayılarak üzerleri lamel ile kapatıldı ve +4°C'de 2-10 dakika kadar bekletilip agarın katılaşması sağlandı.
- Lamalar, lamellerinden ayrılarak şalelere yerleştirildi ve üzerine daha önceden hazırlanarak +4°C'de saklanan soğuk lizis çözeltisi dökülüp +4°C'de en az 1 sa boyunca bekletildi.
- Lizis işleminin ardından lamalar, şalelerde distile su ile yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından lamalar, agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez kütetine aralık bırakmayacak şekilde yerleştirildi ve tankın içi soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu.
- Lamalar, hiçbir akım uygulamadan karanlıkta 20 dakika boyunca elektroforez kütetinin içerisinde bekletildi. Daha sonra 25 V ve 300 mA akım uygulanarak 20 dakika boyunca elektroforez işlemi uygulandı.
- Elektroforez işleminin ardından lamalar şalelere geri yerleştirilerek tekrar distile su ile yıkanıp üzerine fosfatla tamponlanmış çözelti (PBS) konularak +4°C'de 10 dakika bekletildi.
- Şalelerdeki PBS alınarak lamalar şalelerde distile su son kez tekrar yıkandı.

- Yıkama işleminin ardından lamalar üzerine sırasıyla hazırlanan %50'lik, %75'lik ve %95'lik etanol çözeltileri konularak ağzı kapalı bir şekilde 5'er dakika bekletildi.
- İşlemin sonunda lamalar şalelerden çıkarılarak kurumaları için 24 sa bekletildi. Okuma sırasında, 40 µL etidiyum bromür çözeltisi lamaların üzerine eklenerek lamel ile kapatıldı.
- Floresan mikroskopunda, her bir lam için 100 hücre, "Perceptive Instruments COMET Assay IV Analysis System" bilgisayar programı ile DNA hasar derecesi kuyruk yoğunluğu parametresi kullanılarak değerlendirildi.
- Çalışmalar 3 kez tekrarlandı.

#### **3.4.5. İstatistiksel Yöntem**

GraphPad Prism® Version 5.03 programı kullanıldı. Gruplar arası farkların önem kontrolleri, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Post hoc analizi ise Tukey's HSD testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri başlangıcı olarak  $p < 0,05$  kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. BERBERİN İLE ELDE EDİLEN BULGULAR

#### 4.1.1. Berberinin 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

25-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında berberinin negatif kontrol (Metanol-DPPH) çözeltisine karşı antioksidan kapasitesi incelendiğinde, konsantrasyon arttıkça berberinin “%Radikal süpücü etkisi”nin arttığı ve 1000-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında en yüksek antioksidan kapasite gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** DPPH yöntemine göre berberinin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Berberinin Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Radikal Süpürücü Etki (%)
0 [(-) kontrol]	1,028 $\pm$ 0,007	0
2000 [(+) kontrol]	0,090 $\pm$ 0,002	89,493
25	0,909 $\pm$ 0,025	12,265
50	0,817 $\pm$ 0,018	21,799
100	0,819 $\pm$ 0,018	21,559
200	0,804 $\pm$ 0,003	23,102
500	0,860 $\pm$ 0,017	17,375
1000	0,765 $\pm$ 0,004	27,149
2000	0,628 $\pm$ 0,008	41,245

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (Metanol-DPPH) ile kıyaslanmıştır. Pozitif kontrol olarak “Askorbik asit” kullanılmıştır.

#### 4.1.2. Berberinin Sitotoksitesine İlişkin Bulgular

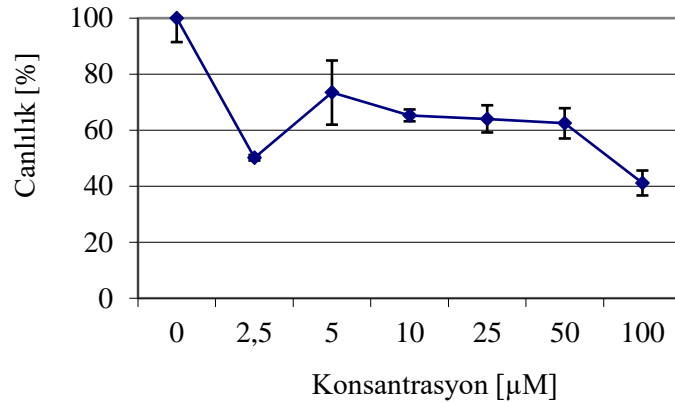
**1. Berberinin 3T3 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:**

Berberinin sitotoksitesi 2,5-100 µM konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde 24, 48, 72 sa maruziyetinden sonra yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslandı. Berberinin 24 sa maruziyetten sonra 0-50 µM konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 50-100 µM konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberinin 3T3 hücrelerinde 24 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 79.20 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2) (Şekil 4.1).

**Çizelge 4.2.** MTT yöntemine göre berberinin 3T3 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,467 ± 0,014	100,00
2,5	0,736 ± 0,168	50,16
5	1,077 ± 0,030	73,43
10	0,958 ± 0,071	65,29
25	0,939 ± 0,079	64,04
50	0,916 ± 0,065	62,45
100	0,603 ± 0,014	41,15

\*Sonnular, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.1.** Berberinin 24 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

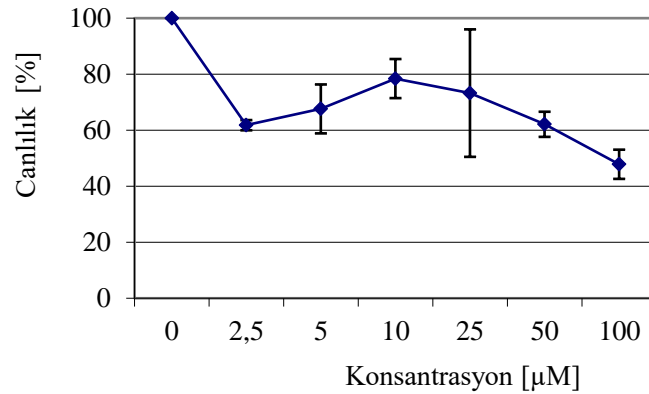
\*Sonnuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  
Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

Berberinin 48 sa maruziyetten sonra 0-50  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 50-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberinin 3T3 hücrelerinde 24 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 92.43  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.2).

**Çizelge 4.3.** MTT yöntemine göre berberinin 3T3 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,556 $\pm$ 0,001	100,00
2,5	0,961 $\pm$ 0,028	61,78
5	1,052 $\pm$ 0,136	67,59
10	1,220 $\pm$ 0,108	78,43
25	1,139 $\pm$ 0,354	73,24
50	0,966 $\pm$ 0,069	62,10
100	0,744 $\pm$ 0,081	47,83

\*Sonnuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  
Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.2.** Berberinin 48 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  
Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

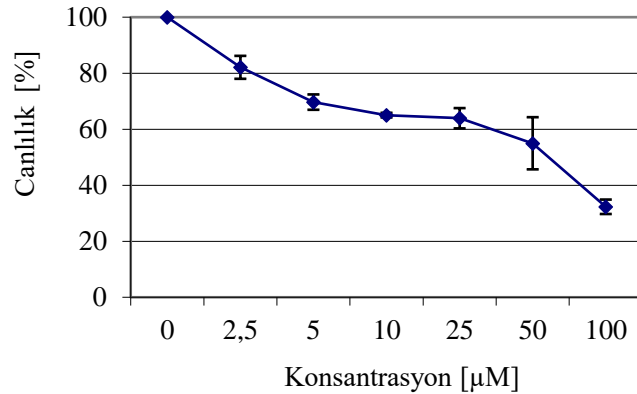
Berberinin 72 sa maruziyetten sonra 0-10  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 25-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberinin 3T3 hücrelerinde 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 60.97  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4) (Şekil 4.3).

**Çizelge 4.4.** MTT yöntemine göre berberinin 3T3 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	2,260 $\pm$ 0,030	100,00
2,5	1,589 $\pm$ 0,120	70,29
5	1,450 $\pm$ 0,072	64,15
10	1,608 $\pm$ 0,250	71,15
25	1,312 $\pm$ 0,174	58,08
50	1,266 $\pm$ 0,165	56,03
100	0,723 $\pm$ 0,058	31,99

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.3.** Berberinin 72 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonnuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

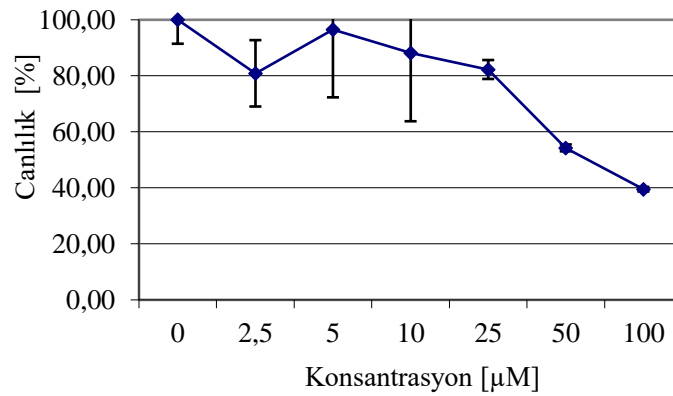
## **2. Berberinin Caco-2 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:**

Berberinin sitotoksitesi 2,5-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde 24, 48, 72 sa maruziyetinden sonra yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslandı. Berberinin 24 sa maruziyetten sonra 0-50  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 50-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberinin Caco-2 hücrelerinde 24 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 64,48  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5) (Şekil 4.4).

**Çizelge 4.5.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra berberinin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,467 ± 0,125	100,00
2,5	1,187 ± 0,173	80,90
5	1,416 ± 0,354	96,50
10	1,294 ± 0,358	88,19
25	1,207 ± 0,049	82,26
50	0,796 ± 0,018	54,27
100	0,580 ± 0,012	39,53

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.4.** Berberinin 24 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

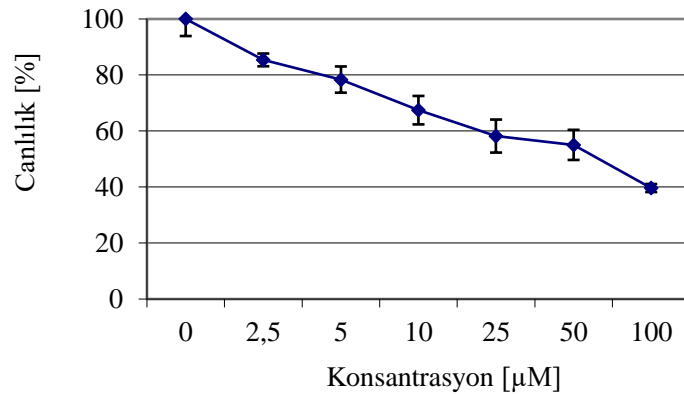
\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

Berberinin 48 sa maruziyetten sonra 0-25 µM konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 25-100 µM konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberinin Caco-2 hücreleri için 48 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 66,39 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6) (Şekil 4.5).

**Çizelge 4.6.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra berberinin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	2,682 ± 0,003	100,00
2,5	2,293 ± 0,061	85,48
5	2,104 ± 0,126	78,45
10	1,811 ± 0,136	67,51
25	1,562 ± 0,158	58,25
50	1,478 ± 0,144	55,10
100	1,064 ± 0,038	39,68

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.5.** Berberinin 48 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

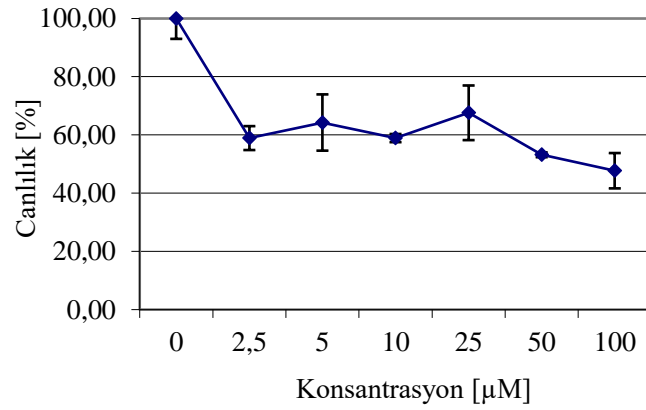
\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

Berberinin 72 sa maruziyetten sonra 0-25 µM konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 25-100 µM konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki oluşturduğu gözlenmiştir. Berberinin Caco-2 hücrelerinde 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 73,72 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7) (Şekil 4.6).

**Çizelge 4.7.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra berberinin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	3,746 ± 0,153	100,00
2,5	2,960 ± 0,668	79,01
5	2,549 ± 0,644	68,04
10	2,461 ± 0,802	65,70
25	2,127 ± 0,871	56,79
50	2,046 ± 0,737	54,61
100	1,594 ± 0,749	42,55

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.6.** Berberinin 72 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

### 4.1.3. Berberinin Genotoksitesine İlişkin Bulgular

#### 1. Berberinin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde COMET yöntemi ile genotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:

Berberinin sitotoksosite göstermediği 5, 10, 25 ve 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde oluşturduğu üç ayrı deneyin DNA hasarı sonuçları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Berberinin negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslandığında 3T3 hücrelerinde düşük dozlarda DNA hasarı oluşturmadığı; Caco-2 hücrelerinde ise negatif kontrol (DMEM) ile benzer oranlarda DNA hasarı oluşturduğu saptanmıştır.

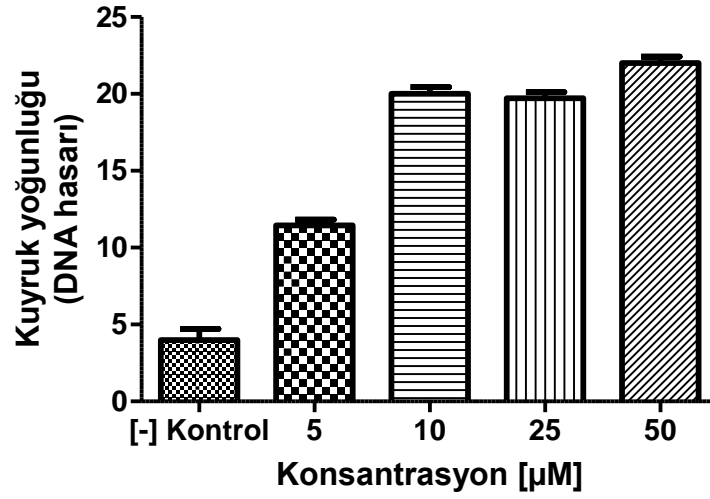
Berberinin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinin her ikisinde de kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarının negatif kontrole kıyasla konsantrasyon arttıkça arttığı görülmüştür (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8) ( $p < 0,001$ ).

**Çizelge 4.8.** Berberinin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	3T3 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) ( $\pm$ standart sapma)	Caco-2 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) ( $\pm$ standart sapma)
0 [(-) kontrol]	3,988 $\pm$ 0,586	5,586 $\pm$ 0,533
5	11,451 $\pm$ 0,309	5,614 $\pm$ 0,799
10	20,008 $\pm$ 0,359	6,151 $\pm$ 0,673
25	19,710 $\pm$ 0,327	7,666 $\pm$ 0,729
50	22,002 $\pm$ 0,354	8,527 $\pm$ 0,353

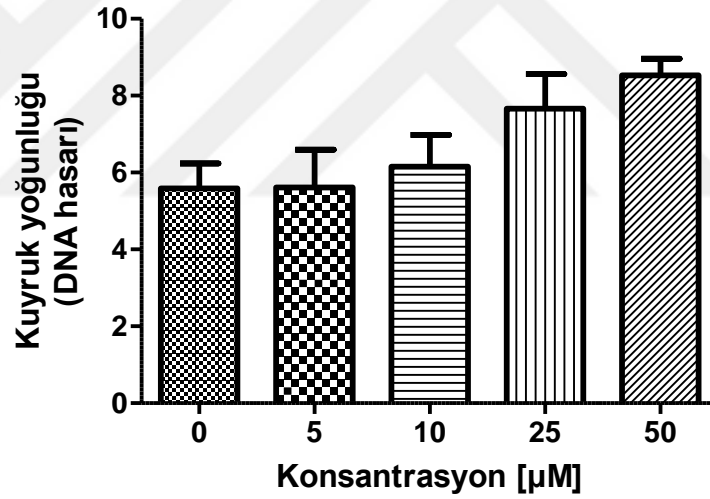
\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.7. Berberinin 3T3 hücrelerinde DNA hasarına etkisi. \*

\*Üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.  
( $p < 0,001$ ) Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.8. Berberinin Caco-2 hücrelerinde DNA hasarına etkisi. \*

\*Üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.  
( $p < 0,001$ ) Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

## 4.2. NARİNGİN İLE ELDE EDİLEN BULGULAR

### 4.2.1. Naringinin 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

25-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında naringinin negatif kontrol (Metanol-DPPH) çözeltisine karşı antioksidan kapasitesi incelendiğinde, konsantrasyon arttıkça berberinin “%Radikal süpücü etkisi”nin arttığı gözlenmiştir. 1000-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında en yüksek antioksidan kapasite gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** DPPH yöntemine göre naringinin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi\*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Naringinin Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Radikal Süpürücü Etki (%)
0 [(-) kontrol]	1,028 $\pm$ 0,007	0
2000 [(+) kontrol]	0,090 $\pm$ 0,002	89,493
25	0,857 $\pm$ 0,031	17,683
50	0,776 $\pm$ 0,029	26,017
100	0,760 $\pm$ 0,040	27,664
200	0,728 $\pm$ 0,019	30,956
500	0,697 $\pm$ 0,021	34,111
1000	0,543 $\pm$ 0,087	49,922
2000	0,406 $\pm$ 0,074	64,086

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (Metanol-DPPH) ile kıyaslanmıştır. Pozitif kontrol olarak Askorbik asit kullanılmıştır.

#### 4.2.2. Naringinin Sitotoksitesine İlişkin Bulgular

##### 1. Naringinin 3T3 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:

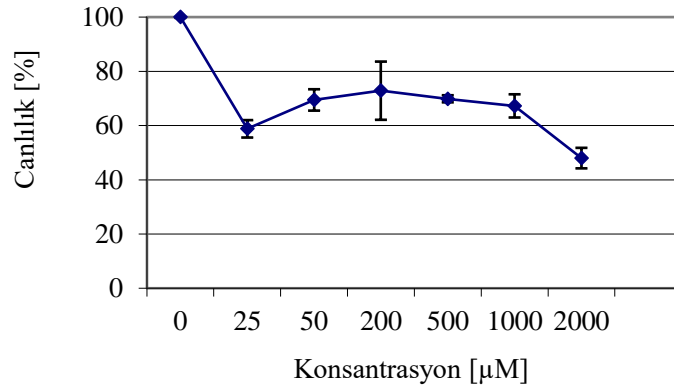
Naringinin sitotoksitesi 25-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde 24, 48, 72 sa maruziyetinden sonra yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslandı. Naringinin 24 sa maruziyetten sonra 0-1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 1000-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Naringinin 3T3 hücrelerinde 24 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 1891,20  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10) (Şekil 4.9).

**Çizelge 4.10.** MTT yöntemine göre 3T3 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,385 $\pm$ 0,004	100,00
25	0,814 $\pm$ 0,044	58,79
50	0,962 $\pm$ 0,054	69,45
200	1,009 $\pm$ 0,149	72,86
500	0,968 $\pm$ 0,018	69,87
1000	0,931 $\pm$ 0,059	67,25
2000	0,665 $\pm$ 0,052	48,00

\*Sonnular, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.9.** Naringinin 24 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonnuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

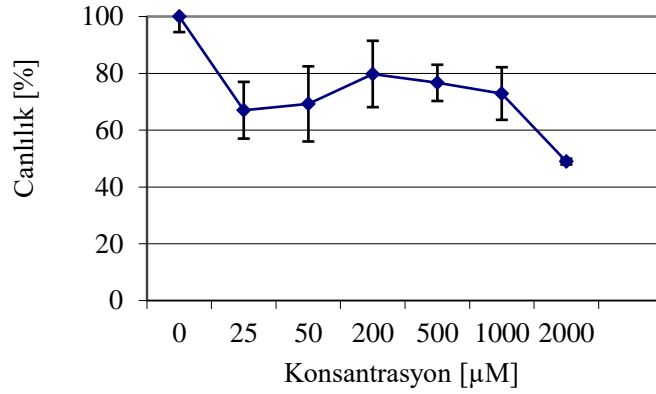
Naringinin 48 sa maruziyetten sonra 0-1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 1000-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Naringinin 3T3 hücrelerinde 48 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 1955,34  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11) (Şekil 4.10).

**Çizelge 4.11.** MTT yöntemine göre 3T3 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,444 $\pm$ 0,079	100,00
25	0,967 $\pm$ 0,144	67,00
50	0,999 $\pm$ 0,190	69,23
200	1,151 $\pm$ 0,168	79,77
500	1,106 $\pm$ 0,092	76,64
1000	1,052 $\pm$ 0,133	72,89
2000	0,706 $\pm$ 0,014	48,93

\*Sonnuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.10.** Naringinin 48 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

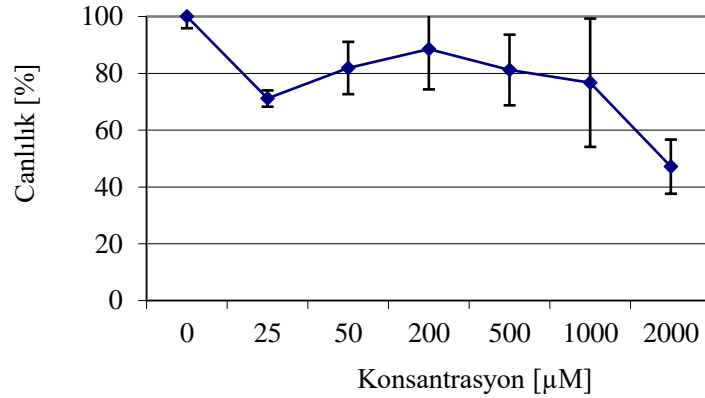
\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

Naringinin 72 sa maruziyetten sonra 0-1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği ancak 1000-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Naringinin 3T3 hücrelerinde 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 1931,37  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12) (Şekil 4.11).

**Çizelge 4.12.** MTT yöntemine göre 3T3 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	2,275 $\pm$ 0,093	100,00
25	1,618 $\pm$ 0,065	71,12
50	1,863 $\pm$ 0,209	81,87
200	2,013 $\pm$ 0,321	88,47
500	1,847 $\pm$ 0,282	81,17
1000	1,745 $\pm$ 0,513	76,68
2000	1,072 $\pm$ 0,217	47,14

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.11.** Naringinin 72 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

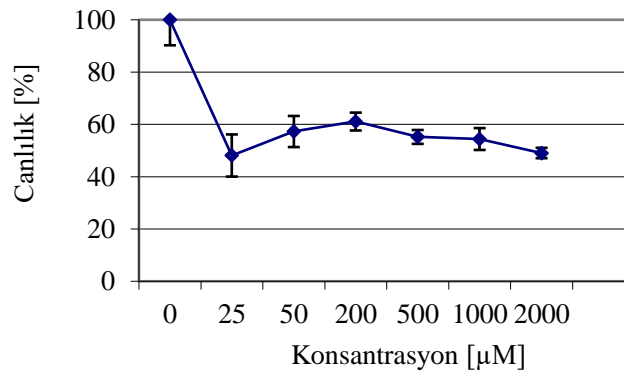
## **2. Naringinin Caco-2 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:**

Naringinin sitotoksitesi 25-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde 24, 48, 72 sa maruziyetinden sonra yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslandı. Naringinin 24 sa maruziyetten sonra 50-1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 1000-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Naringinin Caco-2 hücrelerinde 24 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 1991,127  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13) (Şekil 4.12).

**Çizelge 4.13.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,933 ± 0,188	100,00
25	0,929 ± 0,155	48,09
50	1,107 ± 0,115	57,28
200	1,181 ± 0,066	61,09
500	1,067 ± 0,051	55,21
1000	1,051 ± 0,080	54,40
2000	0,948 ± 0,038	49,05

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.12.** Naringinin 24 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

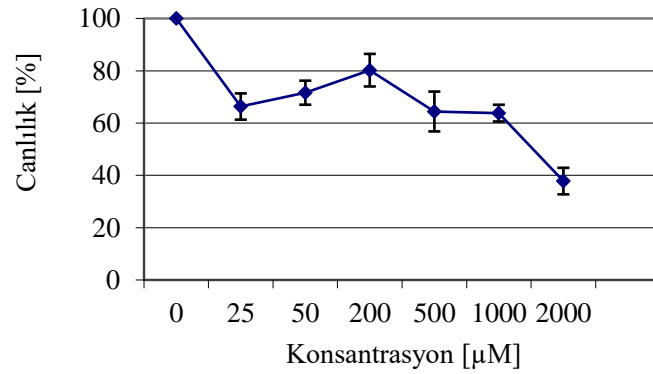
\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

Naringinin 48 sa maruziyetten sonra 0-1000 µM konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 1000-2000 µM konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki oluşturduğu gözlenmiştir. Naringinin Caco-2 hücrelerinde 48 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 1531,17 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14) (Şekil 4.13).

**Çizelge 4.14.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	3,959 ± 0,004	100,00
25	2,626 ± 0,198	66,34
50	2,836 ± 0,182	71,62
200	3,177 ± 0,246	80,23
500	2,551 ± 0,301	64,43
1000	2,526 ± 0,126	63,80
2000	1,497 ± 0,201	37,82

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.13.** Naringinin 48 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

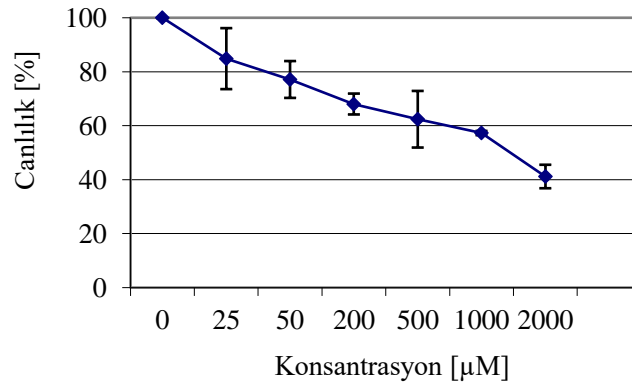
Naringinin 72 sa maruziyetten sonra 0-1000 µM konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 1000-2000 µM konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği

gözenmiştir. Naringinin Caco-2 hücrelerinde 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 1452,17  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15) (Şekil 4.14).

**Çizelge 4.15.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra naringinin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	3,977 $\pm$ 0,009	100,00
25	3,374 $\pm$ 0,449	84,85
50	3,067 $\pm$ 0,271	77,13
200	2,706 $\pm$ 0,154	68,04
500	2,481 $\pm$ 0,417	62,40
1000	2,278 $\pm$ 0,031	57,28
2000	1,637 $\pm$ 0,173	41,18

\*Sonnular üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.14.** Naringinin 72 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonnular üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

### 4.2.3. Naringinin Genotoksisitesine İlişkin Bulgular

#### 1. Naringinin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde COMET yöntemi ile genotoksisitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:

Naringinin sitotoksisite göstermediği 50, 100, 250 ve 500  $\mu$ M konsantrasyonlarda 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde üç ayrı deneyin DNA hasarı sonuçları Çizelge 4.16 'da gösterilmiştir.

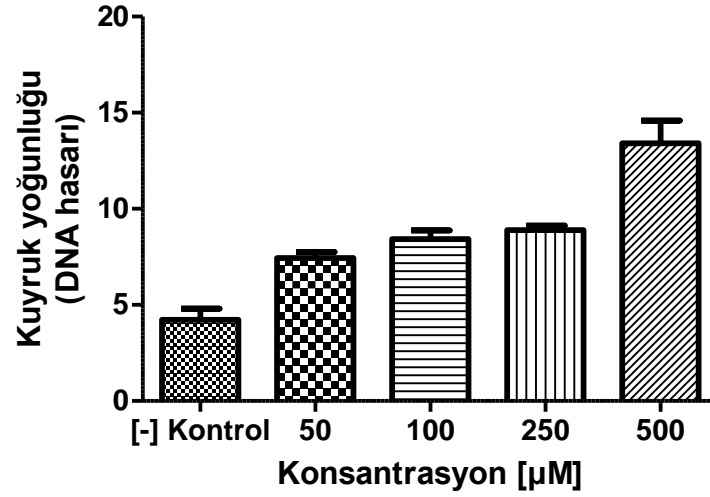
Naringinin negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslandığında 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde düşük dozlarda DNA hasarı oluşturmadığı saptanmıştır.

Naringinin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinin her ikisinde de kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarının negatif kontrole kıyasla konsantrasyon arttıkça arttığı görülmüştür (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16) ( $p < 0,001$ ).

**Çizelge 4.16.** Naringinin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi. \*

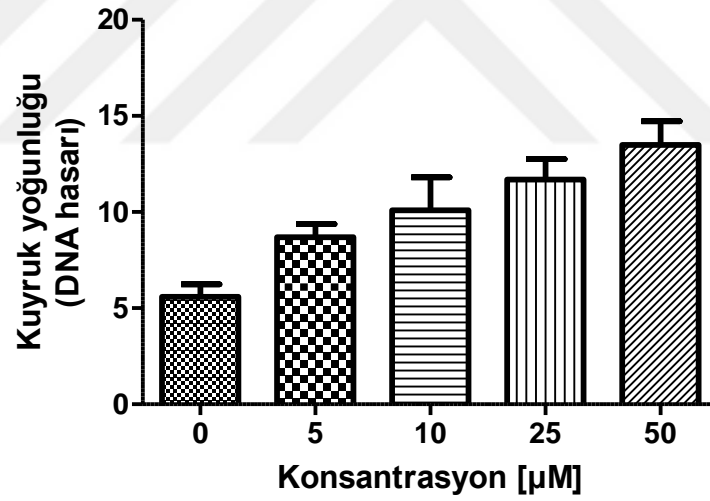
Konsantrasyon ( $\mu$ M)	3T3 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) ( $\pm$ standart sapma)	Caco-2 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) ( $\pm$ standart sapma)
0 [(-) kontrol]	4,222 $\pm$ 0,593	4,6722 $\pm$ 0,799
50	7,445 $\pm$ 0,261	5,9656 $\pm$ 1,085
100	8,417 $\pm$ 0,379	5,4742 $\pm$ 0,858
250	8,893 $\pm$ 0,184	7,1046 $\pm$ 0,904
500	13,401 $\pm$ 0,971	13,2056 $\pm$ 0,901

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.15. Naringinin 3T3 hücrelerinde DNA hasarına etkisi. \*

\*Üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.  
( $p < 0,001$ ) Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.16. Naringinin Caco-2 hücrelerinde DNA hasarına etkisi. \*

\*Üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir ( $p < 0,001$ ).  
Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

### 4.3. PMMA NANOPARTİKÜLLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR

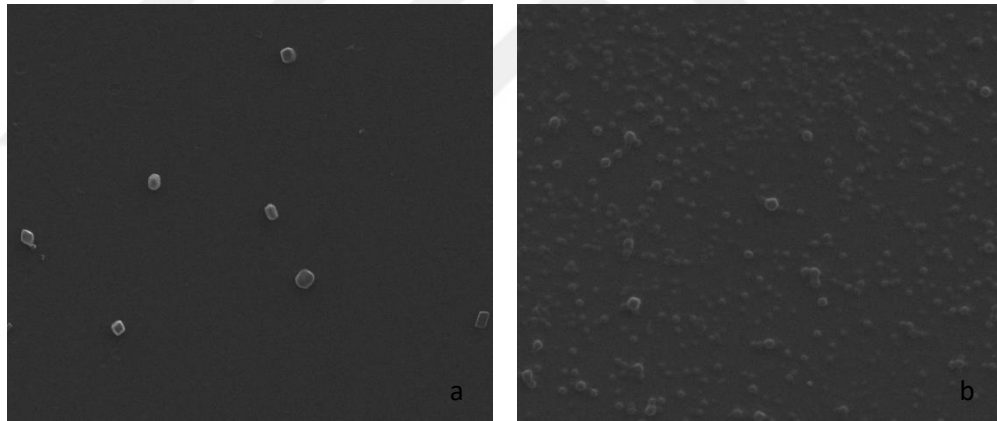
#### 4.3.1. PMMA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Hazırlanan PMMA NP'lerin ortalama çap ve Polidispersite İndeksi (Pdl) ölçümleri için Nicomp Z300, ABD (Entegris) kullanılmıştır. PMMA NP'lerin ortalama çap ve Pdl değerleri Çizelge 4.17'de ve örneklerin Taramalı Elektron Mikroskopi (TEM) görüntüleri Şekil 4.17'de verilmiştir.

**Çizelge 4.17.** PMMA NP'lerin ortalama çapı ve Pdl değerleri.\*

Örnek	Çap (nm)	Polidispersite İndeksi (Pdl)
Berberin PMMA NP	160,000 ± 18,600	0,035
Naringin PMMA NP	222,000 ± 44,700	0,200

\*Üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.



**Şekil 4.17.** PMMA Nanopartiküllerin TEM görüntüleri [a) Berberin PMMA NP, b) Naringin PMMA NP].

#### 4.4. BERBERİN PMMA NANOPARTİKÜLLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR

##### 4.4.1. Berberin PMMA Nanopartiküllerinin 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

25-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında berberin PMMA NP'lerin negatif kontrol (Metanol-DPPH) çözeltisine karşı antioksidan kapasitesi incelendiğinde, konsantrasyon arttıkça berberinin “%Radikal süpücü etkisi”nin arttığı gözlenmiştir. 1000-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında en yüksek antioksidan kapasite gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.18).

**Çizelge 4.18.** DPPH yöntemine göre berberin PMMA NP'lerin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Berberin PMMA NP'lerin Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Radikal Süpürücü Etki (%)
0 [(-) kontrol]	1,028 $\pm$ 0,007	0
2000 [(+) kontrol]	0,090 $\pm$ 0,002	89,493
25	0,900 $\pm$ 0,023	13,225
50	0,873 $\pm$ 0,088	16,003
100	0,868 $\pm$ 0,106	16,517
200	0,831 $\pm$ 0,039	20,290
500	0,813 $\pm$ 0,122	22,159
1000	0,793 $\pm$ 0,059	24,234
2000	0,777 $\pm$ 0,053	25,846

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (Metanol-DPPH) ile kıyaslanmıştır. Pozitif kontrol olarak Askorbik asit kullanılmıştır.

#### 4.4.2. Berberin PMMA NP'lerin Sitotoksitesine İlişkin Bulgular

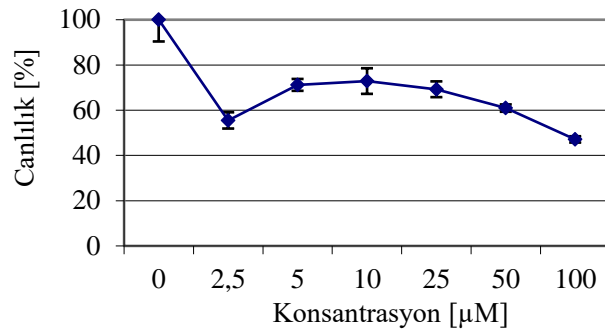
##### 1. Berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:

Berberin PMMA NP'lerin sitotoksitesini 2,5-100 µM konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde 24, 48, 72 sa maruziyetinden sonra yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslandı. Berberin PMMA NP'lerin 24 sa maruziyetten sonra 0-50 µM konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 50-100 µM konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 24 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 89,49 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.19) (Şekil 4.18).

**Çizelge 4.19.** MTT yöntemine göre berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,457 ± 0,140	100,00
2,5	0,808 ± 0,052	55,49
5	1,037 ± 0,038	71,20
10	1,062 ± 0,082	72,89
25	1,009 ± 0,050	69,26
50	0,887 ± 0,023	60,94
100	0,686 ± 0,020	47,09

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.18.** Berberin PMMA NP'lerin 24 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

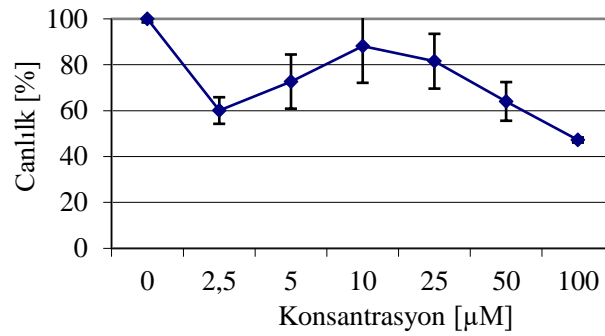
Berberin PMMA NP'lerin 48 sa maruziyetten sonra 0-50  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 50-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 48 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 91,77  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.20) (Şekil 4.19).

**Çizelge 4.20.** MTT yöntemine göre berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,556 $\pm$ 0,024	100,00
2,5	0,934 $\pm$ 0,090	60,07
5	1,130 $\pm$ 0,183	72,68
10	1,371 $\pm$ 0,249	88,15
25	1,268 $\pm$ 0,185	81,54
50	0,996 $\pm$ 0,131	64,03
100	0,734 $\pm$ 0,017	47,23

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.19.** Berberin PMMA NP'lerin 48 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

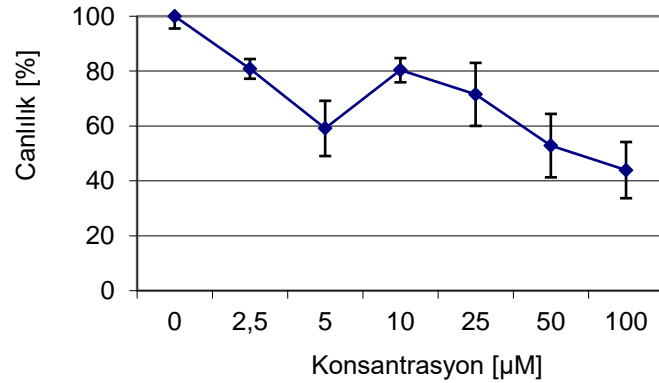
Berberin PMMA NP'lerin 72 sa maruziyetten sonra 0-10  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 25-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 65,99  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.21) (Şekil 4.20).

**Çizelge 4.21.** MTT yöntemine göre berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	2,116 $\pm$ 0,095	100,00
2,5	1,710 $\pm$ 0,076	80,81
5	1,251 $\pm$ 0,213	59,12
10	1,700 $\pm$ 0,093	80,34
25	1,513 $\pm$ 0,243	71,52
50	1,118 $\pm$ 0,244	52,85
100	0,929 $\pm$ 0,216	43,94

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.20.** Berberin PMMA NP'lerin 72 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

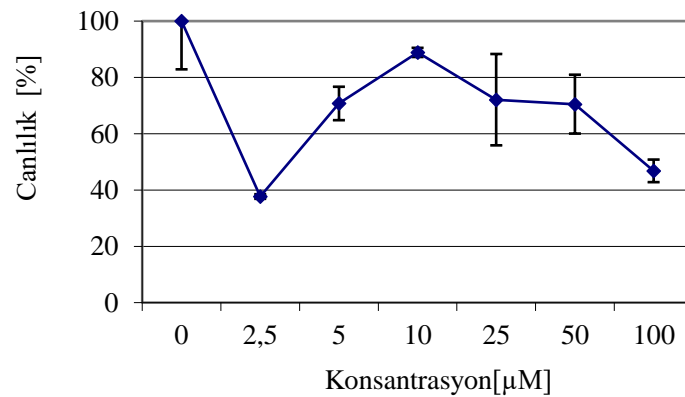
## **2. Berberin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:**

Berberin PMMA NP'lerin sitotoksitesisi 2,5-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde 24, 48, 72 sa maruziyetinden sonra yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslandı. Berberin PMMA NP'lerin 24 sa maruziyetten sonra 5-50  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 50-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde 24 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 93,24  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.22) (Şekil 4.21).

**Çizelge 4.22.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra berberin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	2,038 ± 0,349	100,00
2,5	0,768 ± 0,016	37,69
5	1,442 ± 0,121	70,74
10	1,811 ± 0,032	88,88
25	1,469 ± 0,330	72,09
50	1,437 ± 0,213	70,50
100	0,954 ± 0,081	46,80

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.21.** Berberin PMMA NP'lerin 24 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

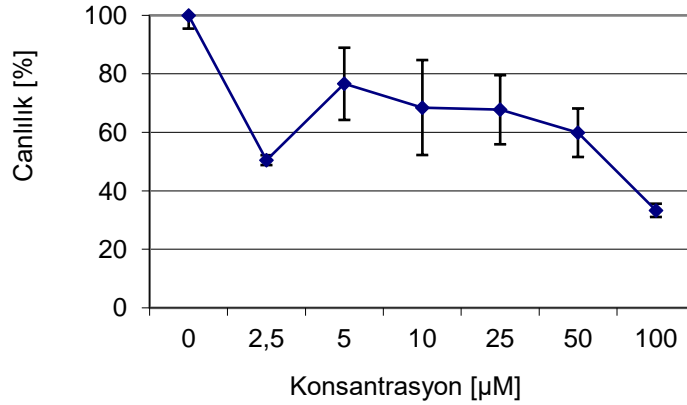
Berberin PMMA NP'lerin 48 sa maruziyetten sonra 0-25 µM konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 25-100 µM konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde 48

saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 81,89  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.23) (şekil 4.22).

**Çizelge 4.23.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra berberin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	3,600 $\pm$ 0,163	100,00
2,5	1,818 $\pm$ 0,060	50,50
5	2,757 $\pm$ 0,444	76,59
10	2,465 $\pm$ 0,584	68,49
25	2,438 $\pm$ 0,425	67,74
50	2,155 $\pm$ 0,298	59,87
100	1,200 $\pm$ 0,184	33,33

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**şekil 4.22.** Berberin PMMA NP'lerin 48 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

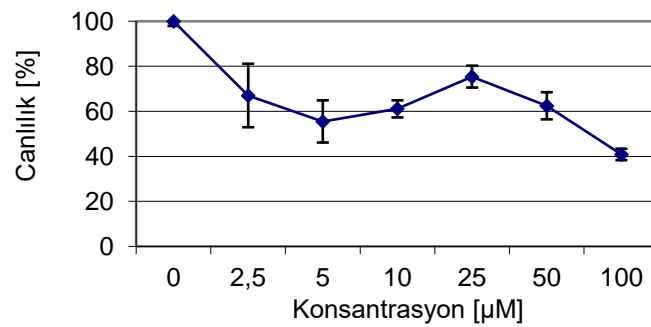
\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

Berberin PMMA NP'lerin 72 sa maruziyetten sonra 0-25  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 25-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Berberin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 78,82  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.24) (Şekil 4.23).

**Çizelge 4.24.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra berberin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	3,977 $\pm$ 0,082	100,00
2,5	2,665 $\pm$ 0,560	67,02
5	2,207 $\pm$ 0,372	55,51
10	2,429 $\pm$ 0,151	61,08
25	2,999 $\pm$ 0,193	75,41
50	2,484 $\pm$ 0,239	62,47
100	1,624 $\pm$ 0,101	40,84

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.23.** Berberin PMMA NP'lerin 72 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

#### 4.4.3. Berberin PMMA NP'lerin Genotoksisitesine İlişkin Bulgular

##### 1. Berberin PMMA NP'lerin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde COMET yöntemi ile genotoksisitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:

Berberin PMMA NP'lerin sitotoksisite göstermediği 5, 10, 25 ve 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde üç ayrı deneyin DNA hasarı sonuçları Çizelge 4.25'te gösterilmiştir.

Berberin PMMA NP'lerin negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslandığında 3T3 hücrelerinde düşük dozlarda DNA hasarı oluşturmadığı; Caco-2 hücrelerinde ise negatif kontrol (DMEM) ile benzer oranlarda DNA hasarı oluşturduğu saptanmıştır.

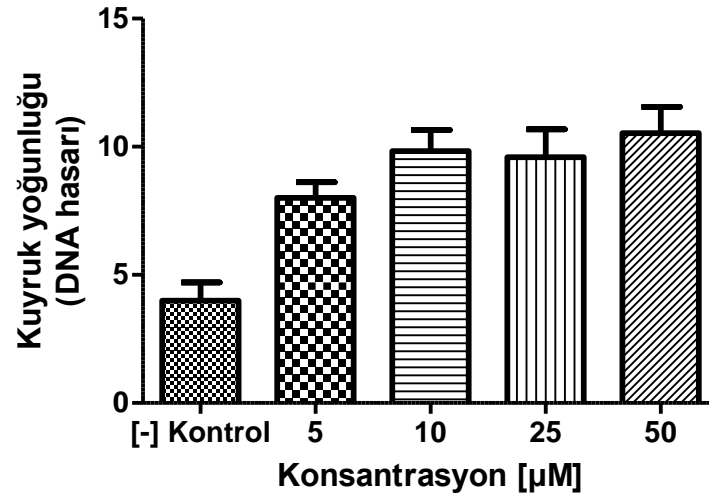
Berberin PMMA NP'lerin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinin her ikisinde de kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarının negatif kontrole kıyasla konsantrasyon arttıkça arttığı görülmüştür (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25) ( $p < 0,001$ ).

**Çizelge 4.25.** Berberin PMMA NP'lerin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	3T3 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) ( $\pm$ standart sapma)	Caco-2 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) ( $\pm$ standart sapma)
0 [(-) kontrol]	3,988 $\pm$ 0,586	5,586 $\pm$ 0,533
5	8,003 $\pm$ 0,501	7,514 $\pm$ 0,147
10	9,830 $\pm$ 0,677	7,894 $\pm$ 1,520
25	9,599 $\pm$ 0,881	8,504 $\pm$ 1,127
50	10,533 $\pm$ 0,835	11,275 $\pm$ 0,566

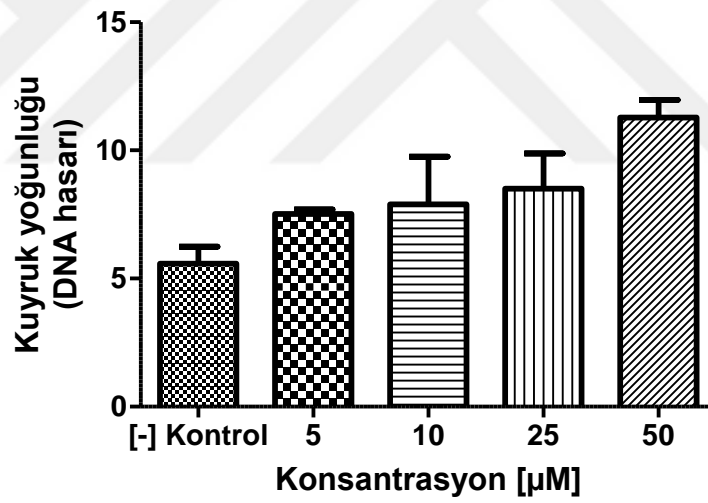
\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.24. Berberin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde DNA hasarına etkisi. \*

\*Üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.  
( $p < 0,001$ ) Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.25. Berberin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi. \*

\*Üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.  
( $p < 0,001$ ) Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

## 4.5. NARİNGİN PMMA NANOPARTİKÜLLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR

### 4.5.1. Naringin PMMA Nanopartiküllerinin 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

25-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında naringin PMMA NP'lerin negatif kontrol (Metanol-DPPH) çözeltisine karşı antioksidan kapasitesi incelendiğinde, konsantrasyon arttıkça berberinin “%Radikal süpücü etkisi”nin arttığı gözlenmiştir. 1000-2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında en yüksek antioksidan kapasite gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.26).

**Çizelge 4.26.** DPPH yöntemine göre naringin PMMA NP'lerin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Naringin PMMA NP'lerin Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Radikal Süpürücü Etki (%)
0 [(-) kontrol]	1,028 $\pm$ 0,007	0
2000 [(+) kontrol]	0,090 $\pm$ 0,002	89,493
25	0,882 $\pm$ 0,015	15,043
50	0,861 $\pm$ 0,086	17,238
100	0,808 $\pm$ 0,023	22,656
200	0,778 $\pm$ 0,001	25,760
500	0,760 $\pm$ 0,081	27,663
1000	0,722 $\pm$ 0,056	31,573
2000	0,697 $\pm$ 0,063	34,111

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (Metanol-DPPH) ile kıyaslanmıştır. Pozitif kontrol olarak “Askorbik asit” kullanılmıştır.

#### 4.5.2. Naringin PMMA NP'lerin Sitotoksitesine İlişkin Bulgular

##### 1. Naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:

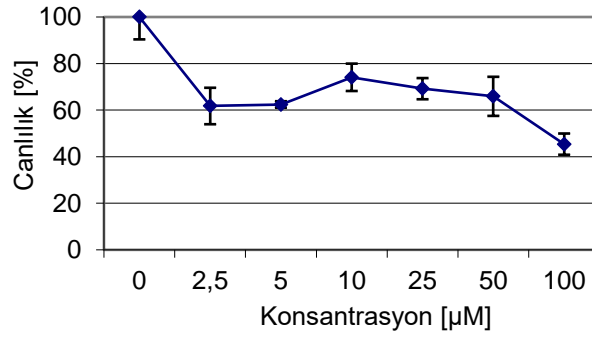
Naringin PMMA NP'lerin sitotoksitesi 2,5-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde 24, 48, 72 sa maruziyetinden sonra yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslandı. Naringin PMMA NP'lerin 24 sa maruziyetten sonra 0-50  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 50-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 24 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 88,797  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.27) (Şekil 4.26).

**Çizelge 4.27.** MTT yöntemine göre naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,457 $\pm$ 0,140	100,00
2,5	0,900 $\pm$ 0,114	61,77
5	0,909 $\pm$ 0,020	62,42
10	1,079 $\pm$ 0,085	74,09
25	1,008 $\pm$ 0,066	69,22
50	0,960 $\pm$ 0,122	65,92
100	0,661 $\pm$ 0,066	45,39

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.26.** Naringin PMMA NP'lerin 24 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonnuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

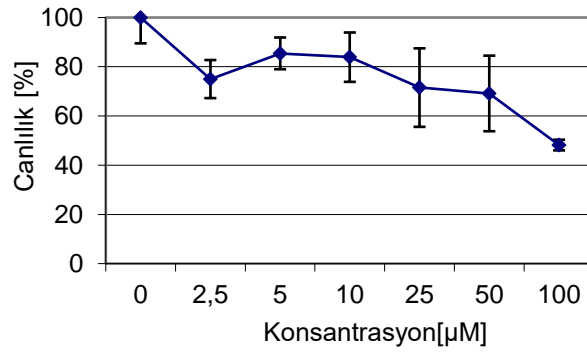
Naringin PMMA NP'lerin 48 sa maruziyetten sonra 0-50 µM konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 50-100 µM konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 48 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 95,668 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.28) (Şekil 4.27).

**Çizelge 4.28.** MTT yöntemine göre naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,556 $\pm$ 0,024	100,00
2,5	1,167 $\pm$ 0,120	74,99
5	1,329 $\pm$ 0,100	85,43
10	1,305 $\pm$ 0,156	83,89
25	1,113 $\pm$ 0,248	71,53
50	1,076 $\pm$ 0,239	69,15
100	0,749 $\pm$ 0,033	48,18

\*Sonnuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.27.** Naringin PMMA NP'lerin 48 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslanmıştır.

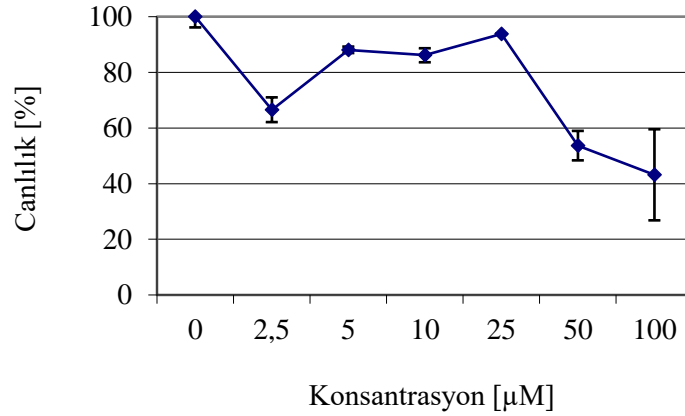
Naringin PMMA NP'lerin 72 sa maruziyetten sonra 0-10 µM konsantrasyon aralığında 3T3 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 25-100 µM konsantrasyon aralığında ise daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 67,495 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.29) (Şekil 4.28).

**Çizelge 4.29.** MTT yöntemine göre naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	2,116 $\pm$ 0,095	100,00
2,5	1,408 $\pm$ 0,094	66,56
5	1,864 $\pm$ 0,024	88,09
10	1,822 $\pm$ 0,053	86,14
25	2,329 $\pm$ 0,245	110,10
50	1,135 $\pm$ 0,112	53,67
100	0,913 $\pm$ 0,346	43,18

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.28.** Naringin PMMA NP'lerin 72 saatlik maruziyetten sonra 3T3 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

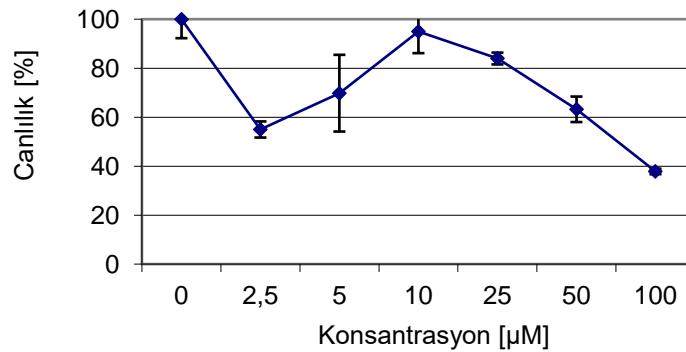
## 2. Naringin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:

Naringin PMMA NP'lerin sitotoksitesi 2,5-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde 24, 48, 72 sa maruziyetinden sonra yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslandı. Naringin PMMA NP'lerin 24 sa maruziyetten sonra 0-50  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 50-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Naringin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde 24 saatlik maruziyetten sonra IC<sub>50</sub> değeri 76,045  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.30) (Şekil 4.29).

**Çizelge 4.30.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 24 sa maruziyetten sonra naringin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	1,752 ± 0,136	100,00
2,5	0,963 ± 0,057	54,97
5	1,223 ± 0,274	69,79
10	1,665 ± 0,156	95,03
25	1,470 ± 0,042	83,94
50	1,107 ± 0,091	63,20
100	0,663 ± 0,019	37,84

\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.29.** Naringin PMMA NP'lerin 24 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

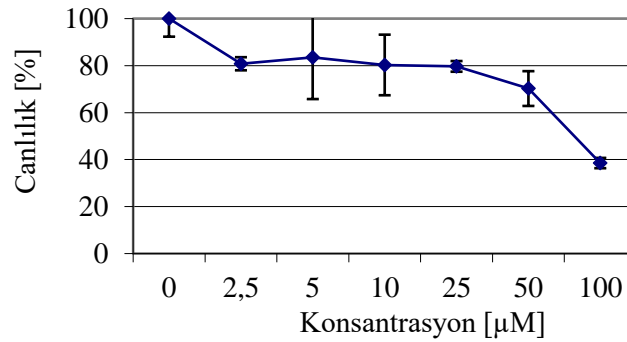
\*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

Naringin PMMA NP'lerin 48 sa maruziyetten sonra 0-25 µM konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 25-100 µM konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Naringin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde 48 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 81,89 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.31) (Şekil 4.30).

**Çizelge 4.31.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 48 sa maruziyetten sonra naringin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ( $\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	3,250 $\pm$ 0,250	100,00
2,5	2,625 $\pm$ 0,090	80,78
5	2,712 $\pm$ 0,575	83,45
10	2,608 $\pm$ 0,655	80,27
25	2,589 $\pm$ 0,074	79,66
50	2,282 $\pm$ 0,240	70,23
100	1,252 $\pm$ 0,071	38,52

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.30.** Naringin PMMA NP'lerin 48 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

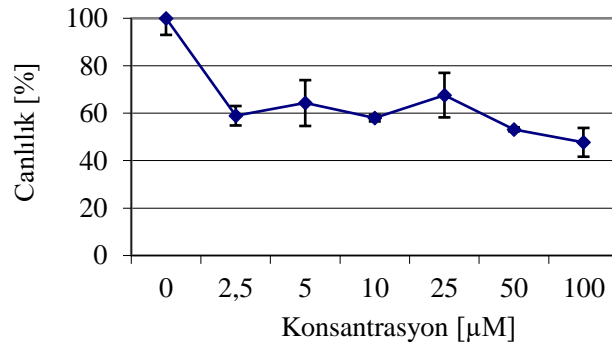
\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

Naringin PMMA NP'lerin 72 sa maruziyetten sonra 0-25  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında Caco-2 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, 25-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Naringin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 82,247  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.32) (Şekil 4.31).

**Çizelge 4.32.** MTT yöntemine göre Caco-2 hücrelerinde 72 sa maruziyetten sonra naringin PMMA NP'lerin sitotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon (µM)	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
0 [(-) kontrol]	3,500 ± 0,245	100,00
2,5	2,062 ± 0,143	58,92
5	2,249 ± 0,338	64,27
10	2,027 ± 0,049	57,93
25	2,366 ± 0,328	67,61
50	1,861 ± 0,028	53,18
100	1,670 ± 0,212	47,71

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.31.** Naringin PMMA NP'lerin 72 saatlik maruziyetten sonra Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri. \*

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

### 4.5.3. Naringin PMMA NP'lerin Genotoksisitesine İlişkin Bulgular

#### 1. Naringin PMMA NP'lerin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde COMET yöntemi ile genotoksisitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular:

Naringin PMMA NP'lerin sitotoksisite göstermediği 5, 10, 25 ve 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde üç ayrı deneyin DNA hasarı sonuçları Çizelge 4.33 'de gösterilmiştir.

Naringin PMMA NP'lerin negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslandığında 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde düşük dozlarda DNA hasarı oluşturmadığı saptanmıştır.

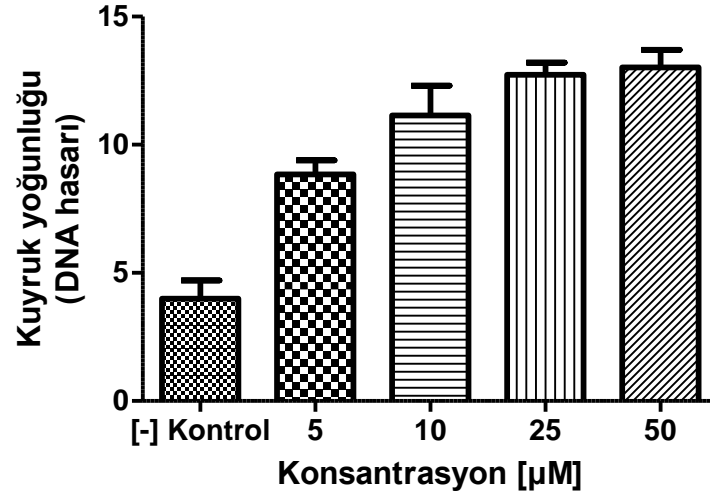
Naringinin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinin her ikisinde de kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarının negatif kontrole kıyasla konsantrasyon arttıkça arttığı görülmüştür (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33) ( $p < 0,001$ ).

**Çizelge 4.33.** Naringin PMMA NP'lerin 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde genotoksik etkisi. \*

Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	3T3 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) ( $\pm$ standart sapma)	Caco-2 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) ( $\pm$ standart sapma)
0 [(-) kontrol]	3,988 $\pm$ 0,586	5,587 $\pm$ 0,533
5	8,848 $\pm$ 0,443	8,687 $\pm$ 0,558
10	11,139 $\pm$ 0,948	10,098 $\pm$ 1,394
25	12,739 $\pm$ 0,474	11,696 $\pm$ 0,869
50	13,022 $\pm$ 0,558	13,488 $\pm$ 1,007

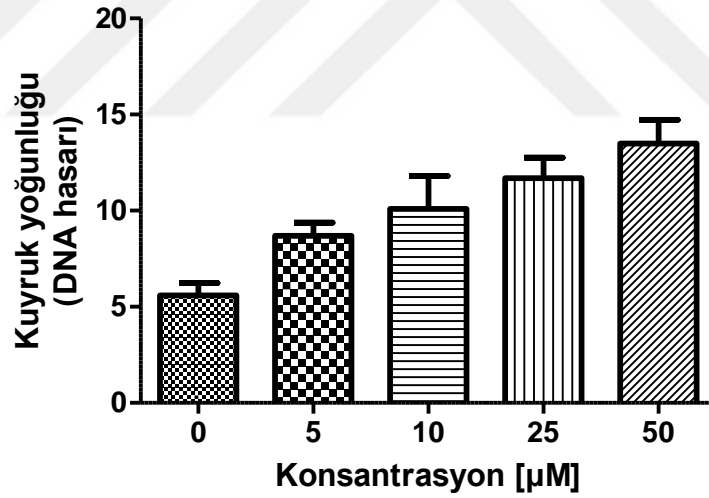
\*Sonnular üç çalışmanın ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.32. Naringin PMMA NP'lerin 3T3 hücrelerinde DNA hasarına etkisi. \*

\*Üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.  
( $p < 0,001$ ) Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.33. Naringin PMMA NP'lerin Caco-2 hücrelerinde DNA hasarına etkisi. \*

\*Üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.  
( $p < 0,001$ ) Negatif kontrol (DMEM) ile kıyaslanmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında bitkisel fenolik bileşiklerden naringin, berberin, PMMA kaplı naringin NP'ler ve berberin NP'lerin antioksidan özellikleri ile 3T3 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bitkilerden elde edilen fitokimyasal bileşikler, önemli terapötik etkilere sahip olması nedeniyle günümüzde ilaç kaynağı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle bu bileşikler arasında bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler sahip oldukları antiinflamatuvar, antiviral, antioksidan ve antikanser etkiler nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir.

Naringin, greyfurtta bulunan flavonoid yapıda bir bileşiktir; antioksidan, lipit düşürücü, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikanser gibi çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir [3]. Birçok çalışma, naringinin hem *in vitro* hem de *in vivo* testlerde farklı hücresel yollarla çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini bastırıldığını ve ayrıca farklı kanser hücrelerinde çeşitli apoptotik ve proapoptotik yolları aktive ettiğini ortaya koymuştur [4,116].

Berberin ise *Berberis* türlerinin kökünden, gövdesinden ve kabuğundan izole edilen bir izokinolin alkaloid yapısında bir bileşiktir. Tip 2 diyabet, hiperkolesterolemi, kanser gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde, kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden ve apoptozu indükleyen bir ajan olarak kullanılmıştır [35].

Bu fitokimyasal bileşikler umut verici antikanser etkinliğe sahip olmalarına rağmen zayıf farmakokinetik profil, zayıf suda çözünürlük ve fizyolojik ortamda uyumsuzluk gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bu durum özellikle berberinin potansiyel bir ilaç olarak kullanımını sınırlamaktadır. Bu amaçla, antikanser bileşiklerden berberin ve naringinin terapötik etkilerini iyileştirmek için NP tabanlı ilaç uygulama sistemlerine ilgi giderek artmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, MTT yöntemi ile sıçan feokromositoma hücreleri kullanılarak berberin ve naringin yüklü kitosan NP'lerin sitotoksitesini araştırmıştır. Sonuçlar hem berberin hem de naringin yüklü NP'lerin sitotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir [80].

Polimetilmetakrilat (PMMA) kaplı nanopartiküllerinin sitotoksitesine ilişkin literatür değerlendirildiğinde birçok *in vitro* çalışmada, farklı hücre hatlarında bu NP'lerin non-toksik olduğu bildirilmekle birlikte bu konu ile alakalı yeterli veri bulunmamaktadır.

Antioksidan özellikleri bilinen berberin, naringin, berberin PMMA NP'ler, naringin PMMA NP'lerin antioksidan kapasiteleri bu tez çalışması kapsamında DPPH radikal süpürme kapasitesi yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Çalışılan tüm bileşikler ve NP'ler, 1000-2000  $\mu$ M konsantrasyon aralığında en yüksek antioksidan kapasiteyi gösterdi. Bileşiklerin negatif kontrole (Metanol-DPPH) karşı antioksidan kapasiteleri incelendiğinde, konsantrasyon arttıkça bileşiklerin "Radikal süpürücü etkisinin [%]" arttığı gözlemlendi. 2000  $\mu$ M konsantrasyonunda berberin, naringin, berberin yüklü PMMA NP ve naringin yüklü PMMA NP'lerin DPPH inhibisyonunun sırasıyla %41,24, 64,08, 25,84, 34,11'e ulaştığı bulunmuştur. Bu durum çalışmamızda çalışılan tüm bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin olduğu ancak berberin ve naringinin antioksidan kapasitesinin nanopartikül formlarına kıyasla daha fazla olduğu bulundu. Elde edilen veriler ışığında bileşiklerin antioksidan kapasiteleri değerlendirildiğinde en yüksek antioksidan kapasiteye naringinin, en az antioksidan kapasiteye ise berberin kapsüllü PMMA NP'lerin sahip olduğu görüldü.

Naringinin ve naringin NP'lerin antioksidan kapasitesinin araştırıldığı bir çalışmada konsantrasyona bağlı olarak DPPH ve TEAK yöntemlerinde naringin ve NP'lerinin antioksidan kapasitesinin konsantrasyon artışıyla birlikte arttığı bulunmuştur [117]. Berberin ve berberin NP'lerin DPPH yöntemi ile antioksidan kapasitesinin araştırıldığı bir çalışmada, berberin antioksidan kapasitesinin nanopartikül formlarına kıyasla daha fazla olduğu bulunurken aralarında önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir [118].

Bu çalışma kapsamında berberin, naringin, berberin PMMA NP'ler, naringin PMMA NP'lerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için MTT testi kullanıldı. Bu amaçla 3T3 ve Caco-2 hücreleri her bir madde ile 24, 48 ve 72 saat maruz bırakıldı ve bileşiklerin IC50 değerleri bulundu. MTT testi sonucuna göre; berberinin 5-100  $\mu$ M konsantrasyon aralığında 3T3 hücresinde 24, 48, 72

saat maruziyet sonra IC50 değerinin sırasıyla 79,20, 92,43, 60,97 olduğu saptandı. Caco-2 hücresinde ise 24, 48, 72 saat maruziyet sonra IC50 değerinin sırasıyla 64,48, 66,39, 73,72 olduğu saptandı. Berberinin her iki hücre hattında da 50-100 uM konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi. Sağlıklı hücreler ile kanser hücreleri kıyaslandığında, 72 saatlik maruziyet dışında kanser hücrelerinde IC50 değerleri sağlıklı hücrelere göre daha düşük değerde bulundu. Berberinin 72 saatlik maruziyetten sonra ise sağlıklı hücrelerde IC50 değerinin daha düşük olduğu bulundu. Bu durum berberinin uzun süreli maruziyette sağlıklı hücrelere zarar vermeye başladığını göstermiştir.

MTT testi sonucuna göre; naringinin 25-2000  $\mu$ M konsantrasyon aralığında 3T3 hücresinde 24, 48, 72 saat maruziyet sonra IC50 değerinin sırasıyla 1891,20, 1955,34, 1931,37 olduğu saptandı. Caco-2 hücresinde ise 24,48,72 saat maruziyet sonra IC50 değerinin sırasıyla 1991,12, 1531,17, 1452,17 olduğu saptandı. Naringinin her iki hücre hattında da 500-1000 uM konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi. Naringinin 24 saatlik maruziyet dışında kanser hücrelerinde IC50 değerleri sağlıklı hücrelere göre daha düşük bulundu. Naringinin 24 saatlik maruziyetten sonra sitotoksik etkileri ise sağlıklı hücrelerde ve kanser hücrelerinde benzer olduğu bulundu.

MTT testi sonucuna göre; berberin yüklü PMMA NP'lerin 5-100  $\mu$ M konsantrasyon aralığında 3T3 hücresinde 24, 48, 72 saat maruziyet sonra IC50 değerinin sırasıyla 89,49, 91,77, 65,99 olduğu saptandı. Caco-2 hücresinde ise 24,48,72 saat maruziyet sonra IC50 değerinin sırasıyla 93,24, 68,35, 78,82 olduğu saptandı. Berberin yüklü PMMA NP'lerin her iki hücre hattında da 50-100 uM konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi. Berberin yüklü PMMA NP'lerin IC50 değerlerinin sağlıklı ve kanser hücrelerinde 24 ve 72 saatlik maruziyetten sonra benzer dozlarda sitotoksik etki gösterdiği bulundu. Ancak berberin yüklü PMMA NP'lerin 48 saatlik maruziyetten sonra sitotoksik etkileri ise kanser hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda olduğu bulundu.

MTT testi sonucuna göre; naringin yüklü PMMA NP'lerin 5-100  $\mu$ M konsantrasyon aralığında 3T3 hücresinde 24, 48, 72 saat maruziyet sonra IC50 değerinin sırasıyla 88,7977, 95,6684, 67,495 olduğu saptandı. Caco-2 hücresinde ise 24,48,72 saat maruziyet sonra IC50 değerinin sırasıyla 76,04, 81,89, 82,24 olduğu saptandı. Naringin yüklü PMMA NP'lerin her iki hücre hattında da 50-100  $\mu$ M konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi. Naringin yüklü PMMA NP'lerin IC50 değerlerinin 72 saat maruziyet dışında kanser hücrelerinde IC50 değerlerinin sağlıklı hücelere göre daha düşük olduğu bulundu. 72 saatlik maruziyetten sonra ise sağlıklı hücrelerde IC50 değerinin daha düşük olduğu bulundu. Bu durum naringin yüklü PMMA NP'lerin uzun süreli maruziyette sağlıklı hücelere zarar vermeye başladığını göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda berberin ve naringin NP'lerinin doza bağlı olarak sağlıklı ve kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [79]. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada elde edilen veriler ışığında; bileşiklerin sitotoksitesi değerlendirildiğinde tüm bileşiklerin sitotoksik etkisinin konsantrasyon artışıyla birlikte artış gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca sitotoksite çalışmalarında berberin ve naringin bileşiklerin NP formülasyonları ile kıyaslandığında her iki hücre hattında daha yüksek IC50 değerlerine sahip olduğu görüldü. Berberin ve naringin daha düşük konsantrasyonlarda kanser hücrelerine sitotoksik etki gösterirken aynı konsantrasyonlarda sağlıklı hücelere göstermemiştir. Yapılan çalışmalarda berberin [74,76,77,19,82] ve naringin NP'lerinin [71,72,81] doza bağlı olarak kanser hücrelerinde sağlıklı hücelere kıyasla daha yüksek sitotoksite gösterdiği bulunmuştur. Bu durum NP'lerin kanser hücrelerine seçici sitotoksik etkisini göstermektedir. Yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler NP'lerin seçici sitotoksite gösterdiği sonuçları destekler niteliktedir.

Berberin NP'ler ile serbest berberinin karşılaştırıldığı bir çalışmada NP'ler sağlıklı hücrelerde daha az, kanser hücrelerinde ise neredeyse aynı derecede sitotoksiste gösterdiği bulunmuştur [77]. Başka bir çalışmada ise NP'lerin serbest berberine göre sağlıklı hücrelerde daha az, kanser hücrelerinde daha yüksek sitotoksiste gösterdiği bulunmuştur [79]. Yaptığımız çalışmada da elde ettiğimiz veriler ışığında berberin, berberin yüklü PMMA NP'ler ile

kıyaslandığında NP formunun antioksidan kapasitesinin berberine kıyasla azaldığı gözlenirken her iki hücre hattında da IC50 değerinin daha yüksek olduğu görüldü. Bununla birlikte NP formülasyonlarının antioksidan kapasitelerinin azalmasına rağmen kanser hücrelerinde daha düşük dozlarda sitotoksik etki gösterdiği bulundu. Ayrıca NP formülasyonu oluşturulması ile berberinin antikanser aktivitesinin iyileştirildiği sonucuna varılabilir. Bunun yanında berberinin çözünürlük problemi NP formülasyonu sayesinde giderildi. Bu durum, NP formülasyonlarının 3T3 hücrelerinde biyoyumluluğunu göstermektedir.

Naringin, naringin yüklü PMMA NP'ler ile kıyaslandığında kanser hücrelerinde NP'lerin daha düşük konsantrasyonlarda yüksek toksisite gösterdiği bulundu. Naringin bileşiği ise naringin yüklü PMMA NP'ler ile kıyaslandığında NP formunun antioksidan kapasitesinin naringine kıyasla azaldığı görülmüştür. Bu durum, NP formülasyonlarının 3T3 hücrelerinde biyoyumluluğunu göstermektedir. Elde edilen bu veriler NP'lerin biyoyumluluğu gösteren çalışmaları destekler niteliktedir.

Bu çalışma kapsamında berberin, naringin, berberin PMMA NP'ler, naringin PMMA NP'lerin genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için COMET testi kullanıldı. Bu amaçla tüm bileşikler ve NP'lerin sitotoksikite göstermediği belirlenen konsantrasyonlarda 3T3 ve Caco-2 hücreleri kullanılarak her bir madde için 3 saatlik maruziyet sonucu oluşan DNA hasarı değerlendirildi. COMET testi sonucuna göre, 3T3 ve Caco-2 hücrelerinin her ikisinde de konsantrasyon artışına bağlı olarak negatif kontrol ile kıyaslandığında DNA hasarının arttığı görüldü. Genel olarak naringin ve berberin bileşikleri, sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda 3T3 ve Caco-2 hücrelerinde önemli derecede DNA hasarı oluşturmamıştır.

Berberin bileşiği ise berberin yüklü PMMA NP'ler ile kıyaslandığında, NP formülasyonlarının berberin bileşiğine göre sağlıklı 3T3 hücrelerinde DNA hasarının daha az olduğu görüldü. Caco-2 hücrelerinde ise NP formülasyonlarının berberin bileşiğiyle benzer DNA hasarlarına sebep olduğu görüldü. Bu durum berberin yüklü PMMA NP'lerinin berberin bileşiğinin genotoksik hasarını önemli ölçüde azaltabileceğini göstermektedir. Berberin

NP'lerinin COMET yöntemi ile genotoksitesinin araştırıldığı bir çalışmada berberin ve NP'ler, kontrole kıyasla daha yüksek DNA hasarı göstermesine rağmen birbirleri ile kıyaslandığında benzer DNA hasarı oluşturduğu görülmüştür [119]. Naringin bileşiği ise naringin yüklü PMMA NP'ler ile kıyaslandığında, 3T3 ve Caco-2 hücrelerinin her ikisinde de NP formülasyonlarının naringin bileşiğiyle benzer DNA hasarlarına sebep olduğu görüldü. Bu durum naringin yüklü PMMA NP'lerinin naringin bileşiğinin genotoksik hasarını arttırmadığını göstermektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde birçok fitokimyasal bileşik, potansiyel terapötik aktivitelere sahip olması nedeniyle hastalıkların tedavisi için sıklıkla araştırılmaktadır. Özellikle antioksidan ve antikanser etkileri bulunan bileşiklerin kullanımının başta kanser olmak üzere birçok hastalığın önlenmesi, tedavisi ve sağlıklı durumun korunması için yararlı olacağı iddia edilmektedir. Bu fitokimyasal bileşiklerin bu terapötik etkilerinin yanında potansiyel sitotoksik ve genotoksik etkileri ve çözünürlük problemlerinin bulunması söz konusudur. Özellikle kanser tedavisinde çözünürlük problemleri ve terapötik etkilerini iyileştirmek için nanotaşıyıcı sistemler gibi yeni taşıyıcı sistemlere odaklanılmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında bitkisel fenolik bileşiklerden naringin, berberin, PMMA kaplı naringin NP'ler ve berberin NP'lerin antioksidan özellikleri ile 3T3 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere dayanarak, ilaç toksisitesini azaltmak için NP tabanlı sistemlerin tercih edilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca NP'lerin genotoksitesisi incelendiğinde serbest bileşikler ile benzer oranlarda genotoksik etkiler göstermesi nedeniyle NP'lerin bileşiklerin genotoksik etkilerini arttırmadığı sonucuna varılabilir. Çalışma sonucunda NP'lerin bileşiklerin etkin dozunu ve toksik etkilerini azaltabileceği söylenebilir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, yeni tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayacak veriler sunmaktadır. Berberin ve naringin PMMA-NP'lerinin kanser tedavisinde kullanılması için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- [1] Akhtar MF, Saleem A, Rasul A, Faran Ashraf Baig MM, Bin-Jumah M, Abdel Daim MM. Anticancer natural medicines: An overview of cell signaling and other targets of anticancer phytochemicals. *Eur J Pharmacol* 2020;888. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173488>.
- [2] Sharma A, Bhardwaj P, Arya SK. Naringin: A potential natural product in the field of biomedical applications. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2021;2:100068. <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2021.100068>.
- [3] Gollavilli H, Hegde AR, Managuli RS, Bhaskar KV, Dengale SJ, Reddy MS, et al. Naringin nano-ethosomal novel sunscreen creams: Development and performance evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2020;193:111122. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2020.111122>.
- [4] Memariani Z, Abbas SQ, ul Hassan SS, Ahmadi A, Chabra A. Naringin and naringenin as anticancer agents and adjuvants in cancer combination therapy: Efficacy and molecular mechanisms of action, a comprehensive narrative review. *Pharmacol Res* 2021;171:105264. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.105264>.
- [5] Othman MS, Obeidat ST, Al-Bagawi AH, Fareid MA, Fehaid A, Abdel Moneim AE. Green-synthesized selenium nanoparticles using berberine as a promising anticancer agent. *J Integr Med* 2022;20:65–72. <https://doi.org/10.1016/J.JOIM.2021.11.002>.
- [6] Khan S, Hussain A, Attar F, Bloukh SH, Edis Z, Sharifi M, et al. A review of the berberine natural polysaccharide nanostructures as potential anticancer and antibacterial agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022;146:112531. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112531>.
- [7] Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, Gupta A. Phytochemistry of Medicinal Plants. *J Pharmacogn Phytochem* 2013;1.
- [8] Vuolo MM, Lima VS, Maróstica Junior MR. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* 2019:33–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>.
- [9] Dillard CJ, Bruce German J. Review Phytochemicals: nutraceuticals and human health n.d. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000915\)80:12](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000915)80:12).
- [10] de la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E. Phenolic Compounds. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* 2019:253–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>.
- [11] Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI, Gomez HAG, Chen C-YO, Lima GPP. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. *Phenolic Compounds - Biological Activity* 2017. <https://doi.org/10.5772/66368>.

- [12] Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* 2013, Vol 18, Pages 2328-2375 2013;18:2328–75. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES18022328>.
- [13] Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MS v., Peralta RM. Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int J Food Sci Technol* 2012;47:2023–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>.
- [14] Ng YP, Or TCT, Ip NY. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2015;89:260–70. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2015.07.018>.
- [15] Lu JJ, Bao JL, Chen XP, Huang M, Wang YT. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012;2012. <https://doi.org/10.1155/2012/485042>.
- [16] Bai R, Yao C, Zhong Z, Ge J, Bai Z, Ye X, et al. Discovery of natural anti-inflammatory alkaloids: Potential leads for the drug discovery for the treatment of inflammation. *Eur J Med Chem* 2021;213:113165. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.113165>.
- [17] Zhang J, Hu K, Di L, Wang P, Liu Z, Zhang J, et al. Traditional herbal medicine and nanomedicine: Converging disciplines to improve therapeutic efficacy and human health. *Adv Drug Deliv Rev* 2021;178:113964. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.113964>.
- [18] Bacanlı M, Başaran AA, Başaran N. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and Chemical Toxicology* 2015;81:160–70. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2015.04.015>.
- [19] Haider K, Haider MR, Neha K, Yar MS. Free radical scavengers: An overview on heterocyclic advances and medicinal prospects. *Eur J Med Chem* 2020;204:112607. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112607>.
- [20] Ionita P. The Chemistry of DPPH· Free Radical and Congeners. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–15. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041545>.
- [21] Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative Stress. *Sports Medicine* 2006;36:327–58. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>.
- [22] Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018;13:757. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.
- [23] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1–40. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2005.12.009>.
- [24] Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:287–99. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2010.10.016>.
- [25] Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010;44:479–96. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>.

- [26] Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets* 2018;20:16–26. <https://doi.org/10.2174/1871526518666180628124323>.
- [27] Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 2020;20:16–26.
- [28] Colson YL, Grinstaff MW, Colson YL, Grinstaff MW. Biologically Responsive Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Advanced Materials* 2012;24:3878–86. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201200420>.
- [29] Zinovkin RA, Andrey A, Zamyatnin Jr. Mitochondria-Targeted Drugs. *Curr Mol Pharmacol* 2019;12:202. <https://doi.org/10.2174/1874467212666181127151059>.
- [30] Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014;224:164–75. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2014.10.016>.
- [31] Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med* 2013;60:1–4. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.02.011>.
- [32] Ortiz LMG, Lombardi P, Tillhon M, Scovassi AI. Berberine, an Epiphany Against Cancer. *Molecules* 2014, Vol 19, Pages 12349-12367 2014;19:12349–67. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES190812349>.
- [33] Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review. *Phytotherapy Research* 2019;33:504–23. <https://doi.org/10.1002/PTR.6252>.
- [34] Wang K, Feng X, Chai L, Cao S, Qiu F. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. <https://doi.org/10.1080/0360253220171306544> 2017;49:139–57. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1306544>.
- [35] Majidzadeh H, Araj-Khodaei M, Ghaffari M, Torbati M, Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Hamblin MR. Nano-based delivery systems for berberine: A modern anti-cancer herbal medicine. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2020;194:111188. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2020.111188>.
- [36] Chen W, Miao YQ, Fan DJ, Yang SS, Lin X, Meng LK, et al. Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *AAPS PharmSciTech* 2011;12:705–11. <https://doi.org/10.1208/S12249-011-9632-Z/FIGURES/2>.
- [37] Liu YT, Hao HP, Xie HG, Lai L, Wang Q, Liu CX, et al. Extensive Intestinal First-Pass Elimination and Predominant Hepatic Distribution of Berberine Explain Its Low Plasma Levels in Rats. *Drug Metabolism and Disposition* 2010;38:1779–84. <https://doi.org/10.1124/DMD.110.033936>.

- [38] Mirhadi E, Rezaee M, Malaekheh-Nikouei B. Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of *Berberis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;104:465–73. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.05.067>.
- [39] Nguyen TX, Huang L, Liu L, Elamin Abdalla AM, Gauthier M, Yang G. Chitosan-coated nano-liposomes for the oral delivery of berberine hydrochloride. *J Mater Chem B* 2014;2:7149–59. <https://doi.org/10.1039/C4TB00876F>.
- [40] Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:296–308. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0448>.
- [41] Almeer RS, Aref AM, Hussein RA, Othman MS, Abdel Moneim AE. Antitumor Potential of Berberine and Cinnamic Acid against Solid Ehrlich Carcinoma in Mice. *Anticancer Agents Med Chem* 2018;19:356–64. <https://doi.org/10.2174/1871520618666181116162441>.
- [42] Shankung Lin, Shioh-Chwen Tsai, Chun-Chung Lee, Bao-Wei Wang, Jer-Young Liou, Kou-Gi Shyu. Berberine inhibits HIF-1 $\alpha$  expression via enhanced proteolysis. *Mol Pharmacol* 2004;66:612-619.
- [43] Wang Y, Wu H, Chen P, Su W, Peng W, Li P. Fertility and early embryonic development toxicity assessment of naringin in Sprague-Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2021;123:104938. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2021.104938>.
- [44] Jagetia GC, Reddy TK. The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2002;519:37–48. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00111-0).
- [45] Niu D, Ren EF, Li J, Zeng XA, Li SL. Effects of pulsed electric field-assisted treatment on the extraction, antioxidant activity and structure of naringin. *Sep Purif Technol* 2021;265:118480. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2021.118480>.
- [46] Sharma A, Bhardwaj P, Arya SK. Naringin: A potential natural product in the field of biomedical applications. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2021;2:100068. <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2021.100068>.
- [47] Sharma P, Kumar V, Guleria P. Naringin: Biosynthesis and Pharmaceutical Applications. *Indian J Pharm Sci* 2019;81:988–99. <https://doi.org/10.36468/PHARMACEUTICAL-SCIENCES.596>.
- [48] Margherita Dall’Asta, Eleonora Derlindati, Valentina Curella, Pedro Mena, Luca Calani, Sumantra Ray, et al. Effects of naringenin and its phase II metabolites on in vitro human macrophage gene expression. *Int J Food Sci Nutr* 2013;64:843–9.
- [49] Li P, Wu H, Wang Y, Peng W, Su W. Toxicological evaluation of naringin: Acute, subchronic, and chronic toxicity in Beagle dogs. *Regulatory Toxicology and*

Pharmacology 2020;111:104580.  
<https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2020.104580>.

- [50] Rajadurai M, Stanely Mainzen Prince P. Preventive effect of naringin on isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: an in vivo and in vitro study. *Toxicology* 2007;232:216–25. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2007.01.006>.
- [51] Zaimy MA, Saffarzadeh N, Mohammadi A, Pourghadamyari H, Izadi P, Sarli A, et al. New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. *Cancer Gene Ther* 2017;24:233–43. <https://doi.org/10.1038/CGT.2017.16>.
- [52] Aldahhan R, Almohazey D, Khan FA. Emerging trends in the application of gold nanoformulations in colon cancer diagnosis and treatment. *Semin Cancer Biol* 2021. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2021.11.008>.
- [53] Bharadwaj P, Das SS, Beg S, Rahman M. Formulation and biological stability of nanomedicines in cancer treatment. *Nanoformulation Strategies for Cancer Treatment* 2021:277–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821095-6.00020-3>.
- [54] Qingxin Mu, Hui Wang, Miqin Zhang. Nanoparticles for imaging and treatment of metastatic breast cancer. *Expert Opin Drug Deliv* 2017;14:123–36.
- [55] Jin K-T, Yao J-Y, Ying X-J, Lin Y, Chen Y-F. Nanomedicine and Early Cancer Diagnosis: Molecular Imaging using Fluorescence Nanoparticles. *Curr Top Med Chem* 2020;20:2737–61.
- [56] Ghorbani F, Kokhaei P, Ghorbani M, Eslami M. Application of different nanoparticles in the diagnosis of colorectal cancer. *Gene Rep* 2020;21:100896. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100896>.
- [57] Donaldson K, Borm PJA, Castranova V, Gulumian M. The limits of testing particle-mediated oxidative stress in vitro in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2009;6:1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-13/FIGURES/1>.
- [58] Sathya S, Murthy PS, Devi VG, Das A, Anandkumar B, Sathyaseelan VS, et al. Antibacterial and cytotoxic assessment of poly (methyl methacrylate) based hybrid nanocomposites. *Materials Science and Engineering: C* 2019;100:886–96. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.03.053>.
- [59] Alves Batista F, Brena Cunha Fontele S, Beserra Santos LK, Alves Filgueiras L, Quaresma Nascimento S, de Castro e Sousa JM, et al. Synthesis, characterization of  $\alpha$ -terpineol-loaded PMMA nanoparticles as proposed of therapy for melanoma. *Mater Today Commun* 2020;22:100762. <https://doi.org/10.1016/J.MTCOMM.2019.100762>.
- [60] Carpio Arévalo JM, Feuser PE, Rossi GR, Trindade ES, da Silva Córneo E, Machado-de-Ávila RA, et al. Preparation and characterization of 4-nitrochalcone-folic acid-poly(methyl methacrylate) nanocapsules and cytotoxic activity on HeLa and NIH3T3 cells. *J Drug Deliv Sci Technol* 2019;54:101300. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2019.101300>.

- [61] Feuser PE, Arévalo JMC, Junior EL, Rossi GR, da Silva Trindade E, Rocha MEM, et al. Increased cellular uptake of lauryl gallate loaded in superparamagnetic poly(methyl methacrylate) nanoparticles due to surface modification with folic acid. *J Mater Sci Mater Med* 2016;27:1–15. <https://doi.org/10.1007/S10856-016-5796-0/FIGURES/8>.
- [62] Avedian N, Zaaeri F, Daryasari MP, Akbari Javar H, Khoobi M. pH-sensitive biocompatible mesoporous magnetic nanoparticles labeled with folic acid as an efficient carrier for controlled anticancer drug delivery. *J Drug Deliv Sci Technol* 2018;44:323–32. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2018.01.006>.
- [63] Juneja R, Roy I. Surface modified PMMA nanoparticles with tunable drug release and cellular uptake. *RSC Adv* 2014;4. <https://doi.org/10.1039/c4ra07939f>.
- [64] Graça D, Louro H, Santos J, Dias K, Almeida AJ, Gonçalves L, et al. Toxicity screening of a novel poly(methylmethacrylate)-Eudragit nanocarrier on L929 fibroblasts. *Toxicol Lett* 2017;276. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.017>.
- [65] Guindani C, Feuser PE, Cordeiro AP, de Meneses AC, Possato JC, da Silva Abel J, et al. Bovine serum albumin conjugation on poly(methyl methacrylate) nanoparticles for targeted drug delivery applications. *J Drug Deliv Sci Technol* 2020;56:101490. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2019.101490>.
- [66] Linan LZ, Lima NMN, Benatti C, Xavier M, Rodrigues AA, Manenti F, et al. Cytotoxicity Assessment of a Poly(methyl methacrylate) Synthesized for the Direct Fabrication of Bone Tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2018;61:18160526. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160526>.
- [67] Ratanajanchai M, Kanchanasavita W, Suputtamongkol K, Wonglamsam A, Thamapipol S, Sae-Khow O. Heat-cured poly(methyl methacrylate) resin incorporated with different food preservatives as an anti-microbial denture base material. *J Dent Sci* 2021;16:706–12. <https://doi.org/10.1016/J.JDS.2020.09.006>.
- [68] Rudolf R, Popović D, Tomić S, Bobovnik R, Lazić V, Majerič P, et al. Microstructure characterisation and identification of the mechanical and functional properties of a new PMMA-ZnO composite. *Materials* 2020;13. <https://doi.org/10.3390/ma13122717>.
- [69] Acosta-Torres LS, Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Cajero-Juárez M, Castaño VM. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *Int J Nanomedicine* 2012;7. <https://doi.org/10.2147/IJN.S32391>.
- [70] Nguyen TX, Huang L, Liu L, Elamin Abdalla AM, Gauthier M, Yang G. Chitosan-coated nano-liposomes for the oral delivery of berberine hydrochloride. *J Mater Chem B* 2014;2:7149–59. <https://doi.org/10.1039/C4TB00876F>.
- [71] María Pleguezuelos-Villa, Silvia Mir-Palomo ., Octavio Díez-Sales, M.A Ofelia Vila Buso, Amparo Ruiz Sauri, Amparo Náchter. A novel ultradeformable

liposomes of Naringin for anti-inflammatory therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018;162:265–70.

- [72] Sahu N, Soni D, Chandrashekhar B, Satpute DB, Saravanadevi S, Sarangi BK, et al. Synthesis of silver nanoparticles using flavonoids: hesperidin, naringin and diosmin, and their antibacterial effects and cytotoxicity. *Int Nano Lett* 2016;6. <https://doi.org/10.1007/s40089-016-0184-9>.
- [73] Raeisi S, Chavoshi H, Mohammadi M, Ghorbani M, Sabzichi M, Ramezani F. Naringenin-loaded nano-structured lipid carrier fortifies oxaliplatin-dependent apoptosis in HT-29 cell line. *Process Biochemistry* 2019;83:168–75. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2019.05.013>.
- [74] Bhatnagar P, Kumari M, Pahuja R, Pant AB, Shukla Y, Kumar P, et al. Correction to: hyaluronic acid-grafted plga nanoparticles for the sustained delivery of berberine chloride for an efficient suppression of ehrlich ascites tumors (*Drug Delivery and Translational Research*, (2018), 8, 3, (565-579), 10.1007/s13346-018-0485-9). *Drug Deliv Transl Res* 2020. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00784-7>.
- [75] Wang Y, Wen B, Yu H, Ding D, Zhang JJ, Zhang Y, et al. Berberine Hydrochloride-Loaded Chitosan Nanoparticles Effectively Targets and Suppresses Human Nasopharyngeal Carcinoma. *J Biomed Nanotechnol* 2018;14:1486–95. <https://doi.org/10.1166/JBN.2018.2596>.
- [76] Pandey S, Mewada A, Thakur M, Shah R, Oza G, Sharon M. Biogenic gold nanoparticles as fotillas to fire berberine hydrochloride using folic acid as molecular road map. *Materials Science and Engineering: C* 2013;33:3716–22. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2013.05.007>.
- [77] Thakur M, Mewada A, Pandey S, Bhoori M, Singh K, Sharon M, et al. Milk-derived multi-fluorescent graphene quantum dot-based cancer theranostic system. *Materials Science and Engineering: C* 2016;67:468–77. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.05.007>.
- [78] Yue J, Wang Z, Shao D, Chang Z, Hu R, Li L, et al. Cancer cell membrane-modified biodegradable mesoporous silica nanocarriers for berberine therapy of liver cancer. *RSC Adv* 2018;8. <https://doi.org/10.1039/C8RA07574C>.
- [79] Zhang F, Zhang M, Zheng X, Tao S, Zhang Z, Sun M, et al. Berberine-based carbon dots for selective and safe cancer theranostics. *RSC Adv* 2018;8. <https://doi.org/10.1039/c7ra12069a>.
- [80] Ebrahimi MH, Samadian H, Davani ST, Kolarijani NR, Mogharabian N, Salami MS, et al. Peripheral nerve regeneration in rats by chitosan/alginate hydrogel composited with Berberine and Naringin nanoparticles: in vitro and in vivo study. *J Mol Liq* 2020;318. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114226>.
- [81] Sahu N, Soni D, Chandrashekhar • B, Satpute • D B, Saravanadevi S, Sarangi • B K, et al. Synthesis of silver nanoparticles using flavonoids: hesperidin, naringin and diosmin, and their antibacterial effects and cytotoxicity. *International Nano Letters* 2016 6:3 2016;6:173–81. <https://doi.org/10.1007/S40089-016-0184-9>.

- [82] Bhanumathi R, Manivannan M, Thangaraj R, Kannan S. Drug-Carrying Capacity and Anticancer Effect of the Folic Acid- and Berberine-Loaded Silver Nanomaterial to Regulate the AKT-ERK Pathway in Breast Cancer. *ACS Omega* 2018;3. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01347>.
- [83] Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* 2015;18:757–81. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.01.047>.
- [84] Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005;53:1841–56. <https://doi.org/10.1021/JF030723C/ASSET/IMAGES/LARGE/JF030723CF5.JPG>.
- [85] Chen Z, Bertin R, Frolidi G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem* 2013;138:414–20. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.11.001>.
- [86] Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem* 2012;130:1036–43. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.07.127>.
- [87] Marinova G, Batchvarov V. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2011;17.
- [88] Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature* 1958;181. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- [89] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 1995;28:25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [90] Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 2011;48:412–22. <https://doi.org/10.1007/S13197-011-0251-1/FIGURES/7>.
- [91] Mahto SK, Chandra P, Rhee SW. in vitromodels, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 2010 2:2 2010;2:87–93. <https://doi.org/10.1007/BF03216487>.
- [92] Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods in Molecular Biology* 2015;1250:333–48. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7\\_26/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26/COVER).
- [93] Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol* 2011;740:1–6. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1).
- [94] ERKEKOĞLU P, BAYDAR T. Güncel İn Vitro Sitotoksisite Testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 2021;41:45–63.
- [95] Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 2005;288:369–76. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2004.09.018>.

- [96] Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual 2016.
- [97] Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006;160:171–7. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2005.07.001>.
- [98] Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. *Acta Histochem* 2018;120:303–11. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2018.03.007>.
- [99] PB M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:49–53.
- [100] Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986;89:271–7. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
- [101] Hansen MB, Hansen MB, Hansen MB. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989;119:203–10.
- [102] Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol* 1998;79:179–83. <https://doi.org/10.1385/0-89603-448-8:179/COVER>.
- [103] Gomez Perez M, Fourcade L, Mateescu MA, Paquin J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Anal Biochem* 2017;535:43–6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.027>.
- [104] Stepanenko AA, Dmitrenko V v. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* 2015;574:193–203. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2015.08.009>.
- [105] Muruzabal D, Collins A, Azqueta A. The enzyme-modified comet assay: Past, present and future. *Food and Chemical Toxicology* 2021;147:111865. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111865>.
- [106] Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štětina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1997;375:183–93. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00013-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00013-4).
- [107] Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 2006;314:275–86. <https://doi.org/10.1385/1-59259-973-7:275/COVER>.
- [108] Hong Y hee, Jeon HL, Ko KY, Kim J, Yi JS, Ahn I, et al. Assessment of the predictive capacity of the optimized in vitro comet assay using HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2018;827:59–67. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2018.01.010>.

- [109] Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 2009;48:46–53. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2009.02.016>.
- [110] Luan Y, Honma M. Genotoxicity testing and recent advances. *Genome Instability & Disease* 2021 3:1 2021;3:1–21. <https://doi.org/10.1007/S42764-021-00058-7>.
- [111] Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291–8. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X).
- [112] Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research/DNA Repair* 1996;363:89–96. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(95\)00063-1](https://doi.org/10.1016/0921-8777(95)00063-1).
- [113] Cordelli E, Bignami M, Pacchierotti F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicol Res (Camb)* 2021;10:68–78. <https://doi.org/10.1093/TOXRES/TFAA093>.
- [114] Møller P, Azqueta A, Boutet-Robinet E, Koppen G, Bonassi S, Milić M, et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols* 2020 15:12 2020;15:3817–26. <https://doi.org/10.1038/S41596-020-0398-1>.
- [115] Langie SAS, Azqueta A, Collins AR. The comet assay: Past, present, and future. *Front Genet* 2015;6:266. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2015.00266/BIBTEX>.
- [116] Pleguezuelos-Villa M, Mir-Palomo S, Díez-Sales O, Buso MAOV, Sauri AR, Náchter A. A novel ultradefortable liposomes of Naringin for anti-inflammatory therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018;162:265–70. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.068>.
- [117] Liang Y, Hou D, Ni Z, Cao M, Cai L. Preparation, characterization of naringenin,  $\beta$ -cyclodextrin and carbon quantum dot antioxidant nanocomposites. *Food Chem* 2022;375. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131646>.
- [118] Stoyanova N, Ignatova M, Manolova N, Rashkov I, Toshkova R, Georgieva A. Nanoparticles based on complex of berberine chloride and polymethacrylic or polyacrylic acid with antioxidant and in vitro antitumor activities. *Int J Pharm* 2020;584. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119426>.
- [119] Sreeja S, Krishnan Nair CK. Tumor control by hypoxia-specific chemotargeting of iron-oxide nanoparticle – Berberine complexes in a mouse model. *Life Sci* 2018;195. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.036>.